

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**HADASSA VINGREN DE ANDRADE FRANÇA**

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR**  
***Bacillus pumilus* EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2026**

**HADASSA VINGREN DE ANDRADE FRANÇA**

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR  
*Bacillus pumilus* EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação de Engenharia Química do Centro  
de Tecnologia da Universidade Federal da  
Paraíba, em cumprimento aos requisitos para  
obtenção do título de Bacharel em Engenharia  
Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sharline Florentino de  
Melo Santos

**JOÃO PESSOA - PB**

**2026**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

F814c França, Hadassa Vingren de Andrade.

Cinética de crescimento e produção de  
biossurfactante por bacillus pumilus em meio com melaço  
de cana-de-açúcar / Hadassa Vingren de Andrade França.

- João Pessoa, 2026.

46 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos  
Santos.

TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Tensão superficial. 2. índice de emulsificação.  
3. emulsão. 4. separação por precipitação. I. Santos,  
Sharline Florentino de Melo Santos. II. Título.

UFPB/CT

CDU 66.01(043.2)

**HADASSA VINGREN DE ANDRADE FRANÇA**

**CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR  
*Bacillus pumilus* EM MEIO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação de Engenharia Química do Centro  
de Tecnologia da Universidade Federal da  
Paraíba, em cumprimento aos requisitos para  
obtenção do título de Bacharel em Engenharia  
Química.

**Aprovado em 16 de março de 2026.**

**BANCA EXAMIDANORA**

Documento assinado digitalmente  
 **SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS**  
Data: 10/04/2026 09:05:03-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Sharline Florentino de Melo Santos  
DEQ – CT – UFPB

Documento assinado digitalmente  
 **ANDREA FARIAS DE ALMEIDA**  
Data: 10/04/2026 10:12:52-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Andrea Farias de Almeida  
DB – CBIOTEC – UFPB

Documento assinado digitalmente  
 **GILVAN FIGUEIREDO MACIEL FILHO**  
Data: 10/04/2026 11:47:16-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Gilvan Figueiredo Maciel Filho  
PPGEQ - CT - UFPB

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que sempre se fez presente em mim e para mim através das pessoas que eu amo, através da natureza. Aos meus pais, Jessenildo e Claudiane, que nunca mediram esforços para que eu tivesse acesso a educação. Ao meu esposo e companheiro, Raul, que esteve comigo durante os altos e baixos da graduação, não sei o que seria de mim sem seu apoio e cuidado. A minha irmã, Hasenate, pelo apoio incondicional, por acreditar em mim e por ser meu lugar seguro nesse mundo. A todos os meus amigos, amigas e amigues.

Agradeço a professora Sharline pela disponibilidade, atenção e compromisso em orientar este trabalho. Ao Laboratório de Bioengenharia, especialmente as técnicas Débora e Fabiana, por toda orientação e auxílio. Ao Laboratório de Petróleo que cedeu equipamento e espaço para realização de testes. Aos meus colegas de PIBIC, Gustavo e Nathália, pela companhia, carinho e por toda troca que tivemos ao longo das infinitas tardes no laboratório. A minha grande amiga Camila Alessandra, que dividiu comigo os cinco anos de graduação, sendo uma presença gentil e encorajadora.

Agradeço a Universidade Federal da Paraíba e aos órgãos de fomento à pesquisa por fazerem parte da minha trajetória, incentivando a pesquisa científica e contribuindo para o avanço da ciência no nosso país.

*Aos meus pais, que me colocaram aqui.  
De vocês herdei mais do que o sobrenome.  
Herdei a coragem, a fé e a maneira de continuar.*

## RESUMO

Biossurfactante são moléculas anfipáticas que possuem propriedades tensoativas, produzidas por fontes biológicas, especialmente bactérias e fungos. Sua aplicação é impulsionada como alternativa aos surfactantes químicos obtidos a partir do petróleo, que possuem toxicidade, baixa biodegradabilidade e problemas ambientais. A viabilidade industrial dos biossurfactantes é limitada pelo alto custo de produção, especialmente nas etapas de *downstream*, e o baixo rendimento, onde buscam-se soluções que barateiem os processos de separação e associem a produção de biossurfactantes a substratos renováveis e de baixo custo. O presente estudo avaliou a produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* usando melaço de cana como fonte de carbono, através da caracterização do substrato, avaliação dos parâmetros cinéticos do cultivo, extração do biossurfactante, determinação do índice de emulsificação e avaliação da tensão superficial. O microrganismo foi isolado do solo cultivado de cana de açúcar da Usina Japungu, inoculado em meio com extrato de levedura, fosfato de potássio monobásico e dibásico e melaço de cana, incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. A velocidade específica máxima foi de 0,219 h<sup>-1</sup>, com tempo de geração de 3,16 horas. A produtividade de células foi de 0,005 g/L.h<sup>-1</sup> e o fator de conversão de substrato em células foi de 0,041 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. A extração do biossurfactante bruto foi avaliada por precipitação ácida e precipitação com etanol absoluto, em meio bruto, meio esterilizado e sobrenadante livre de células. A melhor concentração de biossurfactante foi obtida nas 24 h de fermentação, com 3,35 g/L extraídos por precipitação com etanol, e o índice de emulsificação alcançou o maior resultado nas 120 h de fermentação, atingindo 60% com óleo de soja e óleo de babaçu. A redução da tensão superficial não foi significativa. O biossurfactante produzido apresentou um potencial emulsificante satisfatório e um rendimento promissor quando comparado com outras espécies de *Bacillus* produtoras de surfactantes.

**Palavras chave:** Tensão superficial; índice de emulsificação; emulsão; separação por precipitação.

## ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules with surface-active properties produced by biological sources, especially bacteria and fungi. Their application is driven as an alternative to petroleum-derived chemical surfactants, which exhibit toxicity, low biodegradability, and environmental issues. The industrial viability of biosurfactants is limited by high production costs, particularly in downstream stages, and low yields; therefore, solutions are sought to reduce the cost of separation processes and couple biosurfactant production with renewable, low-cost substrates. The present study evaluated biosurfactant production by *Bacillus pumilus* using sugarcane molasses as a carbon source, through substrate characterization, evaluation of cultivation kinetic parameters, biosurfactant extraction, determination of the emulsification index, and surface tension assessment. The microorganism was isolated from sugarcane soil at the Japungu Mill, inoculated in a medium containing yeast extract, monobasic and dibasic potassium phosphate, and sugarcane molasses, and incubated in a shaker at 34°C with orbital agitation at 200 rpm. The maximum specific growth rate was  $0.219\text{ h}^{-1}$ , with a generation time of 3,16 hours. Cell productivity was  $0.005\text{ g/L}\cdot\text{h}^{-1}$ , and the biomass yield per substrate was  $0.041\text{ g}_x/\text{g}_s$ . Crude biosurfactant extraction was evaluated by acid precipitation and high purity ethanol precipitation in crude medium, sterilized medium, and cell-free supernatant. The highest biosurfactant concentration was obtained at 24 h of fermentation, with 3.35g/L extracted by ethanol precipitation, and the emulsification index reached its highest result at 120 h of fermentation, reaching 60% with soybean and babassu oils. The reduction in surface tension was not significant. The produced biosurfactant showed satisfactory emulsifying potential and a promising yield compared to other surfactant-producing *Bacillus* species

**Key words:** Surface tension; emulsification index; emulsion; precipitation separation

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 — Concentração micelar crítica.....                                                                                                                                                                                              | 16 |
| Figura 2— Estrutura e classificação dos surfactantes.....                                                                                                                                                                                 | 16 |
| Figura 3 — Fórmula molecular da surfactina.....                                                                                                                                                                                           | 20 |
| Figura 4 — Melaço de cana utilizado como substrato. ....                                                                                                                                                                                  | 26 |
| Figura 5 — <i>Bacillus pumilus</i> em Placa de Petri. ....                                                                                                                                                                                | 26 |
| Figura 6 — Perfil do pH ao longo cultivo do <i>Bacillus pumilus</i> em meio com melaço. ....                                                                                                                                              | 31 |
| Figura 7 — Teor de sólidos solúveis ao longo do cultivo do <i>Bacillus pumilus</i> em meio com melaço. ....                                                                                                                               | 32 |
| Figura 8 — Curva de crescimento e consumo de substrato do <i>Bacillus pumilus</i> em meio com melaço. ....                                                                                                                                | 32 |
| Figura 9 — Produção de biossurfactante por <i>Bacillus pumilus</i> em meio de melaço, avaliação por precipitação com ácido clorídrico ao longo do cultivo. ....                                                                           | 34 |
| Figura 10 — Índice de emulsificação ao longo do cultivo do <i>Bacillus pumilus</i> em meio com melaço. ....                                                                                                                               | 35 |
| Figura 11 — Índice de emulsificação do cultivo de <i>Bacillus pumilus</i> em meio com melaço, após 120 horas de cultivo, diferentes tipos de óleos. ....                                                                                  | 35 |
| Figura 12 — Extrato bruto do biossurfactante precipitado em diferentes condições: (a) Cultivo bruto por etanol (b) Cultivo sem células por etanol (c) Cultivo estéril por etanol (d) Cultivo estéril e bruto por precipitação ácida ..... | 36 |
| Figura 13 — Diferentes métodos de extração do biossurfactante em meio livre de células, meio estéril e caldo bruto. ....                                                                                                                  | 36 |
| Figura 14 — Tensão superficial em diferentes preparos de amostra. ....                                                                                                                                                                    | 37 |
| Figura 15 — Tensão superficial em diferentes concentrações do biossurfactante. ....                                                                                                                                                       | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                          |               |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabela 1 — Escala de equilíbrio hidrofílico-lipofílico e suas aplicações.....            | 15            |
| Tabela 2 — Classificação de biossurfactantes .....                                       | 19            |
| Tabela 3 — Composição do meio de cultura para pré inóculo .....                          | 27            |
| Tabela 4 — Caracterização físico-química do melaço de cana.....                          | 31            |
| Tabela 5 — Parâmetros cinéticos do cultivo do <i>Bacillus pumilus</i> em meio com melaço | <b>Error!</b> |

**Bookmark not defined.**

## SUMÁRIO

|   |                                                         |    |
|---|---------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO .....                                        | 11 |
| 2 | OBJETIVOS.....                                          | 14 |
|   | 2.1 Objetivo geral.....                                 | 14 |
|   | 2.2 Objetivos específicos .....                         | 14 |
| 3 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....                              | 15 |
|   | 3.1 Surfactantes .....                                  | 15 |
|   | 3.2 Biossurfactantes.....                               | 17 |
|   | 3.3 Classificação dos biossurfactantes .....            | 18 |
|   | 3.4 Propriedades de biossurfactantes.....               | 21 |
|   | 3.5 Microrganismos produtores de Biossurfactantes ..... | 22 |
|   | 3.5.1 <i>Bacillus pumilus</i> .....                     | 22 |
|   | 3.6 Melaço de cana .....                                | 23 |
|   | 3.7 Parâmetros cinéticos .....                          | 23 |
| 4 | METODOLOGIA .....                                       | 26 |
|   | 4.1 Caracterização do Substrato .....                   | 26 |
|   | 4.2 Microrganismo .....                                 | 26 |
|   | 4.3 Pré inóculo .....                                   | 27 |
|   | 4.4 Cultivo para produção de biossurfactante.....       | 27 |
|   | 4.4.1 Concentração celular .....                        | 27 |
|   | 4.4.2 Quantificação do substrato .....                  | 28 |
|   | 4.6 Índice de emulsificação .....                       | 28 |
|   | 4.7 Quantificação do biossurfactante produzido .....    | 29 |
|   | 4.8 Tensão Superficial .....                            | 29 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                             | 31 |
| 6 | CONCLUSÃO.....                                          | 39 |
|   | REFERÊNCIAS .....                                       | 40 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfipáticas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se distribuem em interfaces físicas. Essa combinação permite que os surfactantes reduzam as tensões superficiais e interfaciais e formem microemulsões, nas quais os hidrocarbonetos são solubilizados em água ou vice-versa (Sarubbo et al., 2022).

