UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

ELISA MAIA SANTOS

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CAPACIDADE ANTIVIRAL DE SURFACTINA

Recife
2025

ELISA MAIA SANTOS

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CAPACIDADE ANTIVIRAL DE SURFACTINA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Elisa Maia.
Avaliação da produção e capacidade antiviral de surfactina / Elisa Maia Santos. - Recife, 2025.
40p. : il.

Orientador(a): Tercilio Calsa Junior
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciênciais Ambientais - Bacharelado, 2025.
Inclui referências.

1. Antiviral. 2. COVID-19. 3. Bacillus subtilis. 4. Surfactantes. I. Junior, Tercilio Calsa. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

ELISA MAIA SANTOS

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CAPACIDADE ANTIVIRAL DE SURFACTINA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel.

Aprovada em: 26/03/2025

COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br
TERCILIO CALSA JUNIOR
Data: 10/04/2025 20:59:20-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior / UFPE

Documento assinado digitalmente
gov.br
THIAGO HENRIQUE NAPOLEAO
Data: 10/04/2025 16:46:25-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão / UFPE

Documento assinado digitalmente
gov.br
ROXANA CARDOSO BARRETO
Data: 11/04/2025 01:27:11-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Profa. Dra. Roxana Cardoso Barreto / UFPE

Recife

2025

Aos meus pais, com todo o amor.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, pois tudo vem D'ele. Agradeço aos meus pais, Kesya Maia Santos e Alexandre Joaquim dos Santos, por me apoiarem em cada uma das minhas empreitadas nessa vida, cada vitória minha é alimentada pela vontade de dar orgulho a vocês. Agradeço à minha irmã Alice Maia Santos, engenheira química, que trilhou esse caminho antes de mim, pavimentando a estrada para que minha caminhada fosse tranquila, você é minha inspiração. Agradeço a todos os meus familiares por me sustentar em oração durante este trajeto difícil.

Aos meus amigos da faculdade, Ana Júlia, Augusto, Bárbara e Maria Flora, obrigada por trazer leveza aos meus dias, rir com meu sorriso, chorar com minhas lágrimas. Sempre vou lembrar das nossas conversas na sorveteria, das viagens de ônibus e das maratonas desesperadas de estudos que rendiam boas risadas! Esse TCC realmente não seria possível sem vocês. Tudo na vida tem um propósito e vocês foram um presente de Deus para mim, Ele sabia do quanto eu precisaria dessa ajuda, saibam que sempre serei grata pelo nosso afeto. Desejo que suas vidam sejam completamente preenchidas de alegria, que nunca falte nada e sempre sobre amor, OBRIGADA!!!!

Aos amigos da vida, Irene, Rayn, Alessandra, obrigada pelos momentos de diversão que tornam a vida mais leve e obrigada por permanecer por tanto tempo ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador desde o início da graduação, Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior, por toda a ajuda e compreensão.

Aos colegas de laboratório, Bárbara, Beatriz, Cleiton, José, Larissa, Cássio, Gabriel e Eduarda, que me guiaram pelos percalços acadêmicos e encheram de risadas os dias no laboratório (e fora dele).

Meu mais sincero muito obrigada ao meu amigo do coração, Dr. Lucas Freitas, pelo apoio emocional e o cuidado que teve comigo durante minha iniciação científica.

Agradeço ao Prof. Rafael Reinaldo, meu professor de biologia do ensino médio, pelo apoio na jornada que me trouxe para a graduação em ciências biológicas e por me inspirar tanto.

Para cada um dos colegas do curso que iluminaram meus dias, que me desejaram um bom dia, me deram um sorriso ou um aceno, meu mais sincero muito obrigada!

“A fé é a certeza daquilo que esperamos e
a prova das coisas que não vemos."
Hebreus 11:1

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a produção de surfactina por isolados de *Bacillus subtilis*, visando identificar linhagens com maior capacidade produtiva e avaliar suas possíveis aplicações. Foram utilizados quatro isolados de *Bacillus subtilis*: AGRO, UCP0999, UFRA92 e UFPEDA 458. A produção foi realizada utilizando meio de cultivo à base de melaço de cana-de-açúcar, e a quantificação foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados indicaram que o isolado UCP0999 apresenta maior eficiência na síntese do biossurfactante, produzindo 73,7 mg/L, enquanto os surfactantes dos isolados AGRO e UFRA92 apresentaram elevados índices de emulsificação, de 80% e 75%, respectivamente. Ensaios de toxicidade demonstraram que, em concentrações moderadas, a surfactina não comprometeu o crescimento vegetal, sugerindo sua viabilidade para aplicações ambientais. O teste antiviral mostrou que a surfactina produzida por UFRA92 não possui atividade contra o SARS-CoV-2. Os resultados reforçam o potencial biotecnológico da surfactina e evidenciam a necessidade de otimização da produção, além da avaliação de novas linhagens que visem maior rendimento e menor toxicidade.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. Surfactantes. COVID-19. Microbiologia.

ABSTRACT

In this study the production of surfactin by *Bacillus subtilis* isolates was investigated, aiming to identify strains with higher productive capacity and evaluate their potential applications. Four *Bacillus subtilis* isolates were used: AGRO, UCP0999, UFRA92, and UFPEDA 458. Production was carried out using a culture medium based on sugarcane molasses, and quantification was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that the UCP0999 isolate showed the highest efficiency in biosurfactant synthesis, producing 73.7 mg/L, while the surfactants from the AGRO and UFRA92 isolates exhibited high emulsification indices of 80% and 75%, respectively. Toxicity assays demonstrated that, at moderate concentrations, surfactin did not impair plant growth, suggesting its viability for environmental applications. The antiviral test showed that the surfactin produced by UFRA92 had no activity against SARS-CoV-2. These findings reinforce the biotechnological potential of surfactin and highlight the need for production optimization and the evaluation of new strains aiming for higher yields and lower toxicity.