Esses compostos possuem vasta aplicabilidade industrial, sendo usados como agentes umectantes, detergentes, agentes espumantes, emulsificantes e dispersantes em uma variedade de produtos domésticos, como xampu, produtos de higiene pessoal, medicamentos e tintas (Eldos et al., 2024).

Os surfactantes químicos são derivados do petróleo ou de outras fontes não renováveis e apresentam desvantagens, como contaminação ambiental e baixa biodegradabilidade. Essas substâncias e seus subprodutos podem se acumular no ecossistema, formando camadas espessas de espuma que inibem a fotossíntese e a dissolução de oxigênio em corpos d'água que recebem efluentes de grandes cidades, além de possuírem alto teor de fosfato que é responsável pela eutrofização de lagos e rios (Nagtode et al., 2023).

Essas razões têm direcionado o interesse para os biossurfactantes como potenciais alternativas aos surfactantes químicos tradicionais (Sultan et al., 2025). Os biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por fontes biológicas, principalmente por bactérias, fungos e leveduras, que possuem diversas estruturas anfipáticas compostas por porções hidrofílicas e hidrofóbicas. Essa configuração os torna capazes de se auto-organizar na interface entre duas fases imiscíveis, como água e óleo (Aguirre-Ramírez et al., 2021).

Entre os microrganismos produtores de biossurfactantes, destacam-se os gêneros de bactérias *Pseudomonas*, *Actinobacteria*, *Bacillus*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* (Mulugeta et al., 2021). Os biossurfactantes podem ser obtidos por meio de reações enzima-substrato e processos de fermentação, bem como sintetizados extracelularmente usando enzimas biocatalíticas. Tanto a porção hidrofóbica quanto a porção hidrofílica dos biossurfactantes podem ser sintetizadas em duas vias independentes: ambas as porções podem ser dependentes do substrato, ou uma pode ser sintetizada de novo enquanto a outra é induzida pelo substrato (Bjerk et al., 2021).

Além de serem produtos naturais, gerados de forma sustentável e ambientalmente benignos, os biossurfactantes oferecem diversas vantagens potenciais em relação aos surfactantes químicos, incluindo excelente seletividade, biodegradabilidade,

biocompatibilidade, biodisponibilidade, aceitabilidade ecológica e maior eficiência em condições com altas temperaturas e concentrações de sal (Thakur et al., 2024).

Apesar desses atributos promissores, os altos custos de produção e os baixos rendimentos continuam sendo os principais desafios para a comercialização em larga escala. Como na maioria dos bioprocessos, a etapa de *downstream* representa a maior parte do custo de produção, que se concentra nos processos de extração e purificação. Mitigar essas dificuldades requer alternativas como otimização das cepas microbianas, utilização de substratos renováveis e de baixo custo, melhoria das condições fermentativas e desenvolvimento de processos de separação baratos e eficazes (Das; Rao, 2024; Gulati; Ahmad; Bhatia, 2025).

Microrganismos capazes de utilizar diferentes resíduos agroindustriais como substratos proporcionam uma solução ecológica e econômica para o gerenciamento de resíduos e a produção de biossurfactantes. Além disso, substratos ricos em fontes de carbono facilmente assimiláveis, como açúcares, ácidos graxos ou glicerol, e com baixo teor de impurezas podem favorecer o metabolismo microbiano, aumentando a produtividade e minimizando a necessidade de suplementação adicional (Pandit; Meena, 2025).

O melaço pode ser produto ou um subproduto da indústria da cana-de-açúcar, quando obtido da produção de açúcar. É uma alternativa interessante como substrato para a produção de biossurfactantes, devido ao seu baixo custo em comparação com outras fontes de açúcar e à presença de compostos nutritivos além da sacarose. Os componentes do melaço, como minerais, compostos orgânicos e vitaminas, também se mostraram valiosos para processos de fermentação (Allen et al., 2023).

Estudos recentes mostram o potencial de substratos renováveis na produção de biossurfactantes, com o objetivo de aumentar o rendimento e diminuir custos de produção. Verma e colaboradores (2020) produziram biossurfactante utilizando uma cepa isolada de *Bacillus subtilis* RS, usando melaço de cana como fonte de carbono. Gulati e colaboradores (2025) produziram biossurfactante a partir da cepa *Pseudomonas mendocina* 7094, usando substratos de baixo custo. Susetyo e colaboradores (2024) produziram biossurfactante através da cepa *Bacillus subtilis* BK7.1, usando resíduos de melaço combinados com glicose.

A produção de biossurfactantes vem sendo investigada no grupo de estudos liderado pela professora Sharline como o de Oliveira et al. (2025), que comparou a produção de biossurfactantes por cepas de *Bacillus subtilis* UFPEDA 16, *B. subtilis* UFPEDA 86 e *B. pumilus*, em meios contendo caldo de cana e óleo de abacate ou óleo de soja residual. Os

resultados mostraram que a cepa *B. pumilus* apresentou percentuais de emulsificação mais expressivos atingindo valores de 65,21% e 66,19%.

Baptista (2024) avaliou a produção de biossurfactantes em meios de cultivo contendo caldo e melaço de cana e o meio comercial caldo nutriente para o crescimento da bactéria *Bacillus pumilus*. O meio contendo melaço foi o que mais favoreceu o crescimento de células, quando comparado aos outros dois.

Nesse contexto, a produção de biossurfactantes através de rotas sustentáveis e economicamente viáveis, consolida-se como atividade promissora que almeja alcançar a viabilização industrial desse produto, valorizando o uso de recursos renováveis como alternativa para uma produção ecologicamente favorável.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar cinética de crescimento e produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* em meio com melaço de cana, bem como a melhor forma de separação por precipitação do biossurfactante produzido.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o melaço de cana quanto ao teor de sólidos solúveis, pH, açúcares redutores e açúcares redutores totais.
- Avaliar a cinética de crescimento do *Bacillus pumilus* através das análises de concentração celular, consumo de substrato, teor de sólidos solúveis e pH durante a cultivo.
- Avaliar os parâmetros cinéticos do cultivo, produtividade, fatores de conversão, tempo de geração, velocidade de crescimento e velocidade de crescimento específica.
- Avaliar a cinética de produção do biossurfactante através das análises de índice de emulsificação, tensão superficial, e concentração.
- Avaliar a melhor forma de separação por precipitação com ácido clorídrico 6N ou etanol.

3      **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

**3.1 Surfactantes**

Os surfactantes são compostos de moléculas anfipáticas que contêm porções polares (hidrofílicas) e apolares (hidrofóbicas). A porção apolar geralmente consiste em uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto a porção polar pode ser iônica, não iônica ou anfotérica. Essa configuração permite que esses compostos consigam diminuir a tensão superficial e formar emulsões entre líquidos imiscíveis (Thakur et al., 2024).

Existem dois parâmetros importantes que influenciam a atuação dos surfactantes, o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) e a concentração micelar crítica (CMC). O HLB refere-se à harmonia entre as porções polares e apolares em uma molécula de surfactante. Existe uma escala de HLB que varia de 0 a 20 (Tabela 1). Surfactantes com baixo HLB geralmente formam emulsões água-em-óleo, enquanto moléculas com alto HLB contribuem para a formação de emulsões inversas (Tracy; Dasgupta; More, 2023).

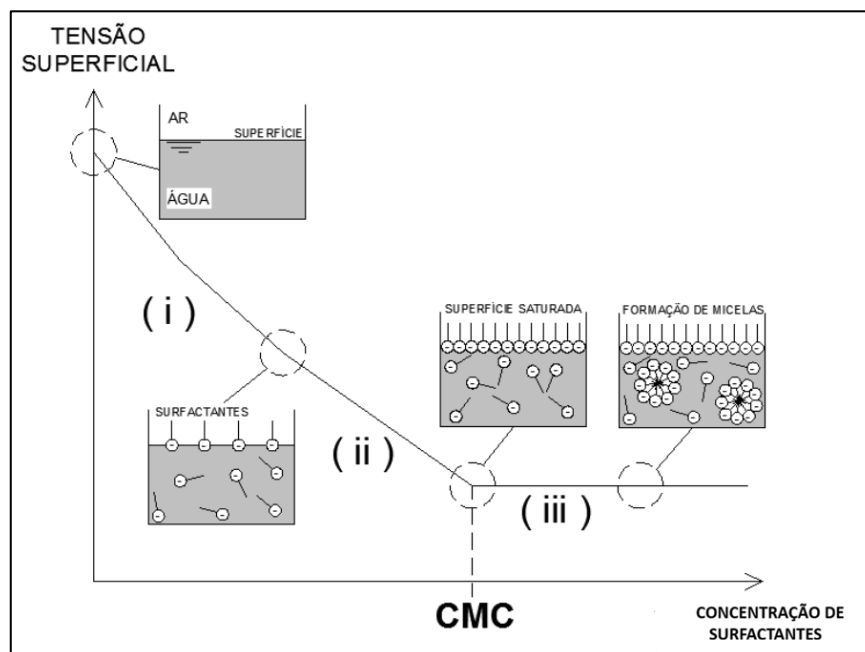
Tabela 1 — Escala de equilíbrio hidrofílico-lipofílico e suas aplicações

| Escala HLB | Aplicações              |
|------------|-------------------------|
| 4-6        | Emulsificante água/óleo |
| 7-9        | Agente umectante        |
| 8-18       | Emulsificante óleo/água |
| 13-15      | Detergente              |
| 15-18      | Solubilizante           |

Fonte: Barbosa et al. (2022)

A concentração micelar crítica (CMC) é definida como a concentração de surfactante na qual a formação de micelas é observada pela primeira vez na solução (Figura 1). Os valores de CMC estão relacionados à estrutura das moléculas. A adição de surfactante diminui a energia interfacial na solução e elimina os grupos hidrofóbicos da superfície do surfactante em contato com a água. Em vez disso, a energia livre do sistema diminui. Quando a concentração do surfactante aumenta na solução, as moléculas do surfactante começam a se aglomerar com outras moléculas e formam micelas. A formação de micelas diminui drasticamente a energia livre da solução, reduzindo a interação entre os grupos hidrofóbicos e o surfactante, e a concentração do surfactante atinge a CMC (Inamuddin; Rajender Boddula; Asiri, 2020).