Keywords: *Bacillus subtilis*. Surfactants. COVID-19. Microbiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura surfactante NaSO4C12H25 (Sodium Lauryl Sulfate) Fonte: PubChem – Cid3423265.	15
Figura 2 –	Estrutura de C53H93N7O13 (surfactina) fonte: PubChem - CID 443592.	17
Figura 3 –	Isolados de *Bacillus subtilis* inoculados em placas. Estrias de UCP0999 circuladas em vermelho para melhor visualização.	25
Figura 4 –	Concentrações de surfactina dos isolados comparadas a concentração de surfactina padrão.	26
Figura 5 –	Concentrações de surfactina encontradas em cada isolado.	26
Figura 6 –	Índices de emulsificação após teste de 24 horas em querosene.	28
Figura 7 –	Frondes de *Lemna aequinoctialis* em placa após 5 dias de cultivo com diferentes doses de extrato de surfactina para cada isolado.	28
Figura 8 –	Concentrações de surfactina por poço após análise quantitativa por HPLC.	28
Figura 9 –	Sinais de toxicidade em *Lemna aequinoctialis* . A: Clorose, amarelamento da fronde por falta de clorofila. B: Bleaching, embranquecimento da fronde por perda de clorofila.	28
Figura 10 –	Número de frondes de *Lemna aequinoctialis* por poço após 5 dias de cultivo nas diferentes concentrações de surfactina dos isolados de *Bacillus subtilis.*	28
Figura 11 –	Taxa de crescimento relativo do número de frondes de *Lemna aequinoctialis* (RFNGR, em dia-1) por poço após 5 dias de cultivo nas diferentes concentrações de surfactina dos isolados de *Bacillus subtilis.*	29
Figura 12 –	Taxa de crescimento relativo do número de frondes de *Lemna aequinoctialis* (RFNGR, eixo das ordenadas, em dia-1) por poço após 5 dias de cultivo nas doses de 0, 12,5 , 25, 50, 75 e 100 µl de surfactina dos isolados de B. subtilis.	29

Figura 13 – Titulação do SARS-CoV-2 após o tratamento do vírus com a surfactina produzida pelo isolado de *Bacillus subtilis* UFRA-92. 30

Figura 14 Microscopia das células Vero padrão (*mock*); contaminadas por SARS-CoV-2 sem tratamento (*negative control*); contaminadas por SARS-CoV-2 + tratamento com inibidor viral (6MMPr); contaminadas por SARS-CoV-2 + tratamento com surfactina do isolado UFRA-92 (UFRA-92). 30

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**13**
2	**REFERENCIAL TEÓRICO**	**15**
2.1	SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES	15
2.2	*Bacillus subtilis*	16
2.3	SURFACTINA	17
2.4	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	18
2.5	CAPACIDADE ANTIVIRAL	19
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	**21**
3.1	PREPARO DO INÓCULO	21
3.2	CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE SURFACTINA	21
3.3	EXTRAÇÃO DA SURFACTINA	22
3.4	QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA	22
3.5	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	23
3.6	TESTE DE TOXICIDADE	23
3.7	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	23
4	**RESULTADOS**	**25**
4.1	CULTIVO DE *Bacillus subtilis*	25
4.2	ANÁLISE POR HPLC	25
4.3	ÍNDICES DE EMULSIFICAÇÃO	27
4.4	TESTE DE TOXICIDADE EM *L. AEQUINOCTIALIS*	27
4.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	29
5	**DISCUSSÃO**	**31**
6	**CONCLUSÃO**	**33**
	REFERÊNCIAS	**34**

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são uma classe de compostos que alteram a tensão superficial entre dois líquidos ou entre um líquido e uma superfície sólida. Amplamente utilizados na indústria, eles desempenham papéis essenciais em processos de detergência, emulsificação e dispersão (PubChem., 2025). Uma vez que muitos surfactantes são produzidos a partir de derivados de petróleo (Almeida, 2020), o impacto ambiental de sua produção e descarte tem incentivado a busca por alternativas mais sustentáveis, como os biossurfactantes (Rezaei *et al*., 2020).

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana, produzidos por fungos e bactérias, conhecidos por sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta eficiência (Santos, Silva, Costa., 2016). Eles apresentam características similares aos surfactantes sintéticos, mas com vantagens ambientais significativas, sendo considerados aliados no desenvolvimento de tecnologias limpas (Larini *et al*., 2017). Dentre os biossurfactantes, destaca-se a surfactina, um lipopeptídeo cíclico produzido pela bactéria *Bacillus subtilis (*Almeida *et al*., 2020; Peypoux, Bonmatin, Wallach., 1999). Além de suas propriedades emulsificantes, a surfactina é reconhecida por suas aplicações antimicrobianas, antivirais e capacidade de interação com lipídios (Chen *et al*., 2015).

A surfactina, devido ao seu alto índice de emulsificação, tem sido estudada como uma alternativa promissora para a remoção de manchas de óleo (Silva *et al*., 2022; Shah *et al*., 2016). Manchas de óleo são uma das principais formas de poluição ambiental, causando danos severos à fauna e flora, além de comprometerem ecossistemas aquáticos (Silva *et al*., 2021). O óleo derramado recobre superfícies, impedindo trocas gasosas e contaminando organismos marinhos. (Nascimento *et al*., 2022). A capacidade da surfactina em reduzir a tensão superficial e formar micelas facilita a solubilização do óleo, promovendo uma limpeza mais eficiente e com menor impacto ambiental (Patel *et al*., 2019).

Além do uso ambiental, a surfactina tem sido amplamente pesquisada por seu potencial antiviral (Wang *et al*., 2017; Vollenbroich *et al*,. 1997). Durante a pandemia de COVID-19, estudos sugeriram sua eficácia na inibição da replicação viral, evidenciando sua versatilidade (Jonhson *et al*., 2019).

A produção de surfactina em escala industrial ainda enfrenta desafios, como custos elevados e variações na produtividade das linhagens de *Bacillus subtilis* (Lilge *et al*., 2022; Nascimento *et al*., 2022). A identificação de linhagens bacterianas com considerável capacidade produtiva de surfactina é um passo fundamental para consolidar o uso da surfactina em aplicações industriais e ambientais (Hermann *et al*., 2025; Jing *et al*., 2023).

Diante do exposto, o presente trabalho visou avaliar a produção da surfactina por isolados de *Bacillus subtilis* com o objetivo de identificar isolado com maior capacidade de produção desse composto e analisar sua capacidade anti-SARS-CoV-2.

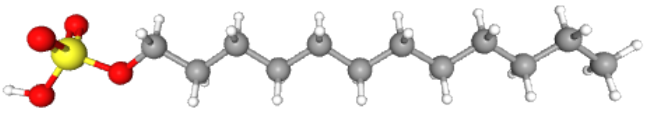
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são compostos químicos caracterizados pela capacidade de diminuição de tensão superficial entre gás e líquido, líquido e sólido ou entre partículas líquidas (PubChem, 2025). Os surfactantes desempenham um papel essencial em aplicações de limpeza, sendo adicionados a agentes de limpeza, como detergentes, devido às suas propriedades específicas, que permitem funções como dispersão, umectação, lavagem e emulsificação (Myers, 2020).