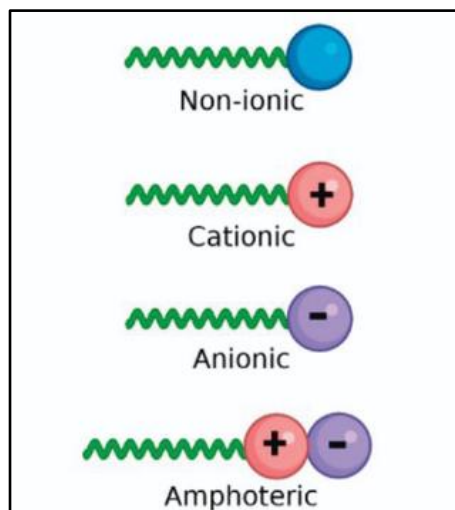
Figura 1 — Concentração micelar crítica



Fonte: Adaptado de Antoniazzi et al. (2020)

Os surfactantes sintéticos podem ser classificados em não iônicos e iônicos. Os surfactantes iônicos são ainda subclassificados em surfactantes aniônicos, catiônicos e anfotéricos com base na polaridade dos anfifílicos dissociados em um meio aquoso (Figura 2). Os surfactantes não iônicos não apresentam dissociação em meio aquoso devido à presença de grupos hidrofílicos não dissociáveis, como álcoois, ésteres, amidas, etc. Por não produzirem íons em água, são menos sensíveis à presença de eletrólitos. Esses surfactantes são adequados para detergentes, agentes espumantes, agentes umectantes e emulsificantes (Raj; Ramamurthy, 2024).

Figura 2— Estrutura e classificação dos surfactantes.



Fonte: Cortés et al. (2021)

Os surfactantes aniônicos possuem uma parte hidrofóbica, uma cadeia alquílica de comprimento variável e uma parte hidrofílica que adquire uma carga negativa em soluções aquosas. Por serem carregados negativamente, interagem com cargas positivas no ambiente. São comumente usados na síntese de óxidos metálicos, em sensores eletroquímicos para modificar o eletrodo e em baterias de lítio para aumentar a capacidade de descarga e proporcionar eficiência energética (Unal et al., 2023)

Os surfactantes catiônicos são agentes tensoativos com carga positiva, tipicamente compostos por grupos de amônio quaternário. Esses compostos são propensos à precipitação e adsorvem-se facilmente, formando um filme na superfície de formações rochosas com carga negativa, o que limita seu uso (Fu et al., 2022). A maioria dos surfactantes catiônicos não pode ser descartada em ambientes marinhos devido à sua não biodegradabilidade e aos consequentes problemas ambientais. Além disso, os surfactantes catiônicos são caros e exigem altas concentrações para serem eficazes (Tamjidi et al., 2021).

Os surfactantes anfotéricos possuem dois ou mais grupos ionizáveis com cargas opostas na mesma molécula. Como resultado, podem apresentar carga líquida neutra, negativa ou positiva, dependendo do pH da solução. As principais vantagens incluem maior atividade superficial, alta biodegradabilidade, alta estabilidade da espuma, baixa irritação e toxicidade, menor concentração micelar crítica (CMC) e maior solubilidade em água. No entanto, esses tipos de surfactantes costumam ser caros em comparação a outras classes (Mushtaq et al., 2023)

A aplicação industrial dos surfactantes passa por diversos setores. Na indústria farmacêutica, os surfactantes são usados para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de ingredientes farmacêuticos ativos, onde muitos medicamentos são pouco solúveis em água, o que limita sua eficácia terapêutica. Na área da engenharia, os surfactantes desempenham um papel vital no aumento da recuperação de petróleo em reservatórios. Ao reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a água, os surfactantes facilitam a mobilização do óleo aprisionado em formações rochosas porosas. Além disso, nos últimos anos, os surfactantes têm recebido crescente atenção por sua eficácia na remediação de solos e águas contaminadas com poluentes perigosos (Batoool et al., 2025).

### **3.2 Biosurfactantes**

Os biosurfactantes são amplamente vistos como uma alternativa aos surfactantes sintéticos que são derivados do petróleo. Sua aplicação e a proporção do mercado total de surfactantes têm aumentado nos últimos 15 anos e atualmente representam cerca de 10% da produção mundial total de surfactantes (aproximadamente dez milhões de toneladas por ano).

Esses surfactantes naturais têm aplicações nas indústrias de petróleo, alimentos, farmacêutica, médica, agrícola e civil (Sarubbo et al., 2022).

Os tamanhos e formatos dos segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos dos surfactantes são responsáveis por diversas de suas propriedades. Algumas dessas propriedades incluem a redução das tensões superficiais e interfaciais, dispersão e agregação de sólidos, ação espumante e antiespumante, emulsificação e interações sinérgicas com outros surfactantes (Vieira et al., 2021)

A porção hidrofílica dos biossurfactantes pode ser um ácido, cátion, peptídeo, ânion ou uma variedade de mono, di ou polissacarídeos, a porção hidrofóbica pode ser uma cadeia de ácido graxo, saturado ou insaturado. Embora apresentem uma ampla variedade de alterações estruturais, esses compostos podem ser categorizados com base em sua composição química e sua origem microbiana (Sarubbo et al., 2022).

### **3.3 Classificação dos biossurfactantes**

Os biossurfactantes microbianos são classificados em duas categorias: de baixo peso molecular (BPM), como glicolipídios e lipopeptídeos; e compostos poliméricos de alto peso molecular (APM), como polissacarídeos, proteínas ou formas combinadas de lipoproteínas ou lipopolissacarídeos (Jahan et al., 2020). Além disso, alguns autores utilizam a classificação dividida em cinco grupos principais de moléculas que compõe a estrutura do surfactante (Tabela 2): Glicopeptídeos, Lipopeptídeos, Ácidos Graxos e Fosfolipídios, Surfactantes poliméricos e Surfactantes particulados.

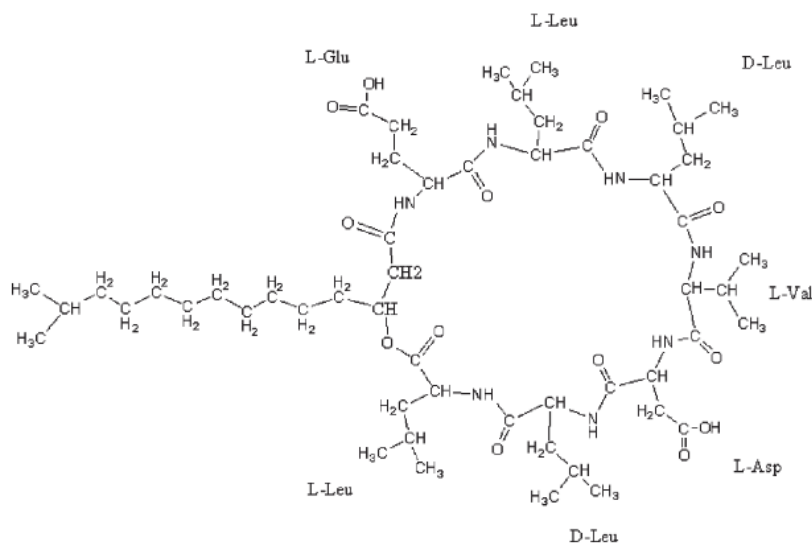
Tabela 2 — Classificação de biossurfactantes

| Tipos de surfactantes                           | Microrganismos                                             |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Glicopeptídeos                                  |                                                            |
| Ramnolipídeos                                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                              |
| Soforolipídeos                                  | <i>Totulopsis bombicola</i><br><i>T. apícola</i>           |
| Trehalolipídeos                                 | <i>Rhodococcus erythropolis</i><br><i>Mycobacterium sp</i> |
| Lipopeptídeos e Lipoproteínas                   |                                                            |
| Peptídeo-lipídeo                                | <i>Bacillus licheniformis</i>                              |
| Viscosina                                       | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                             |
| Serravetina                                     | <i>Serratia marcescens</i>                                 |
| Subtilisina                                     | <i>Bacillus subtilis</i>                                   |
| Surfactina                                      | <i>Bacillus subtilis</i>                                   |
| Gramicidina <i>Bacillus polymyxa</i>            | <i>Bacillus brevis</i>                                     |
| Polimixina                                      | <i>Bacillus polymyxa</i>                                   |
| Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos |                                                            |
| Ácidos graxos                                   | <i>Corynebacterium lepus</i>                               |
| Lipídeos neutros                                | <i>Nocardia erythropolis</i>                               |
| Fosfolipídeos                                   | <i>Thiobacillus thiooxidans</i>                            |
| Surfactantes poliméricos                        |                                                            |
| Emulsan                                         | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                         |
| Biodispersan                                    | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                         |
| Liposan                                         | <i>Candida lipolytica</i>                                  |
| Carboidrato-lipídeo-proteína                    | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                             |
| Manana-lipídeo-proteína                         | <i>Candida tropicalis</i>                                  |
| Surfactantes particulados                       |                                                            |
| Vesículas                                       | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                         |
| Células                                         | Várias bactérias                                           |

Fonte: Desai e Banat (1997)

Os glicolipídios são constituintes essenciais das membranas celulares com inúmeras funções, podendo atuar como receptores, serem importantes para a agregação e dissociação celular, e podem ser responsáveis pelo contato celular específico e pela transdução de sinais (Moran, 2009). Os glicopeptídeos são o tipo mais comum de biossurfactantes, pois são compostos anfipáticos naturalmente presentes em vários organismos. Em escala industrial, são produzidos por processos de fermentação; alguns exemplos de biossurfactantes glicolipídicos já comercializados são os soforolipídios, os ramnolipídios e os lipídios de manosileritritol. Eles são derivados de espécies bacterianas como *Pseudomonas sp.* e *Bacillus sp.*, ou leveduras como *Candida bombicola*. Esses biossurfactantes são aplicados nas indústrias cosmética e de detergentes como emulsificantes, solubilizantes, agentes umectantes, espumantes e dispersantes (Vega; Stampino, 2025)

Figura 3 — Fórmula molecular da surfactina



Fonte: Barros et al. (2007)

Os lipopeptídeos compõem o segundo maior grupo de biossurfactantes e são moléculas formadas por uma cadeia lipídica ligada a uma cadeia peptídica. Anficina, surfactina, fexxina, iturina, liquenicina e viscosina são os lipopeptídeos cíclicos mais conhecidos. A surfactina (Figura 3) se distingue dos demais pela sua capacidade de diminuir a tensão superficial da água em cerca de 40 unidades (Hsu et al. 2025) *Bacillus subtilis* é a principal bactéria utilizada na produção de surfactina.

Outros tipos de biossurfactantes de baixo peso molecular são os fosfolipídios, abundantes nas membranas celulares. Nos fosfolipídios estão presentes grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Em um meio enriquecido com n-alcenos, muitos tipos diferentes de leveduras e bactérias produzem ácidos graxos e fosfolipídios (Das; Rao, 2023)

Dentre os biossurfactantes de alto peso molecular, destacam-se os biossurfactantes poliméricos. O Alasan e o Emulsan são alguns dos exemplos mais conhecidos, ambos gerados por espécies de *Acinetobacter*. Alasan é um complexo aniônico de heteropolissacarídeo e proteína contendo proteínas ricas em alanina, sendo amplamente utilizado como emulsificante e solubilizante. O Emulsan é formado por lipopolissacarídeos aniônicos e proteína e é um excelente estabilizador de emulsões em baixas concentrações (Vega; Stampino, 2025; Jahan et al., 2020)

Os biossurfactantes de baixo peso molecular são amplamente utilizados na redução da tensão superficial e interfacial de líquidos. Em contraste, os biossurfactantes de alto peso

molecular são mais utilizados como agentes estabilizadores em emulsões óleo/água (Ferreira, 2024)

### 3.4 Propriedades de biossurfactantes

Os biossurfactantes possuem diversas propriedades físico-químicas, compreender essas propriedades é necessário para uma aplicação prática bem-sucedida.

- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h e pH entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (Nitschke; Pastore, 2002)
- Atividade superficial e interfacial: Essa estrutura molecular única permite que os surfactantes tenham a capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais entre várias fases: líquido-sólido, líquido-ar e líquido-líquido. A extensão desta redução depende da estrutura molecular dos surfactantes e da concentração. A organização molecular dos surfactantes, ou seja, as micelas, ocorre em uma concentração específica, conhecida como concentração micelar crítica (CMC). Essa concentração reflete o ponto em que o surfactante tem sua menor tensão superficial estável (Dini et al., 2024)
- Especificidade: por se tratarem de moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais bastante específicos, os biossurfactantes também terão sua especificidade em relação às suas ações. Essa propriedade confere sua importância na detoxificação de poluentes específicos em dadas aplicações, principalmente nas indústrias farmacêutica, cosmética ou mesmo alimentícia (Farias et al., 2021; Marinho; Silva; Luna, 2022)
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros microrganismos microscópicos tanto na água quanto no solo, os tornando convenientemente apropriados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos (Marinho; Silva; Luna, 2022)
- Além de outras propriedades como baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade, emulsificação e desmemulsificação, adsorção, propriedade de dispersão e potencial de redução da viscosidade (Mnif; Ellouz-Chaabouni; Ghribi, 2017).

### 3.5 Microrganismos produtores de Biosurfactantes

Microrganismos de diversos habitats, incluindo solo, ambientes marinhos e ecossistemas extremos, têm demonstrado potencial promissor para a produção de biosurfactantes. Esses surfactantes microbianos são produzidos por vários microrganismos, incluindo leveduras, bactérias e fungos. As bactérias se destacam, em comparação aos fungos, nas pesquisas de produção de biosurfactantes. Entre alguns dos gêneros mais estudados estão as *Pseudomonas*, *Actinobacteria*, *Sphingomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Alcanivorax* e *Rhodococcus* (Thakur et al., 2024)

Os biosurfactantes possuem estruturas distintas, podendo ser formados por tipos de cadeias diferentes (peptídicas, polipeptídicas, proteínas). A Tabela 2 resume, além da classificação estrutural, as espécies de microrganismos que produzem cada tipo de surfactante.

Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* destacam-se como maiores produtores de biosurfactantes (Eras-Munõz et al., 2022) e aparecem frequentemente em ensaios científicos. Rather e colaboradores (2025) conduziram um estudo onde bactérias degradadoras de petróleo e produtoras de biosurfactantes foram isoladas de amostras de solo e água contaminadas com petróleo bruto, onde a cepa *Pseudomonas aeruginosa* MAR1 demonstrou produção superior de biosurfactantes e degradação de petróleo bruto. Zhao e colaboradores (2024) exploraram estratégias e mecanismos da bactéria *Bacillus subtilis* YZQ-2 na produção de biosurfactantes lipopeptídicos utilizando óleo de cozinha usado como matéria-prima. Jeong e colaboradores (2025) utilizaram biosurfactante de *Bacillus velezensis* GJ1 para desenvolver um detergente antibacteriano ecológico com baixa toxicidade e poucos componentes.

#### 3.5.1 *Bacillus pumilus*

*Bacillus pumilus* é uma bactéria formadora de esporos, encontrada em vários tipos de ambientes, como solo, água, ar e tecidos vegetais em decomposição. Essa bactéria é amplamente utilizada em processos industriais, fabricação de alimentos fermentados, tratamento de água e de ambientes contaminados (Monnerat et al., 2020).

Assim como outras cepas de *Bacillus*, o genoma de *Bacillus pumilus* contém um número substancial de genes envolvidos na síntese de compostos antimicrobianos, incluindo antibióticos, bacteriocinas e lipopeptídeos. *B. pumilus* produz um lipopeptídeo cíclico, a pumilacidina, que possui atividades antivirais, antimicrobianas, antibiofilme e antimotilidade. (Huang et al., 2026).

Biossurfactantes produzidos por *Bacillus pumilus* em amostra isolada a partir de resíduos de óleo, demonstraram ser esta bactéria um agente promissor para aplicação ambiental (Calvo et al., 2008; Oliveira, 2010).

### 3.6 Melaço de cana

A produção mundial de cana é de aproximadamente 1.700 milhões de toneladas anualmente em 24 milhões de hectares em todo o mundo. O maior produtor é o Brasil, com 720 milhões de toneladas e 40% do cultivo em todo o mundo, com os estados de São Paulo e Paraná liderando o ranking (Food Chain, 2019).

O melaço, um subproduto da produção de açúcar, é um líquido denso e viscoso de cor marrom escuro, rico em açúcares e com um pequeno teor de água. Recebe diferentes nomes de acordo com a região, como mel exaurido, mel pobre, mel final, mel residual ou simplesmente melaço. Sua densidade varia de 1,4 a 1,5 g/mL e sua produtividade é de 40 kg/ton de cana-de-açúcar (Santos; Borém; Caldas, 2015)

A composição média do melaço de cana é rica em açúcares fermentáveis essenciais para nutrição microbiana. Palmonari e colaboradores (2020) analisaram a composição de 16 amostras de cana-de-açúcar de diferentes lugares do mundo, foi observado um teor médio de 48,8% de sacarose, 8,1% de glicose e 5,3% de frutose. Por seu baixo custo, alta disponibilidade e elevado teor de açúcares, esta matéria-prima vem sendo empregada como substrato para diferentes tipos de fermentação.

### 3.7 Parâmetros cinéticos

A partir dos dados experimentais obtidos durante o processo de fermentação, é possível determinar a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), a produtividade em células ( $P_x$ ), o tempo de geração ( $t_g$ ) e o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ). Para determinar a velocidade de crescimento dos microrganismos utiliza-se a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) (Equação 1) (Schmidell et al., 2001).

$$\mu_x = \frac{1}{t} \cdot \frac{X - X_0}{X_0} \quad (1)$$

Em que:

dX/dt: variação entre a concentração final (X) e inicial ( $X_0$ ) de biomassa em função da variação de tempo (t) [g.L<sup>-1</sup> .h<sup>-1</sup>];

X: concentração de biomassa celular no instante t [g.L<sup>-1</sup> ]

$\mu$ : velocidade específica de crescimento celular [h<sup>-1</sup> ]

Durante a fase exponencial de crescimento microbiano, a velocidade específica é máxima e constante ( $\mu_{x,max}$ ). O  $\mu_{x,max}$  pode ser estimado pela linearização dos valores de concentração celular durante a fase exponencial. A partir do valor de  $\mu_{x,max}$  pode-se estimar também o tempo de geração da linhagem durante o cultivo que é dado pela Equação 2 (Schmidell et al., 2001)

$$\mu = \frac{\ln(2)}{t_g} \quad (2)$$

Em que:

Ln(2): Logaritmo natural do número 2

$t_g$ : tempo de geração da linhagem microbiana [h];

$\mu$ : velocidade específica de crescimento celular [h<sup>-1</sup> ]

Para avaliar o processo em relação a produtividade em célula, utiliza-se a Equação 3, sendo possível observar que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo final de cultivo ( $t_f$ ) (Schmidell et al., 2001).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_f}{X_0}\right)}{t_f} \quad (3)$$

Em que:

$X_m$ : concentração máxima de células [g.L<sup>-1</sup> ];

$X_0$ : concentração inicial de células [g.L<sup>-1</sup> ];

$t_f$  : tempo final de cultivo [h].

Também é possível quantificar no cultivo o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ), descrito por Schmidell et al. (2001) sendo expresso na Equação 4, onde X e S representam a concentração de biomassa e substrato, respectivamente.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

Em que:

$X_0$ : concentração inicial de biomassa microbiana [g.L<sup>-1</sup>]

$X$ : concentração final de biomassa microbiana [g.L<sup>-1</sup>]

$S$ : concentração final de substrato [g.L<sup>-1</sup>]

$S_0$ : concentração inicial de substrato [g.L<sup>-1</sup>]

$\square\square/\square$  : fator de conversão de substrato em células [g<sub>x</sub>.g<sub>s</sub><sup>-1</sup>]

De forma semelhante, é possível calcular o fator de conversão de substrato em produto, de acordo com a Equação 5, onde  $P_0$  e  $P$  correspondem aos valores de concentração final e inicial do produto:

$$Y_{P/S} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \quad (5)$$

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Caracterização do Substrato

O melaço de cana utilizado (Figura 4) para composição dos meios foi adquirido em supermercado local e analisado quanto ao teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, quantidade de açúcares redutores e açúcares redutores totais conforme descrito no item 4.4.2.

Figura 4 — Melaço de cana utilizado como substrato.



Fonte: Autor (2026)

### 4.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Bacillus pumilus*, cedida pelo Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba e isoladas por Padilha (2014), do solo cultivado de cana de açúcar da Usina Japungu Agroindustrial S.A, localizada no município de Santa Rita, Paraíba. A partir disso, foi realizado repique em meio ágar nutriente para manutenção do microrganismo (Figura 5).

Figura 5 — *Bacillus pumilus* em Placa de Petri.



Fonte: Autor (2026)

### 4.3 Pré inóculo

O pré inóculo foi feito em duplicata, passando-se 3 alçadas da biomassa da Placa de Petri para erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio. A composição do meio contendo melaço de cana está ilustrada na Tabela 3, proposta por Oliveira (2021), que produziu biossurfactante por *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* avaliando diferentes substratos. O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 105°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm por 24 horas.

Tabela 3 — Composição do meio de cultura para pré inóculo

| Componente                   | Concentração (g/L) |
|------------------------------|--------------------|
| Melaço de cana               | 20                 |
| Extrato de levedura          | 1                  |
| Fosfato Monopotássico        | 3                  |
| Fosfato de Potássio Dibásico | 7                  |

Fonte: Oliveira (2021)

### 4.4 Cultivo para produção de biossurfactante

O cultivo para produção de biossurfactante foi realizado em frascos erlenmeyers de 2 L, contendo 1098 mL de meio previamente esterilizado (Tabela 3) e inoculado com um volume de 10% do inóculo. Após isso, foi incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm por 120 h. O experimento foi feito em triplicata.

#### 4.4.1 Concentração celular

O crescimento celular foi determinado pela medida da densidade óptica sob comprimento de onda 600 nm através de Leitora de Microplacas ELISA DR-200BS-NM. Ao final do cultivo, foram realizadas diversas diluições com o objetivo de construir a curva de calibração que relaciona os valores de absorbância com a concentração de biomassa. Além disso, foram medidos pH e teor de sólido solúveis ao longo do cultivo.

Ao final do cultivo, uma alíquota de 2 mL da suspensão de células foi colocada em tubo previamente seco e pesado, e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi seco em estufa a 105 °C por 24 h. Após isso, o tubo foi resfriado em dessecador por 15 min e pesado. Esse procedimento foi

realizado em quintuplicata. A concentração em  $\text{g.L}^{-1}$  da amostra foi obtida de acordo com a Equação 7 segundo metodologia de Schmidell et al. (2001). Com a concentração de biomassa, pode-se estabelecer a relação entre as medidas de absorbância e a concentração celular em  $\text{g/L}$ .