.

Figura 1 - Estrutura surfactante $NaSO_4C_{12}H_{25}$ (Sodium Lauryl Sulfate) Fonte: PubChem – Cid3423265.



Pesquisas revelaram que o tamanho estimado do mercado global de surfactantes foi de US$ 45,18 bilhões em 2023, com uma expectativa de atingir US$ 47,36 bilhões em 2024 e chegar em US$ 70,13 bilhões até 2032, com uma Taxa De Crescimento Anual Composta (CAGR) de 4,9% durante o período de previsão (Fortune Business Insights, 2025). A pandemia de COVID-19 expandiu o setor de cuidados domésticos devido às preocupações com limpeza e higiene, uma vez que os surfactantes são componentes essenciais em formulações de detergentes, desinfetantes, sabonetes e outros produtos voltados à limpeza e cuidados pessoais estas mudanças impactaram positivamente o crescimento do mercado de surfactantes (Chirani *et al*., 2021).

Também conhecidos como tensoativos, os surfactantes são amplamente utilizados na indústria do petróleo e na produção de produtos de limpeza e cosméticos (Almeida, 2020). Normalmente, os surfactantes são produzidos a partir de derivados do petróleo, entretanto, a necessidade de produtos menos poluentes e de menor impacto ambiental aumentou a busca por surfactantes naturais conhecidos

como biossurfactantes (Santos *et al.*, 2016). Estes compostos são sintetizados por microrganismos, como fungos e bactérias, apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Lilge *et al*.,2022; Santos *et al*., 2016). Assim como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são moléculas capazes de alterar a tensão superficial entre dois fluidos e tendem a gerar agregados chamados de micelas (Santos *et al*., 2016; Liu *et al*., 2013). Devido a estas características apresentam diversas propriedades industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, entre outros (Fakruddin, 2012; Nitschke, Pastore, 2002). Devido à sua versatilidade e eficiência, eles são amplamente utilizados em indústrias como cuidados domésticos, limpeza industrial, alimentos e bebidas, entre outras (Ribeiro, Guerra, Sarubbo, 2020; Larini *et al*., 2017; Barros *et al*., 2007).

2.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva amplamente distribuída no solo e na água, reconhecida por sua versatilidade e importância biotecnológica (Arnaouteli *et al*., 2021). Originalmente descrita em 1835 pelo microbiologista Christian Gottfried Ehrenberg como *Vibrio subtilis*, devido à sua motilidade, foi posteriormente reclassificada em 1872 pelo botânico e microbiologista Ferdinand Julius Cohn, que a renomeou para *Bacillus subtilis* após identificar sua capacidade de formar esporos resistentes ao calor (Kovács, 2019; Cohn, 1872).

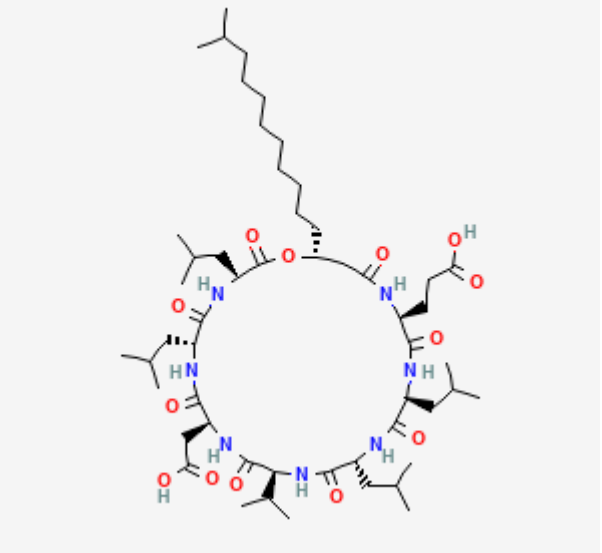
Grande parte de sua importância biotecnológica vem da produção do metabólito surfactina (Wang *et al*., 2017; Chen, Juang, Wei, 2015). A síntese de surfactina é influenciada por diversos fatores ambientais e nutricionais (Volpato *et al*., 2022; Rocha, 2017). A surfactina possui atividade antimicrobiana, permitindo que a bactéria iniba o crescimento de microrganismos concorrentes em seu habitat (Chen, Juang, Wei, 2015). Para o *Bacillus subtilis*, a produção de surfactina oferece vantagens ecológicas significativas, como resposta adaptativa a condições ambientais específicas, desempenhando um papel crucial na sobrevivência e competitividade da bactéria (Volpato *et al*., 2022; Rocha, 2017).

2.3 SURFACTINA

O biossurfactante surfactina ou surfactina C é um ciclodepsipeptídeo, de fórmula molecular $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ ou N-[(3R)-3-hidroxi-13-metiltetradecanoil]-L-alfa-glutamil-L-leucil-D-leucil-L-valil-L-alfa-aspartil-D-leucil-L-leucina, no qual o grupo carboxílico terminal foi lactonizado por condensação com o grupo hidroxila alcoólico (PubChem, 2025). A surfactina apresenta as mesmas características dos surfactantes sintéticos (Almeida *et al*.,2020; Peypoux, Bonmatin, Wallach, 1999) e vem sendo amplamente estudada devido ao seu potencial antimicrobiano, com alta atividade fungicida, bactericida e principalmente antiviral (Meena, Sharma, Kanwar, 2020 ; Chen, Juang, Wei, 2015). Além disso, estudos evidenciam sua capacidade de atuação como agente antineoplásico e inibidor da agregação plaquetária, além de servir como veículo para administração de drogas via pulmonar (Seydlóva, Svobodóva, 2008)

Grande parte das capacidades da surfactinas são devidas à sua natureza anfipática, possuindo uma parte hidrofílica (Grupos polares, carboxila e aminas, nos aminoácidos do anel) e outra hidrofóbica (Cadeia longa de ácido graxo). Essa característica permite a redução da tensão superficial e facilita a formação de micelas (Lilge *et al*.,2022).

Figura 2 - Estrutura de $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ (surfactina) fonte: PubChem - CID443592.



2.4 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Durante o ano de 2019, ocorreu um vazamento de óleo bruto no litoral do Brasil, considerado um dos maiores desastres ambientais por derramamento de petróleo, alcançando uma faixa litorânea de 4.334 km em 11 estados do Nordeste e Sudeste, 120 municípios e 724 localidades (Pena *et al*., 2020). O óleo bruto, ou petróleo, contém em sua composição uma variedade de substâncias, muitas das quais possuem alto grau de toxicidade para a saúde humana e são extremamente prejudiciais à fauna e à flora (Silva *et al*., 2021; Cerqueira *et al.,* 2020). Entre os compostos presentes, destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e o grupo BTEX, formado por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (Bertoldi *et al*., 2019; Wagener *et al*., 2017). Esses compostos orgânicos podem ser gerados, entre outras fontes, pela indústria petrolífera, seja por meio de derramamentos de óleo ou pela liberação de emissões atmosféricas durante o processo de refino (Biswas, Mondal., 2019). Eles também têm papel de destaque em estudos ambientais devido ao seu caráter mutagênico e carcinogênico, sendo considerados altamente poluentes (Euzebio *et al*., 2022).

De acordo com Mao *et al.* (2015) a contaminação do solo é uma questão de preocupação global, representando um obstáculo significativo ao desenvolvimento sustentável. Esse problema afeta o equilíbrio dos ecossistemas, resulta em perdas econômicas crescentes e prejudica a saúde humana (Khan *et al*., 2021). As principais causas da contaminação incluem práticas inadequadas ou irresponsáveis de descarte, como o despejo impróprio de resíduos industriais, rejeitos de mineração, descarte de lixo e armazenamento incorreto de materiais (Campelo, 2023). Para eliminar os poluentes químicos presentes no solo, a lavagem com soluções aquosas é amplamente utilizada (Ahn *et al*., 2008). No entanto, devido à baixa solubilidade ou insolubilidade de muitos contaminantes em água, são necessários aditivos, entre os quais os surfactantes se destacam, graças à sua estrutura molecular única e propriedades versáteis (Mao *et al*., 2015., Ahn *et al*., 2008)

Nesse cenário, microrganismos produtores de biossurfactantes podem ser aproveitados para lidar com os problemas de derramamento, destacando-se por

suas propriedades sustentáveis como baixo nível de toxicidade, e fácil degradação (Korbut *et al*., 2022; Santos, Silveira, Pereira., 2019). Contudo, um dos maiores desafios atuais do uso dos biossurfactantes é o alto custo de produção (Lilge *et al*.,2022; Nascimento *et al*., 2022).

2.5 CAPACIDADE ANTIVIRAL

Vírus envelopados, como os da gripe, dengue e imunodeficiência humana, possuem uma membrana de bicamada lipídica que facilita sua entrada nas células hospedeiras por meio do processo de fusão entre a membrana viral e a celular (Yuan *et al* 2018; Kim *et al*., 2016). Esse processo é mediado por uma glicoproteína de superfície viral chamada “proteína de fusão”, que desempenha um papel essencial nessa etapa (Yuan *et al.,* 2018; Kim *et al*., 2016).

A surfactina é um potente agente antiviral capaz de romper a integridade desta importante membrana de vírus envelopados (Wang *et al*., 2017), como já foi demonstrado em estudos que avaliaram a eficiência da surfactina na inibição da replicação de vírus envelopados como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus do herpes simples (HSV 1 e 2) vírus da estomatite vesicular (VSV), entre outros (Vollenbroich *et al.,* 1997).

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, foi identificado em Wuhan, província de Hubei – China em dezembro de 2019 e rapidamente se disseminou, tornando-se um problema de saúde global (Sohrabi *et al*., 2020). Até o presente momento, mais de 700 milhões de casos já foram confirmados, com cerca de 7,1 milhões de mortes em todo o mundo (Organização Mundial da Saúde, 2025). No Brasil foram confirmados até hoje 39.181.954 casos e 715.108 óbitos causados pela doença (Ministério da Saúde, 2025). Apesar de apresentar menor taxa de mortalidade em comparação ao SARS-CoV e o MERS-CoV, o SARS-CoV-2 apresenta maior infectividade dentre essas linhagens virais devido à maior afinidade de ligação da proteína *spike* ao receptor celular ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) contribuindo significativamente para o aumento da transmissibilidade e contagiosidade (V´kovski *et al*., 2021; Li, 2016).

Diante da constante possibilidade de uma nova pandemia, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias profiláticas e terapêuticas contra a COVID-19. Uma abordagem promissora é a prospecção de moléculas bioativas de microrganismos com potencial atividade antiviral, destacando-se os biossurfactantes (Khalifa *et al*., 2021). Mais recentemente, Johsson *et al*., (2019) descrevera, a eficiência da surfactina na inibição da replicação do SARS-CoV e do MERS-CoV, sugerindo assim uma potencial atividade antiviral da surfactina contra o SARS-CoV-2. Considerando a capacidade da surfactina de interagir com os fosfolipídios de membrana gerando desestabilização lipídica ou formação de poros na membrana (Crovella *et a*l., 2022; Yuan *et al*., 2018), existe a possibilidade da surfactina diminuir a capacidade infecciosa, o que sugere uma potencial utilização no tratamento de infecções de COVID-19 (Johsson *et al*., 2019; Yuan *et al*., 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados os isolados de *Bacillus subtilis*, gentilmente cedidos pelos grupos de pesquisa/colaboradores das respectivas instituições: i) UCP0999 (Grupos de Pesquisa em Processos Tecnológicos e Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP; e em Desenvolvimento de Soluções Químicas e Biotecnológicas, Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação, IATI); ii) UFRA92 (Grupo de Pesquisa em Agrobiodiversidade e Desenvolvimento Sustentável na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia); iii) UFPEDA458 (Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos, UFPE); e AGRO - (agricultores do município de Primavera, PE; similar a QST713). A cultura dos isolados foi realizada em placas contendo meio sólido inclinado Luria Bertani (LB), incubadas em estufa microbiológica a 30ºC por 24 h e posteriormente armazenados a 4ºC durante período máximo de 60 dias.

3.1 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo do isolado foi preparado em elaborado meio de cultura composto por uma solução tampão fosfato de potássio (mono e dibásico) a 100,0 mM e pH 7,0, à qual foram adicionados 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 4% de melaço (m/v) e 1,0 mL/L de uma solução de estoque de sais. Após o preparo, 250 mL do meio de cultura foram acondicionados em Erlenmeyers de 500 mL, procedendo-se a esterilização destes em autoclave a 120ºC por 20 min e armazenados durante 2 dias a fim de verificar a esterilidade do meio. Posteriormente, os frascos foram inoculados assepticamente a partir da cultura presente no meio de manutenção Luria Bertani e incubados em estufa microbiológica sob rotação a 200 rpm orbital por 19 horas a 30ºC.