#### 4.4.2 Quantificação do substrato

Para determinação dos açúcares redutores totais utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) proposto por Miller (1959) e adaptado por Vasconcelos (2013), que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A metodologia consiste em misturar 1 mL da amostra com 1 mL de solução de ácido clorídrico 2N, colocar o tubo em banho com água fervente por cinco minutos, resfriar em banho de água gelada. Depois de frio adicionar 2 mL de hidróxido de sódio 2 N, homogeneizar bem. Em seguida, em tubo de ensaio acrescentar 0,5 mL amostra e 0,5 mL de DNS. Os tubos devem ser agitados em vórtex e levados ao banho-maria a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, sendo resfriados posteriormente. Após isso, adicionar 4 mL de água destilada ao tubo de ensaio e proceder a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A curva de calibração do reagente foi usada para determinar o valor de ART em unidades de concentração massa/volume, de acordo com a Equação 5:

$$\text{ART} (\text{mg}/\text{mL}) = \frac{\text{Abs} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{padrão}}} \times \text{Conc}_{\text{padrão}} \times 4 \times \frac{1}{\text{V}_{\text{amostra}}}$$

$$\text{ART} (\text{mg}/\text{mL}) = \frac{\text{Abs} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{padrão}}} \times \text{Conc}_{\text{padrão}} \times 4 \times \frac{1}{\text{V}_{\text{amostra}}} \quad (5)$$

#### 4.6 Índice de emulsificação

Para o índice de emulsificação, determinado apenas nos tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 80, 96, 108 e 120 h, foi utilizado o método descrito por Cooper e Goldberg (1987), utilizando a razão de amostra de óleo na proporção de 2:3, em volume. A análise consistiu em misturar 2 mL do sobrenadante do meio livre de células a 3 mL de óleo vegetal, em tubos de ensaio de 10 mL que, posteriormente, foram agitados vigorosamente em agitador magnético por 1 min e deixados em temperatura ambiente por 24 h.

O índice de emulsificação é, então, determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100, conforme Equação 6:

$$\text{IE}_{24} = \frac{\text{Alt}_{\text{emulsão}}}{\text{Alt}_{\text{total}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde: IE<sub>24</sub> = Índice de emulsificação após 24 h (%)

H<sub>E</sub> = Altura emulsificada (cm)

H<sub>T</sub> = Altura total (cm)

Durante o cultivo, o IE<sub>24</sub> foi determinado usando óleo de soja. As amostras que demonstraram as melhores emulsões foram analisadas também usando óleo de girassol, óleo mineral, óleo de babaçu e óleo de motor, seguindo a metodologia acima.

#### 4.7 Quantificação do biosurfactante produzido

Para a obtenção da curva de concentração de biosurfactante, foi realizado o método da precipitação ácida associado ao método gravimétrico, em que foi adicionado 10 mL de meio de cultivo livre de células a um tubo de 50 mL, previamente pesado. Já no tubo, foi realizada a precipitação ácida, onde o meio de cultivo livre de células foi acidificado, com HCl 6N, até pH 2 e mantido overnight a 4 °C. Em seguida, o meio acidificado foi centrifugado a 4000 rpm, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi levado a estufa (OLIDEFCZ) a 80 °C por 24 h. Em seguida, o pellet livre de umidade foi pesado. O peso seco foi determinado de acordo com a Equação 7:

$$\text{Concentração (g/L)} = \frac{(\text{Peso seco} + \text{Peso do meio})}{\text{Volume do meio}} \quad (7)$$

Das amostras contendo a melhor concentração de biosurfactante produzido, foi realizado a precipitação ácida com meio estéril e caldo bruto e a precipitação por etanol, onde o biosurfactante foi separado do meio sem células, esterilizado e do caldo bruto por precipitação com etanol absoluto (1:2) a 4 °C por 24 h, centrifugado e seco em estufa a 40 °C, em tubos Falcons de 50 mL. Assim, foi possível estabelecer o método de extração mais eficiente. Após a secagem, os tubos foram pesados e a concentração do extrato bruto de biosurfactante foi determinada usando a Equação 7. Um comparativo foi feito em uma amostra controle do meio sem adição de microrganismos.

#### 4.8 Tensão Superficial

As análises de tensão superficial foram determinadas em tensiômetro Sensadyne, (QC6000 – SensaDyne Instruments), a 25°C, em amostras. No método utilizado neste equipamento, as medidas de tensão superficial são efetuadas através do diferencial de pressão

máxima na formação de bolha durante o borbulhamento lento de nitrogênio, que atua como gás inerte, através de dois capilares de diferentes diâmetros posicionados na mesma profundidade em uma amostra de cerca de 40 mL. O método se faz uso do princípio que a tensão superficial é diretamente proporcional a esse diferencial de pressão (Rapp, 2017).

Foi medida a tensão superficial no tempo inicial da fermentação, nas 24 h e ao final do cultivo, com diferentes preparos de amostras: meio sem células, caldo bruto e meio esterilizado. Além disso, a concentração micelar crítica (CMC) foi determinada medindo-se a tensão superficial de soluções com diferentes concentrações do extrato bruto do biossurfactante produzido.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização físico-química do melaço de cana (Tabela 4) demonstrou o potencial do produto como substrato na fermentação, apresentando 0,74 g de açúcares redutores por grama de melaço e 0,93 g de açúcares redutores totais por grama de melaço. Com essa determinação, foi possível calcular a quantidade de melaço nos cultivos em termos de ART.

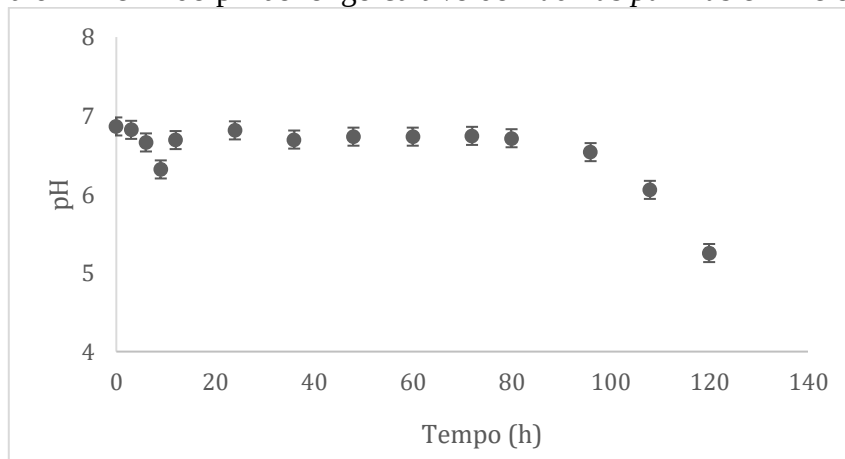
Tabela 4 — Caracterização físico-química do melaço de cana.

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| pH                               | 3,11 |
| Teor de sólidos solúveis (°Brix) | 80,8 |
| AR (g/g de melaço)               | 0,74 |
| ART (g/g de melaço)              | 0,93 |

Fonte: Autor (2026)

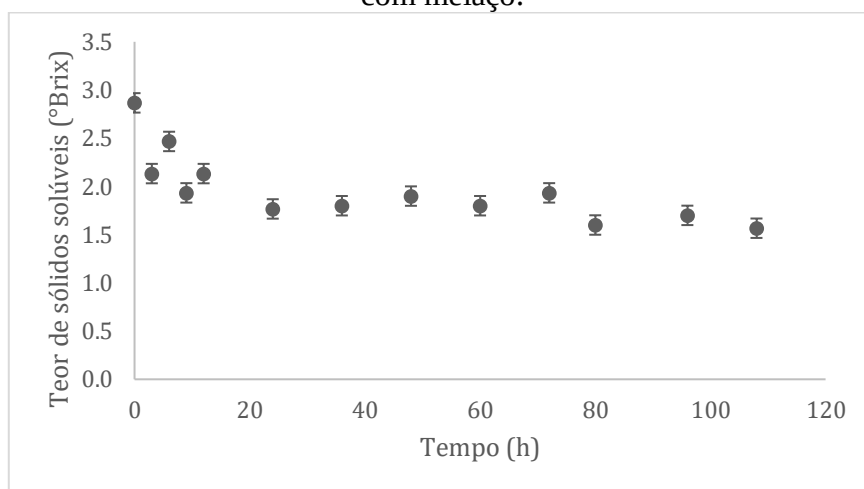
O comportamento do pH e do teor de sólidos solúveis ao longo do cultivo pode ser visualizado na Figura 6 e 7, respectivamente. O pH do cultivo se manteve próximo a neutralidade na maior parte do tempo. Um pH ente 7 e 8 é especificamente observado como fator que leva a uma maior taxa de produção de surfactantes em culturas de *Bacillus* (Ravichandran; Sonbhadra; Pandey, 2026). Xiao e colaboradores (2026) estudaram o crescimento da cepa *Bacillus pumilus* M em diferentes condições de pH para avaliar seu potencial como biorremediador, o crescimento celular foi bem sucedido entre os valores de pH de 6 a 9. O pH do presente trabalho ficou dentro do intervalo ideal para fermentação com *B. pumilus*.

Figura 6 — Perfil do pH ao longo cultivo do *Bacillus pumilus* em meio com melaço.



Fonte: Autor (2026)

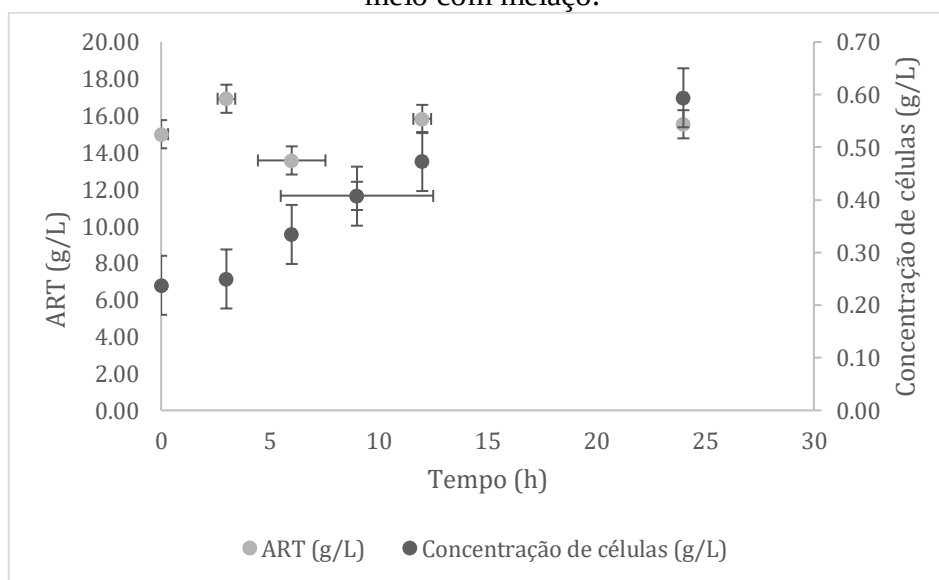
Figura 7 — Teor de sólidos solúveis ao longo do cultivo do *Bacillus pumilus* em meio com melaço.



Fonte: Autor (2026)

O teor de sólidos solúveis diminuiu ao longo do tempo de fermentação. A curva desses valores manteve um comportamento esperado à medida que o microrganismo cresce e metaboliza suas fontes de carbono. A curva de crescimento celular, recortada para evidenciar as fases lag e exponencial, pode ser vista na Figura 8.