3.2 CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE SURFACTINA

A produção da surfactina foi realizada em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL do mesmo meio de cultura utilizado no inóculo. Dentro de câmara de fluxo laminar, 10 mL do inóculo contendo os isolados de *Bacillus subtilis* foram

transferidos para os frascos com o meio de produção da surfactina. Após essa etapa, os frascos foram novamente incubados em estufa microbiológica com rotação orbital de 200 rpm a 30ºC.

3.3 EXTRAÇÃO DA SURFACTINA

Decorrido o tempo de cultivo para produção da surfactina, o meio foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado sob rotação de 2.500 rpm, a 4ºC por 15 minutos para recolhimento do sobrenadante, o qual foi acidificado ajustando seu pH para 2,0 com HCl. O meio acidificado ficou em repouso a 4ºC durante 12 h para formação do precipitado. Após esse período foi realizada nova centrifugação a 2.500 rpm a 4ºC por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 5 mL de água destilada, tendo o seu pH ajustado para 7,0 com NaOH. Posteriormente foi adicionado 5 mL de solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v) no tubo contendo o precipitado. A solução foi agitada durante 1 min em vortex e logo em seguida submetida sob rotação de 2.500 rpm, a 4ºC por 5 minutos para separação das fases. A fase orgânica foi coletada com ajuda de seringa e transferida para outro tubo. Após essa etapa, a fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador a 40ºC e o concentrado ressuspendido em 5 mL de solução de metanol-acetonitrila (1:1, v/v), o qual foi armazenado a -20ºC.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA

A detecção e quantificação da surfactina foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em parceria com o Laboratório de Cromatografia Instrumental – UFPE. Foi utilizada coluna de fase reversa C-18 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (Agilent). A fase móvel foi composta por 20 % de ácido trifluoroacético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila no fluxo de 1,0 mL/min a 30ºC. A amostra contendo o lipopeptídeo foi analisada utilizando-se um detector de absorção UV (205nm) com tempo de análise de 30 min, conforme descrito por Mubarak *et al*., (2015). As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração com surfactina padrão 95 % (Sigma-Aldrich), em faixa de concentração de 0,01 a 0,6 mg/mL.

3.5 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Foi realizada a medição do índice de emulsificação E_{24}, (Cooper & Goldenberg, 1987; Bento *et al*., 2005) através da adição de 1 ml de óleo querosene em 1 ml de surfactina. A solução foi vortexada até a formação de emulsão estável, observada por alteração na cor e altura das fases. A altura da emulsão foi então mensurada, e após 24 h, para determinação do índice através da porcentagem de altura da camada de emulsificação dividida pela altura total do líquido.

3.6 TESTE DE TOXICIDADE

Foi realizado teste de toxicidade das surfactinas na espécie macrófita aquática indicadora *Lemna aequinoctialis* cultivada em meio SH ½ força (Schenk e Hildebrant), em placa de 24 poços de 1 ml, utilizando 100 µl, 75 µl, 50 µl, 25 µl e 12,5 µl dos extratos dos isolados de *Bacillus subtilis*, analisando a clorose e crescimento das frondes durante 5 dias. Em cada poço da placa foram inicialmente colocados 5 frondes de *L. aequinoctialis* clone M1 (LGPP, UFPE). A taxa de crescimento relativo do número de frondes (RFNGR, em dia^{-1}) foi determinada pela fórmula $RFNGR = (ln\ FN_2 - ln\ FN_1) / (t_2 - t_1)$, onde FN1 = número de frondes no tempo inicial (t_1), FN2 = número de frondes no tempo final (t_2), t1 = tempo inicial (em dias), t2 = tempo final (em dias) e ln = logaritmo natural (base *e*). conforme Wang *et al* (2014).

3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

A análise da atividade antiviral foi feita em parceria com o Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), localizado na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), seguindo metodologia similar à descrita por Johnson *et al* (2019). Foram utilizadas linhagens celulares Vero infectadas com cepas do SARS-CoV-2. As células foram cultivadas em placa de cultura de tecidos de 48 poços contendo concentração inicial de células de 2×10^4 células / poço, as quais foram incubadas por 24 h (37 °C, 5 %

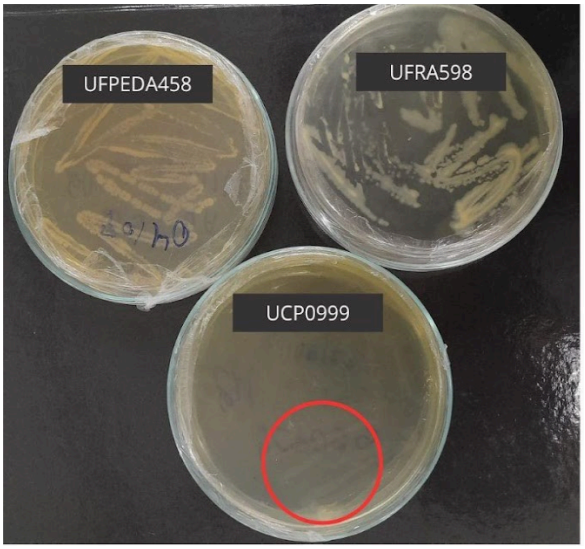
CO_2). As culturas de monocamadas confluentes foram tratadas com linhagens virais do SARS-CoV-2 em MOI de 1,0, ou seja, aproximadamente uma partícula viral por célula, diluídos em 100 µL de meio de cultura contendo 2 % (v / v) de soro fetal bovino por 2 h a 37 °C e 5 % de CO_2. Após 2 horas do cultivo com a linhagem viral, as células foram tratadas com a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* UFRA92 ou inibidor viral 6-metilmercaptopurina ribosídica (6MMPr) por 1 h. Posteriormente foi realizada a contagem das células não lisadas bem como a análise de titulação viral.

4. RESULTADOS

4.1 CULTIVO DE *Bacillus subtilis*

Os isolados de *Bacillus subtilis* potencialmente produtores de surfactina apresentaram crescimento homogêneo, sem sinais aparentes de contaminação. As colônias dos isolados UFPEDA458, UFRA92 e UCP0999 possuem aspectos fenotípicos característicos de aparência esbranquiçada e textura mucilaginosa como observa-se na figura 3.

Figura 3 – Isolados de *Bacillus subtilis* inoculados em placas. Estrias de UCP0999 circuladas em vermelho para melhor visualização.



4.2 ANÁLISE POR HPLC

A análise por HPLC confirmou a presença da surfactina nas amostras testadas, com tempos de retenção e áreas de pico compatíveis com os padrões analisados. As soluções padrão apresentaram um aumento linear na área dos picos cromatográficos conforme a concentração aumentava, com áreas dos picos variando entre medidas de 5,775 a 62,841. Entre as amostras testadas, o isolado UCP0999 exibiu a maior área de pico (20,840), seguido pelo isolado UFPEDA458 (17,230), enquanto UFRA e AGRO apresentaram áreas menores, 13,310 e 11,461, respectivamente. Ao avaliar o primeiro pico cromatográfico das amostras com magnificação de 4 vezes no cromatorama, observou-se que os valores variaram entre 11,461 e 15,119, indicando diferenças na concentração de surfactina entre os

isolados. As concentrações determinadas foram, respectivamente AGRO: 34.1 mg/L; UFRA:45.1 mg/L; UFPEDA:54.0 mg/L; UCP0999:73.7 mg/L.

Esses dados sugerem que os isolados possuem diferentes capacidades de produção do biossurfactante, com destaque para UFPEDA e UCP, que demonstraram maior rendimento na produção de surfactina.

Figura 4 - Concentrações de surfactina dos isolados comparadas a concentração de surfactina padrão.

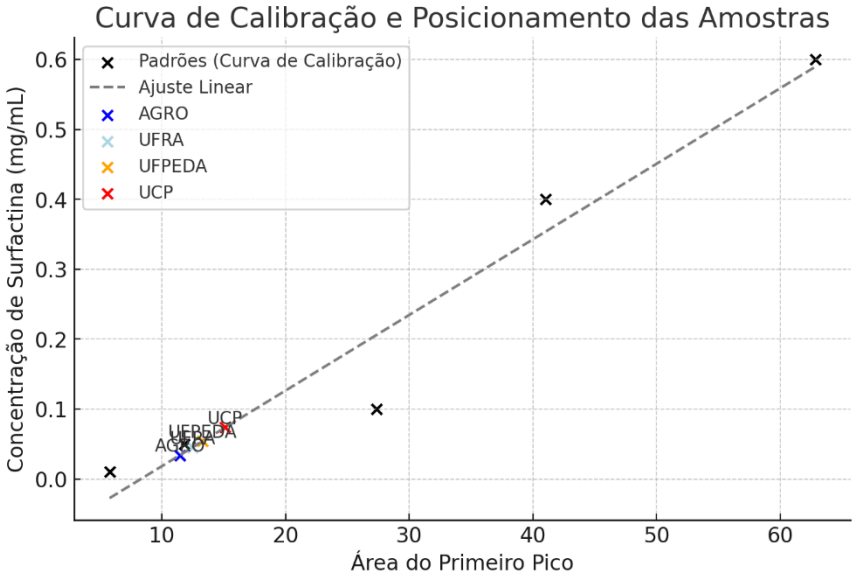
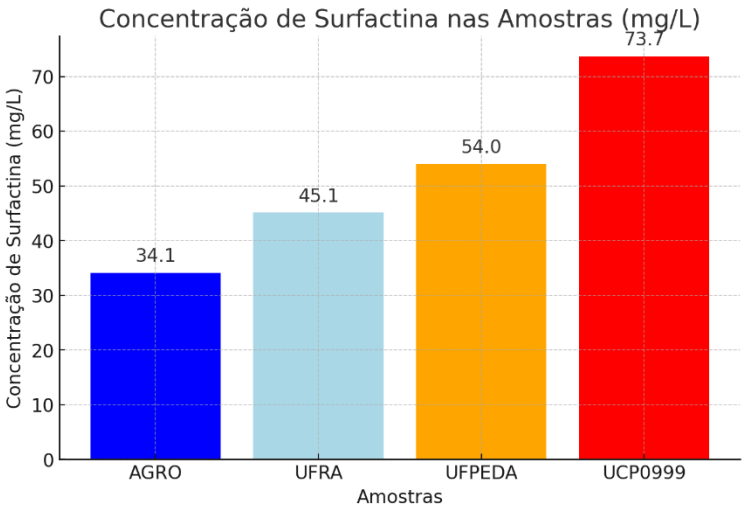


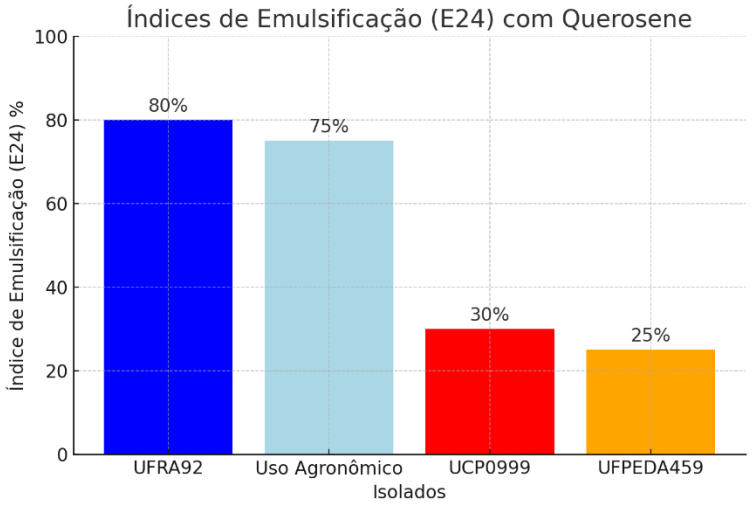
Figura 5 - Concentrações de surfactina encontradas em cada isolado.



4.3 ÍNDICES DE EMULSIFICAÇÃO

A surfactina do isolado UFRA teve maior índice (80%), seguido pelos isolados AGRO com 75%, UCP 30% e UFPEDA, em último, com apenas 25%.

Figura 6 - Índices de emulsificação após teste de 24 horas em querosene.



4.4 TESTE DE TOXICIDADE EM *Lemna aequinoctialis*.

As surfactinas de todos os isolados testados causaram diminuição na capacidade de crescimento de *Lemna aequinoctialis* nas três maiores concentrações (Tabela 1). Os isolados UFRA e AGRO foram os que promoveram menor diminuição na capacidade de crescimento, e o isolado UCP foi o único que causou diminuição significativa, levando a morte vegetal(Tabela 2; Figura 4).