Figura 8 — Curva de crescimento e consumo de substrato do *Bacillus pumilus* em meio com melaço.



Fonte: Autor (2026)

Com os valores de concentração de células e tempo, foi possível calcular a velocidade específica máxima do cultivo, integrando a Equação 1 e obtendo uma expressão que relaciona a velocidade específica com a concentração de células. Feito isso e aplicando aos dados experimentais, foi possível visualizar o valor da velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) de 0,219

$\text{h}^{-1}$ . Esse parâmetro traduz a velocidade de reprodução do microrganismo e pode variar de acordo com a sua interação com as condições do cultivo.

Datta, Tiwari e Pandey (2020) produziram biossurfactante por *Bacillus tequilensis* MK 729017 isolado de um solo de reservatório petrolífero, a velocidade de crescimento específica atingida foi de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , em cultivo com meio Luria-Bertani. Hiller e colaboradores (2024) estudaram a cinética de produção de biossurfactante pela cepa *B. subtilis* BMV9, utilizando diferentes taxas de crescimento e obtiveram a melhor produção de surfactina com a velocidade específica de  $0,25 \text{ h}^{-1}$ . Ambos os valores se assemelham aos relatados no presente trabalho, com um tempo de geração associado de aproximadamente 3 horas (Tabela 5).

Tabela 5 — Parâmetros cinéticos do cultivo do *Bacillus pumilus* em meio com melaço

| Parâmetro cinético                     | Valor |
|----------------------------------------|-------|
| $\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$     | 0,219 |
| $t_g (\text{h})$                       | 3,16  |
| $P_x (\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$  | 0,005 |
| $Y_{X/S} (\text{g}_x.\text{g}_s^{-1})$ | 0,041 |
| $Y_{P/S} (\text{g}_p.\text{g}_s^{-1})$ | 0,044 |

Fonte: Autor (2026)

A produtividade de células durante o cultivo foi de  $0,005 \text{ g/L.h}^{-1}$ . Mendoza e colaboradores (2022) produziram biossurfactante por *Bacillus subtilis* DS03 em meio com melaço, obtendo um valor de biomassa máximo de  $0,8 \text{ g/L}$  durante a fase exponencial de crescimento, um comportamento semelhante ao do presente estudo, que registrou a maior concentração celular de  $0,6 \text{ g/L}$  nas 24 h. A produtividade de células durante a fase exponencial foi de  $0,022 \text{ g/L.h}^{-1}$ , em comparação com  $0,015 \text{ g/L.h}^{-1}$  obtidos neste trabalho.

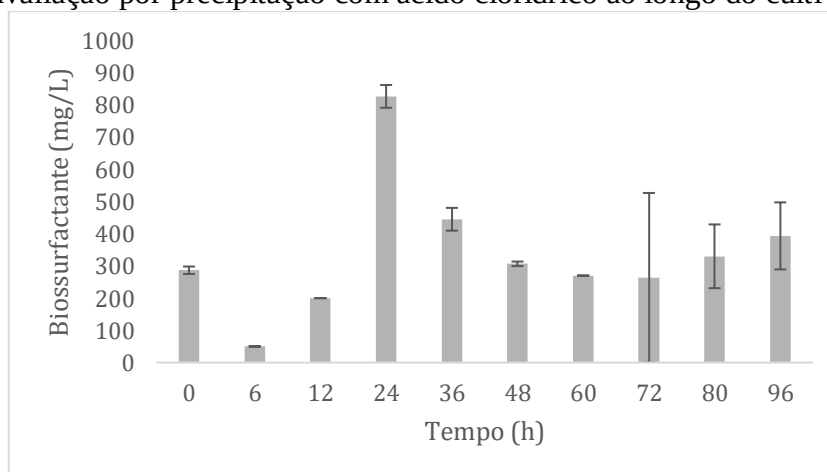
A Figura 8 também relaciona a concentração de ART com a concentração celular ao longo do tempo, onde o consumo total do substrato foi de  $7,76 \text{ g/L}$ , partindo de uma concentração inicial de  $15 \text{ g/L}$  a  $7,24 \text{ g/L}$  ao final do cultivo. Durante a fase lag o consumo do substrato decresce, seguido de um ligeiro aumento perto das 24 h. Depois de 48 h, a concentração de substrato decai até o final do cultivo. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de o melaço de cana ser um substrato complexo, que muitas vezes requer adaptabilidade metabólica do microrganismo.

O fator de conversão de substrato em célula e a conversão de substrato em produto calculados foram de 0,041 g<sub>x</sub>/g e 0,044 g<sub>p</sub>/g<sub>s</sub>, respectivamente. Xu e colaboradores (2025) produziram biossurfactante pela cepa *Bacillus thuringiensis* PDB-43, obtendo um fator de conversão de biomassa de 0,09 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub>. Hoffman e colaboradores (2020) conduziram ensaios em biorreator com *Bacillus subtilis* JABs24 sob condições anaeróbicas, encontrando um valor de conversão da biomassa de 0,051 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> e 0,140 g<sub>p</sub>/g<sub>s</sub> para a conversão de substrato em produto.

No estudo conduzido por Datta, Tiwari e Pandey (2020), citado anteriormente, usaram glicerol como fonte de carbono e obtiveram um valor de conversão de biomassa de 0,1 g<sub>x</sub>/g<sub>s</sub> para biossurfactante produzido por *Bacillus tequilensis* MK 729017 e a conversão de substrato em produto foi de 0,45 g<sub>p</sub>/g<sub>s</sub>. Alterações nas condições de cultivo como aumento da concentração de substrato no meio, temperatura e agitação podem resultar em um maior valor de conversão.

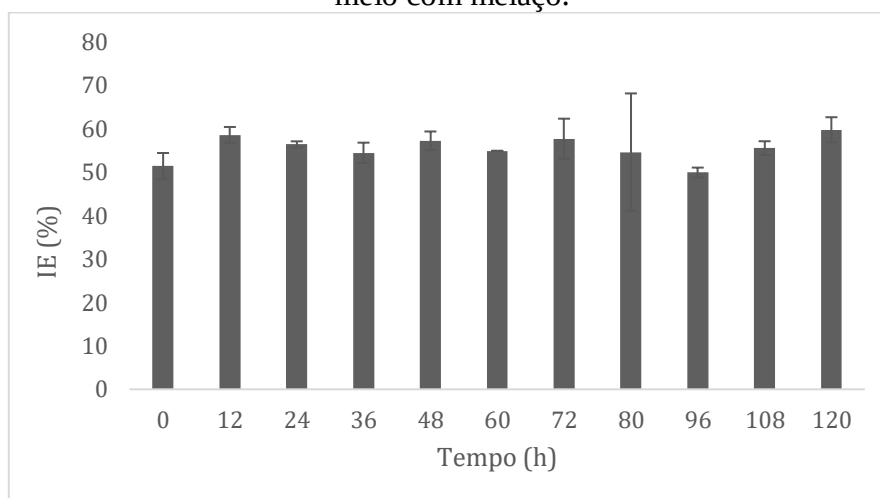
No tempo de 24 h foi obtida a maior concentração de biossurfactantes (Figura 9). O melhor índice de emulsificação foi obtido nas 120 h de fermentação, com aproximadamente 60% (Figura 10). Estudos mostram que para uma emulsão ser considerada eficaz, o índice de emulsificação deve ser superior a 40% (Youssef et al., 2004). No presente trabalho os valores de IE<sub>24</sub> foram superiores a esse valor.

Figura 9 — Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* em meio de melaço, avaliação por precipitação com ácido clorídrico ao longo do cultivo.



Fonte: Autor (2026)

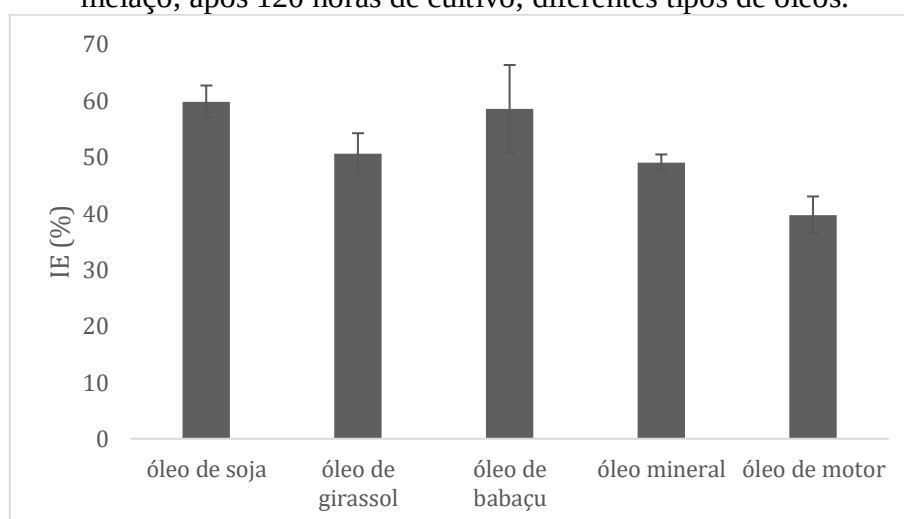
Figura 10 — Índice de emulsificação ao longo do cultivo do *Bacillus pumilus* em meio com melaço.



Fonte: Autor (2026)

O índice de emulsificação é uma medida amplamente utilizada para avaliar a atividade emulsificante de biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus* em diversos tipos de óleos e hidrocarbonetos (Aboelkhair, Diaz e Attia, 2022). Os índices de emulsificação com óleo de soja e óleo de babaçu apresentaram os melhores resultados, com valores acima de 50% (Figura 11). Valores mais altos de  $E_{24}$  indicam maior capacidade de emulsificação, o que é importante para aplicações como recuperação aprimorada de petróleo e biorremediação.

Figura 11 — Índice de emulsificação do cultivo de *Bacillus pumilus* em meio com melaço, após 120 horas de cultivo, diferentes tipos de óleos.



Fonte: Autor (2026)

No tempo das 24 h, os resultados obtidos analisando as amostras por outro método de extração (Figura 12), demonstraram que a precipitação com etanol usando o meio sem células foi mais eficaz, apresentando uma concentração de 3,35 g/L (Figura 13). As amostras com

cultivo bruto e estéril resultaram em 2,09 g/L e 3,33 g/L respectivamente. A extração com cultivo bruto e com cultivo sem células demonstraram resultados semelhantes, porém considerando que na massa seca pesada do caldo bruto poderia haver também células, a melhor condição de extração foi com o cultivo livre de células. Na Figura 13, pode-se observar o precipitado nas diferentes condições analisadas.