As plantas tratadas com extratos dos isolados UCP apresentaram *bleaching* em todas as concentrações, as tratadas com UFPEDA e UFRA apresentaram clorose a partir da segunda concentração, além de sinais de *bleaching* nos tratamentos com 25 µl, 75µl e 100 µl em UFRA, e com 50 µl e 75 µl de UFPEDA. As plantas tratadas com extratos do isolado AGRO não apresentaram clorose em nenhuma concentração.

Figura 7 - Frondes de *Lemna aequinoctialis*. em placa após 5 dias de cultivo com diferentes doses de extrato de surfactina para cada isolado.

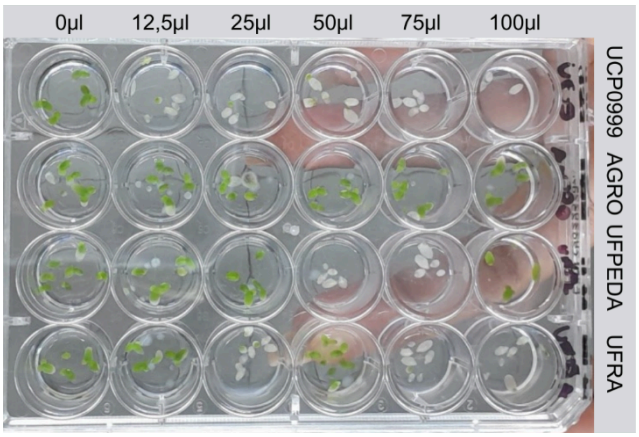


Figura 8- Concentrações de surfactina por poço após análise quantitativa por HPLC

Dose	12,5uL	25uL	50uL	75uL	100uL
UCP0999	3,07ng/uL	6,14ng/uL	12,28ng/uL	18,42 ng/uL	24,56 ng/uL
AGRO	1,42ng/uL	2,84ng/uL	5,68ng/uL	8,52 ng/uL	11,36 ng/uL
UFPEDA458	2,25ng/uL	4,5ng/uL	9 ng/uL	13,5 ng/uL	18 ng/uL
UFRA92	1,87ng/uL	3,37ng/uL	7,48 ng/uL	11,22 ng/uL	14,96 ng/uL

Figura 9 - Sinais de toxicidade em *Lemna aequinoctialis*. A: Clorose, amarelamento da fronde por falta de clorofila. B: *Bleaching,* embranquecimento da fronde por perda de clorofila.

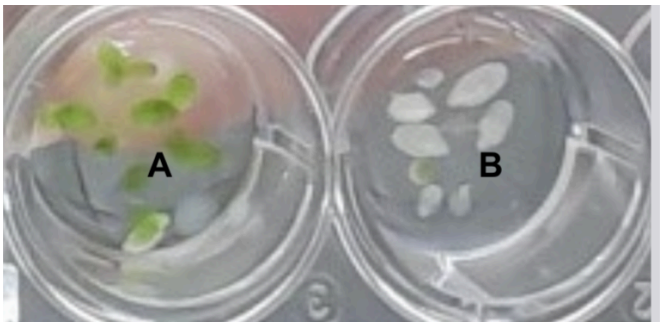


Figura 10 - Número de frondes de *Lemna aequinoctialis* por poço após 5 dias de cultivo nas diferentes concentrações de surfactina dos isolados de *B. subtilis*.

Dose (µl)	C	12,5	25	50	75	100
UFRA	7	11	9	10	5	5
UFPEDA458	8	7	6	5	4	4

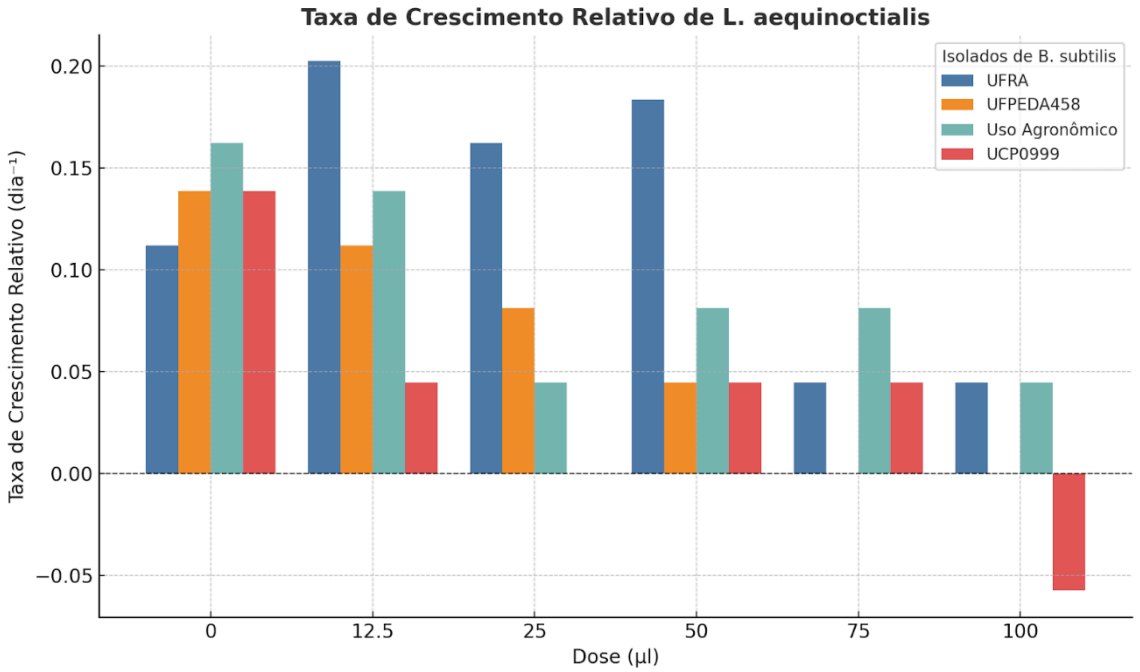
AGRO	9	8	5	6	6	5
UCP0999	8	5	4	5	5	3

Figura 11 - Taxa de crescimento relativo do número de frondes de *Lemna aequinoctialis*. (RFNGR, em dia^{-1}) por poço após 5 dias de cultivo nas diferentes concentrações de surfactina dos isolados de *Bacillus subtilis.*

Dose (µl)	0	12,5	25	50	75	100
UFRA	0,1119	0,2023	0,1622	0,1833	0,0446	0,0446
UFPEDA458	0,1386	0,1119	0,0811	0,0446	0,0000	0,0000
Uso Agronômico	0,1622	0,1386	0,0446	0,0811	0,0811	0,0446
UCP0999	0,1386	0,0446	0,0000	0,0446	0,0446	-0,0575

.