Figura 12 — Extrato bruto do biossurfactante precipitado em diferentes condições: (a) Cultivo bruto por etanol (b) Cultivo sem células por etanol (c) Cultivo estéril por etanol (d) Cultivo estéril e bruto por precipitação ácida

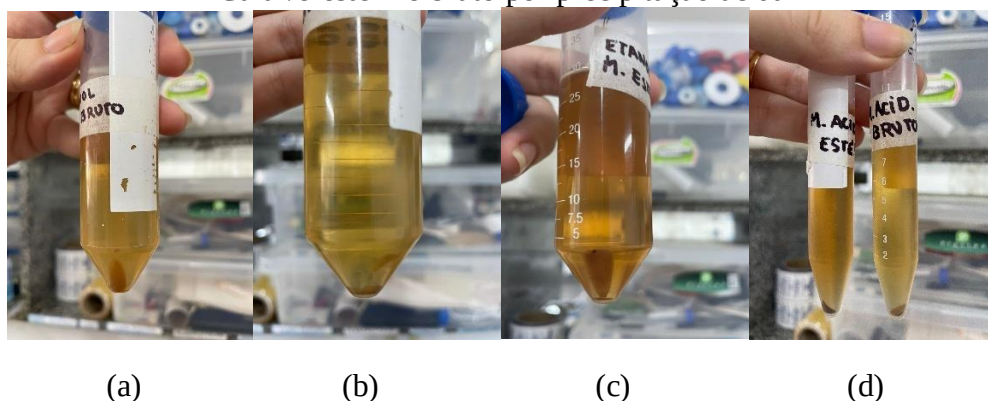
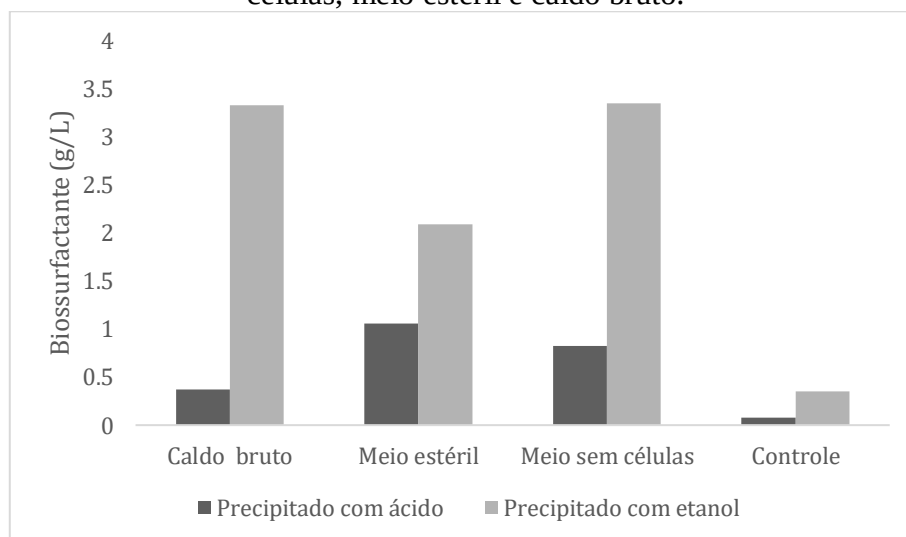


Figura 13 — Diferentes métodos de extração do biossurfactante em meio livre de células, meio estéril e caldo bruto.



Fonte: Autor (2026)

Wu e colaboradores (2022) produziram, através da cepa *Bacillus subtilis* SL, biossurfactante que atingiu o rendimento de 1,32 g/L usando sacarose como única fonte de carbono, o índice de emulsificação obtido foi de 67 % usando querosene. Rawat e colaboradores (2024) isolaram *Bacillus* sp. G6 de solo contaminado com petróleo e produziram

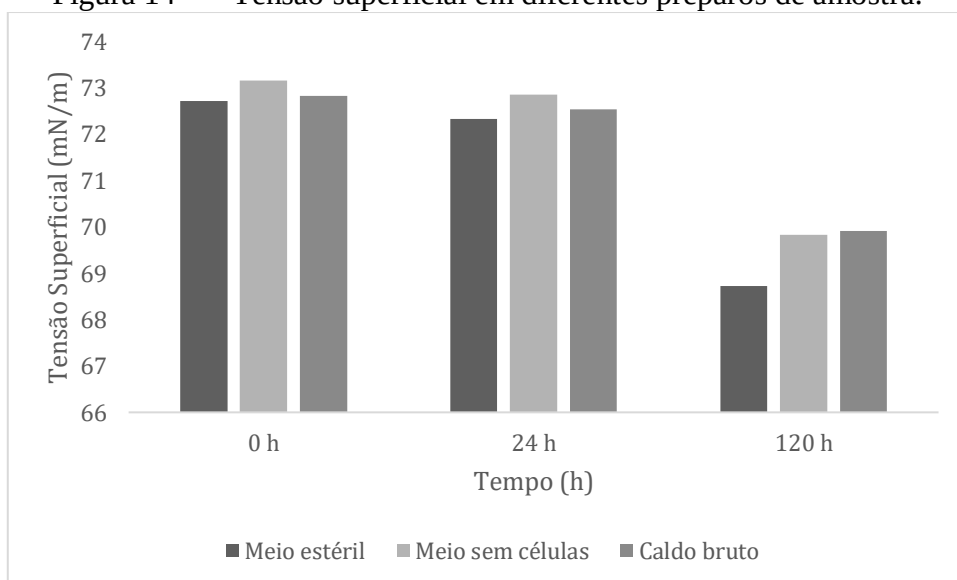
biossurfactante em meio mineral suplementado com óleo de motor usado, atingido uma concentração de 3,79 g/L e índice de emulsificação entre 57 e 66,3 %.

Utilizando melaço como fonte de carbono, Rane e colaboradores (2017) produziram 0,241 g/L de biossurfactante pela cepa *B. subtilis* ANR 88, valor que aumentou para 0,746 g/L após a otimização. Rocha, Padilha e Santos (2025) produziram biossurfactante pela cepa *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como fonte de carbono, obtendo uma concentração máxima de 1,87 g /L nas 24 h de cultivo.

A concentração de biossurfactante pode ser aumentada através de otimização do processo e cultivos maiores em biorreatores. Marchut-Mikołajczyk e colaboradores (2021) otimizaram as condições de cultivo usando *Bacillus pumilus* 2A para produzir biossurfactante com melaço como substrato e foram obtidos 4,1 g/L de produto com um índice de emulsificação de 30 %. Também usando melaço, Verma e colaboradores (2023) produziram biossurfactante por *B. subtilis* RSL2 em biorreator semicontínuo, atingindo um rendimento de 13,7 g/L.

A menor redução da tensão superficial foi observada nas 120 h do cultivo, como mostrado na Figura 14. A amostra com meio estéril registrou uma redução de 5,5% do valor inicial. Na literatura, biossurfactantes produzidos por *Bacillus pumilus* registraram uma redução da tensão superficial da água de 40 a 30 mN/m em cultivos usando glicerol, óleo de motor, petróleo e hidrolisados, havendo também otimização dos bioprocessos para a escolha de melhores parâmetros (Dasgupta et al., 2023; Fooladi et al., 2016; Slivinski et al., 2012). Para trabalhos futuros, visa-se reavaliar a escolha de substratos e otimizar os parâmetros de fermentação.

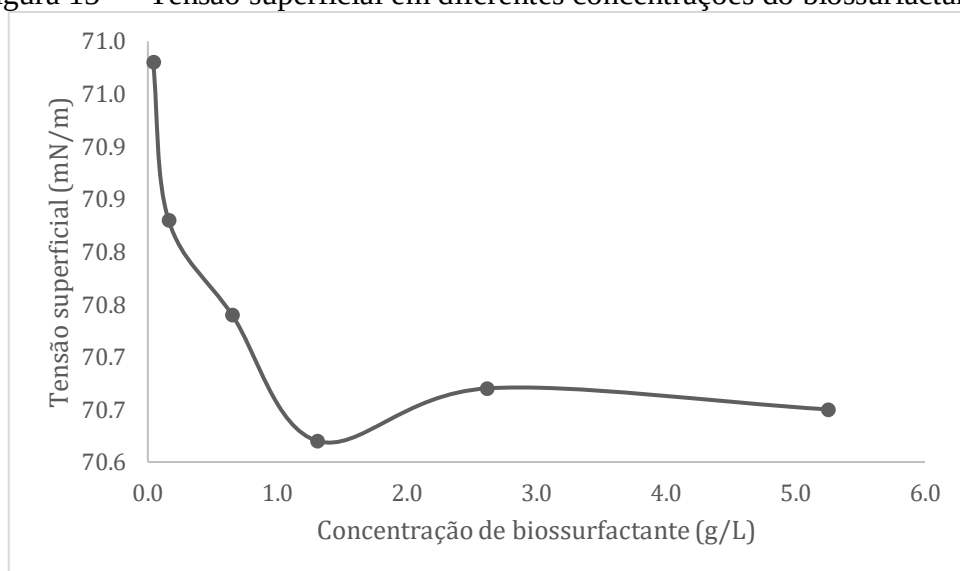
Figura 14 — Tensão superficial em diferentes preparos de amostra.



Fonte: Autor (2026)

A concentração micelar crítica (CMC) foi atingida entre 1 e 5 g/L de concentração do extrato bruto, como mostra a Figura 15. A CMC define a menor concentração de surfactantes que permite a formação de micelas e, conseqüentemente, a redução da tensão superficial. Biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus* possuem concentração micelar crítica em baixas concentrações de surfactantes, a depender da cepa e do tipo de biossurfactante produzido. Gharaie e colaboradores (2023) produziram biossurfactante por *Bacillus pumilus* SG em meio com petróleo bruto, que alcançou a concentração micelar crítica em 0,1 g/L. Kadiri e colaboradores (2024) produziram surfactante por *Bacillus aerius* em meio mineral com 1% de gasolina, onde o biossurfactante atingiu a concentração micelar crítica em 0,06 g/L. O valor de CMC obtido neste trabalho pode ser reavaliado, purificando o biossurfactante produzido e estudando as condições que melhor favorecem a redução da tensão superficial.

Figura 15 — Tensão superficial em diferentes concentrações do biossurfactante.



Fonte: Autor (2026)

De acordo com os resultados apresentados, a produção de biossurfactante parece ser influenciada pelo crescimento celular acentuado durante a fase exponencial, onde o maior valor de concentração de células é obtido, também com a maior concentração de produto. O biossurfactante produzido apresentou um potencial emulsificante satisfatório e um rendimento promissor quando comparado com outras espécies de *Bacillus* produtoras de surfactantes.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho se propôs a analisar a produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* usando melaço de cana como fonte de carbono. Foi possível estabelecer as relações entre o crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto. A concentração máxima do extrato bruto de biossurfactante obtida foi de 3,35 g/L, valor satisfatório para fundamentar futuras pesquisas visando otimização dos parâmetros e produção em maior escala. O valor máximo de índice de emulsificação obtido foi de 59,7%, que demonstra o potencial bioemulsificante do biossurfactante produzido.

Os dados obtidos mostram que a produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* é promissora, mas carece de aprofundamento. Além disso, o estudo do uso de melaço de cana como única fonte de carbono também precisa ser instigado, tendo em vista que é um substrato complexo e não se tem tantas informações sobre como é metabolizado por microrganismos para produzir biossurfactante.

Diante dos resultados obtidos, é possível afirmar que o objetivo do estudo foi alcançado. O trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre a utilização de substratos renováveis como alternativa sustentável e de baixo custo para a produção de biossurfactantes, além de abrir perspectivas para pesquisas futuras. Assim, espera-se que as informações aqui apresentadas sirvam como base para estudos que visem aprimorar o desempenho biotecnológico e expandir o potencial de aplicação desses compostos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE-RAMÍREZ, M. et al. Surfactants: physicochemical interactions with biological macromolecules. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 3, p. 523–535, 3 fev. 2021.
- ABOELKHAIR, H.; DIAZ, P.; ATTIA, A. Environmental comparative study of biosurfactants production and optimization using bacterial strains isolated from Egyptian oil fields. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 216, p. 110796, 24 jun. 2022.
- ALLEN, J. et al. Substrate Optimization for Bioemulsification Using *Saccharomyces cerevisiae* 2031 by Response Surface Methodology. **Agro Bali Agricultural Journal**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 12 maio 2023.
- ANTONIAZZI, J. P. et al. Incorporação de ar em argamassas estabilizadas: influência dos aditivos, agregados e tempo de mistura. **Ambiente Construído**, v. 20, n. 3, p. 285–304, jul. 2020.
- BAPTISTA, Camila. **Crescimento do *Bacillus pumilus* em meios diversos para produção de biossurfactantes**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024.
- BARBOSA, F. et al. Biosurfactants: Sustainable and Versatile Molecules. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022.
- BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, abr. 2007.
- BATOOL, I. et al. Wetting the Surface: A Deep Dive into Chemistry and Applications of Surfactants. **Cleaner Chemical Engineering**, p. 100197, 30 jul. 2025.
- BJERK, T. R. et al. Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. **Bioengineering** (Basel, Switzerland), v. 8, n. 8, 13 ago. 2021.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.
- CORTÉS, H. et al. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. **Materials**, v. 14, n. 12, p. 3197, 10 jun. 2021.
- DAS, S.; RAO, B. A comprehensive review of biosurfactant production and its uses in the pharmaceutical industry. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 2, 10 jan. 2024.
- DASGUPTA, A. et al. Characterization of pumilacidin, a lipopeptide biosurfactant produced from *Bacillus pumilus* NITDID1 and its prospect in bioremediation of hazardous pollutants. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 8, 4 jul. 2023.

DATTA, P.; TIWARI, P.; PANDEY, L. M. Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated *Bacillus tequilensis* MK 729017 from Assam reservoir soil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 195, p. 107612, dez. 2020.

DINI, S. et al. The Physicochemical and Functional Properties of Biosurfactants: A Review. **Molecules**, v. 29, n. 11, p. 2544, 1 jan. 2024.

ELDOS, H. I. et al. Isolation, identification, and characterization of potential biosurfactant-producing bacteria from processing wastewater for the development of eco-friendly green technology. **Bioresource Technology Reports**, v. 25, p. 101763, 24 jan. 2024.

ERAS-MUÑOZ, E. et al. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 12365–12391, 2 maio 2022.

FARIAS, B. et al. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28–39, 1 maio 2021.

FERREIRA, J. F. **Bactérias produtoras de biosurfactante isoladas de reservatório de petróleo brasileiro: condições de crescimento, produção e propriedades tensoativas do biosurfactante produzido pela linhagem Ar35D5**. 2024. 171p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

FOOD CHAIN. Food Chain, 2019. **Confirma o panorama das usinas do Brasil**. Disponível em: <https://www.foodchainid.com/br/resources/usinas-do-brasil/#:~:text=H%C3%A1%20mais%20de%20400%20usinas,da%20cana%20mo%C3%ADa%20no%20Brasil>. Acesso em: 26 fevereiro 2026.

FOOLADI, T. et al. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 145, p. 510–519, set. 2016.

FU, L. et al. Application of molecular simulation in tertiary oil recovery: A systematic review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 212, p. 110196, 24 jan. 2022.

GHARAIE, S. et al. Glycolipopeptide biosurfactant from *Bacillus pumilus* SG: physicochemical characterization, optimization, antibiofilm and antimicrobial activity evaluation. **3 biotech**, v. 13, n. 10, 28 ago. 2023.

GULATI, D.; AHMAD, M.; BHATIA, M. Evaluation of biosurfactant production from *Pseudomonas mendocina* and its antibacterial application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 66, p. 103609, jun. 2025.

HILLER, E. et al. The influence of growth rate-controlling feeding strategy on the surfactin production in *Bacillus subtilis* bioreactor processes. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, 30 set. 2024.

HOFFMANN, M. et al. Towards the Anaerobic Production of Surfactin Using *Bacillus subtilis*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 554903, 26 nov. 2020.

HSU, C.-Y. et al. Biosurfactants: Properties, applications and emerging trends. *South African Journal of Chemical Engineering*, v. 53, p. 21–39, 11 abr. 2025.

HUANG, X. et al. *Bacillus pumilus* APC 4184 produces a plethora of antimicrobial metabolites: Insights into pumilacidins and the novel circular bacteriocin pumilarin X. *LWT*, v. 240, p. 118937, jan. 2026.

INAMUDDIN; RAJENDER BODDULA; ASIRI, A. M. Green sustainable process for chemical and environmental engineering and science. **Analytical techniques for environmental and industrial analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2020.

JEONG, G.-J. et al. Unraveling the anti-*Listeria monocytogenes* mechanism of a biosurfactant from *Bacillus velezensis* GJ1 and its application in eco-friendly antibacterial detergent development. *Chemical Engineering Journal*, v. 526, p. 171311, dez. 2025.

KADIRI, F. et al. Antibiofilm potential of biosurfactant produced by *Bacillus aerius* against pathogen bacteria. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 56, p. 102995, 1 fev. 2024.

MARCHUT-MIKOŁAJCZYK, O. et al. Biosurfactant from endophytic *Bacillus pumilus* 2A: physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, 8 fev. 2021.

MARINHO, P. S. DA S.; SILVA, R. R. DA; LUNA, J. M. DE. Biosurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e103111234123, 8 set. 2022.

MENDOZA, I. et al. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and Application in Cleaning Out Place System in a Pilot Sausages Processing. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1518, 27 jul. 2022.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MNIF, I.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 5, p. 2192–2206, 2 ago. 2017.

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Brasília, DF: **Embrapa**, [2020].

MORAN, A. P. **Microbial Glycobiology**. [s.l.] Academic Press, 2009.

MULUGETA, K. et al. **A Review on Production, Properties, and Applications of Microbial Surfactants as a Promising Biomolecule for Environmental Applications**. p. 3–28, 1 jan. 2021.

MUSHTAQ, A. et al. Recent insights into Nanoemulsions: Their preparation, properties and applications. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100684, 1 jun. 2023.

NAGTODE, V. S. et al. Green Surfactants (Biosurfactants): A Petroleum-Free Substitute for Sustainability-Comparison, Applications, Market, and Future Prospects. **ACS Omega**, v. 8, n. 13, 24 mar. 2023.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772–776, 1 set. 2002.

OLIVEIRA, C. Z. et al. Seleção de indutores e cepas de *Bacillus* para produção de biossurfactantes. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 23, n. 1, p. e8539, 7 jan. 2025.

OLIVEIRA, G. J. **Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e avaliação da biorremediação de solo e água contaminados com óleo**. 70p. Tese (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

PALMONARI, A. et al. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, p. 6244–6249, 1 jul. 2020.

PANDIT, N. K.; MEENA, S. S. Exploring Sustainable Biosurfactant Production Through Waste Valorization: Emerging Research Trends and Industrial Applications. **Waste and Biomass Valorization**, 20 jun. 2025.

RANE, A. N. et al. Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and Its Application in Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 24 mar. 2017.

RAJ, S.; RAMAMURTHY, K. Classification of surfactants and admixtures for producing stable aqueous foam. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 331, p. 103234, 1 set. 2024.

RAPP, B. E. **Microfluidics: modeling mechanics and mathematics**. Amsterdam, Netherlands: William Andrew, 2017.

RATHER, M. A. et al. Biodegradation of crude oil by biosurfactant-producing microaerophilic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MAR1. **Science of The Total Environment**, v. 991, p. 179876, ago. 2025.

RAVICHANDRAN, D.; SONBHADRA, S.; PANDEY, L. M. Production of biosurfactant from *Bacillus* sp. and its application in sustainable detergent formulations. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, fev. 2026.

RAWAT, G. et al. Exploring the potential of novel *Bacillus* sp. G6: Isolation, characterization, and optimization of biosurfactant production from oil-contaminated soil. **Journal of Molecular Liquids**, v. 396, p. 124013, fev. 2024.

ROCHA, P.; ARAÚJO PADILHA, C. E. DE; DOS SANTOS, E. S. Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 using Sugarcane Molasses as a Carbon and Energy Source. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 22, n. 3, p. 1016–1027, 30 set. 2025.

ROMERO VEGA, G.; GALLO STAMPINO, P. Bio-Based Surfactants and Biosurfactants: An Overview and Main Characteristics. **Molecules**, v. 30, n. 4, p. 863, 13 fev. 2025.

SARUBBO, L. A. et al. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108377, abr. 2022.

SANTOS, F.; BORÉM, A.; CELSO, A. **Sugarcane: agricultural production, bioenergy and ethanol**. London: Academic Press, 2015.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blücher, 2001, vol. 2.

SLIVINSKI, C. T. et al. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1848–1855, dez. 2012.

SUSETYO, R. et al. Combination of Mollase and Glucose as Substrate for The Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* BK7.1. **BIO Web of Conferences**, v. 101, p. 02007, 2024.

SULTAN, F. et al. Pharmaceutical applications of microbial biosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 681, p. 125887, 22 jun. 2025.

TAMJIDI, S. et al. Improving the surface properties of adsorbents by surfactants and their role in the removal of toxic metals from wastewater: A review study. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 148, p. 775–795, abr. 2021.

THAKUR, V. et al. Recent progress in microbial biosurfactants production strategies: Applications, technological bottlenecks, and future outlook. **Bioresource Technology**, p. 131211–131211, 1 ago. 2024.

TRACY, P.; DASGUPTA, D.; MORE, S. Challenges and opportunities for production of C5 sugar fatty acid esters (SFAEs) from renewable resources. **Industrial Crops and Products**, v. 193, p. 116170, mar. 2023.

UNAL, D. et al. Review of Surfactants, Structural Properties and Their Role in Electrochemistry. In: MANJUNATHA, J. G. **Surfactant-based Sensors in Chemical and Biochemical Detection**. [s.l.] Royal Society of Chemistry, 2023.

VASCONCELOS, N. M. et al. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico**: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013. 11 p. (Comunicado Técnico, 187). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/982130/determinacao-de-acucares-redutores-pelo-acido-35-dinitrosalicilico-historico-do-desenvolvimento-do-metodo-e-estabelecimento-de-um-protocolo-para-o-laboratorio-de-bioprocessos>. Acesso em: 06 de Abril de 2026.

VERMA, R. et al. Enhanced production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL2 in semicontinuous bioreactor utilizing molasses as a sole substrate. **Journal of Biotechnology**, v. 362, p. 24–35, jan. 2023.

VERMA, R. et al. Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101632, dez. 2020.

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, ago. 2021.

WU, B. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SL and its potential for enhanced oil recovery in low permeability reservoirs. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 11 maio 2022.

XIAO, Q. et al. Dual tolerance of *Bacillus pumilus*: A multi-omics perspective on coping with salt stress and degrading petroleum hydrocarbons. **Chemical Engineering Journal**, v. 530, p. 173587, fev. 2026.

XU, Y. et al. Optimization of bioremediation process for crude oil-contaminated soils using synergistic combination of bacteria and yeast. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 141, p. 104174, 7 nov. 2025.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., &McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, 56(3), 339–347

ZHAO, Z. et al. Biodegradation and high-value utilization of waste cooking oil: Strategies and mechanisms for producing lipopeptide biosurfactants using *Bacillus subtilis* YZQ-2. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 12, n. 6, p. 114549–114549, 22 out. 2024.