Figura 12 - Taxa de crescimento relativo do número de frondes de *L. aequinoctialis* (RFNGR, eixo das ordenadas, em dia^{-1}) por poço após 5 dias de cultivo nas doses de 0, 12,5 , 25, 50, 75 e 100 µl de surfactina dos isolados de *Bacillus subtilis.*



4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

A surfactina não demonstrou capacidade antiviral em células já infectadas por SARS-CoV-2. Como demonstrado na figura 10, não houve diferença significativa entre a contagem viral do controle negativo (infecção sem tratamento) e o tratamento com surfactina produzida pelo isolado UFRA92. O isolado UFRA92 foi utilizado no teste antiviral por conta do seu alto índice de emulsificação, que em teoria aumentaria a capacidade de lise da membrana viral.

Figura 13 - Titulação do SARS-CoV-2 após o tratamento do vírus com a surfactina produzida pelo isolado de *Bacillus subtilis* UFRA-92.

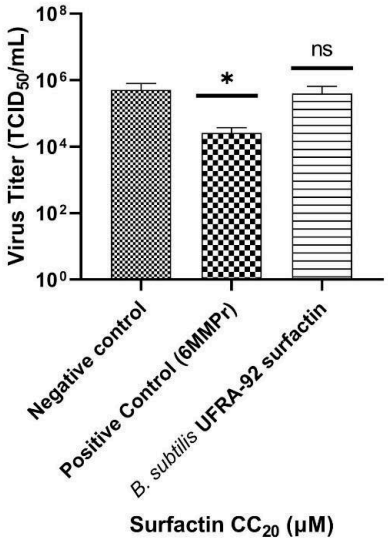
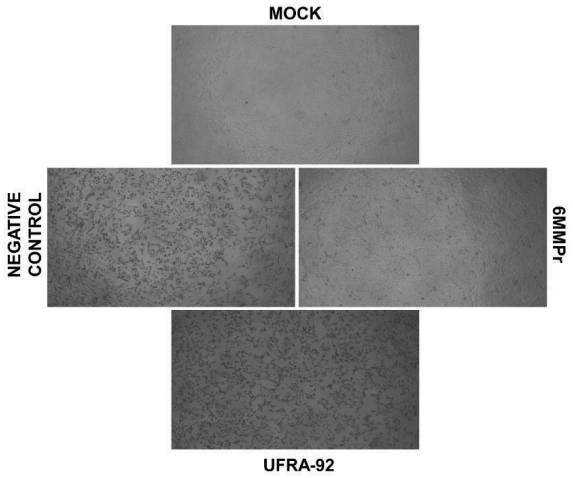


Figura 14 - Microscopia das células Vero padrão (*mock*); contaminadas por SARS-CoV-2 sem tratamento *(negative control*); contaminadas por SARS-CoV-2 + tratamento com inibidor viral (6MMPr); contaminadas por SARS-CoV-2 + tratamento com surfactina do isolado UFRA-92 (UFRA-92).



5 DISCUSSÃO

O cultivo dos isolados de *Bacillus subtilis* foi bem sucedido, com colônias em crescimento tanto vertical como lateral, indicativo de que o meio sólido foi capaz de prover nutrientes e sais suficientes para a proliferação da bactéria, como mostram Tasaki; Nakayama e Shoji (2017). Foi confirmada a efetividade do meio de cultura com melaço na produção de surfactina, sendo produzida de 70 (UCP099) a 30mg/L (AGRO), estes resultados ficam dentro da faixa de produção de outros estudos, como o de Rocha (2017) que foi capaz de obter de 199,45 ± 0,13 mg/L utilizando glicerol como meio de produção. A utilização de glicerol como substrato na produção de biossurfactantes tem se mostrado uma estratégia promissora para otimizar a produção de surfactina. Volpato *et al*. (2021) realizaram uma revisão abrangente sobre o uso de glicerol, um coproduto abundante da indústria de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Os autores destacaram que o glicerol não apenas serve como substrato eficiente, mas também contribui para a redução de custos de produção e agrega valor a um resíduo industrial, já que foi capaz de produzir de 263,6 a 1931 mg/L. É de interesse de otimização econômica explorar outras fontes de carbono, sugerindo que futuros estudos se concentrem na avaliação e otimização de diversos substratos, com o intuito de estabelecer protocolos mais eficientes e escaláveis para a produção de surfactina em nível industrial.

A análise por HPLC demonstrou uma diferença entre a capacidade de produção dos isolados, sendo o isolado UCP0999 o mais eficiente, produzindo 73,7mg/L de surfactina, 26% a mais que o segundo maior produtor, UFPEDA, com 54,0mg/L. Estes resultados se assemelham aos de Geissler *et al*., (2019), que mostra a diferença da capacidade de produção de surfactina em diferentes isolados, advinda das diferenças genéticas de cada um. A descoberta de isolados com maior capacidade de produção facilita o desenvolvimento de estratégias de otimização genética para o aumento da produção e com isso a diminuição dos custos do processo (Hermann *et al*., 2025; Jing *et al*., 2023).

A surfactina do isolado UFRA teve maior índice de emulsificação (80%), seguido pelo AGRO com 75%, UCP com 30% e UFPEDA com 25%. Os índices ficam na faixa normal de produção que é alterada pela variação do isolado e pelas

características ambientais da produção do surfactante (Fernandes *et al*., 2024). Segundo Larini *et al*., (2017) a surfactina tem capacidade de emulsificação de até 90% em diesel. O alto índice de emulsificação do isolado AGRO sugere alto potencial na biorremediação de derramamento de óleo (Fernandes *et al*., 2024; Larini *et al*., 2017).

A surfactina extraída do isolado UFRA92 não manteve a integridade celular na concentração testada, enquanto o padrão 6MMPr demonstrou seletividade antiviral sem afetar a viabilidade celular. Esses resultados podem ser explicados por diferenças estruturais entre as moléculas, conforme discutido por Chowdhury, Baindara, Mandal (2021), já que pequenas variações na molécula influenciam sua interação com membranas celulares e virais.

Quando aplicada a surfactina na planta aquática não houve morte vegetal em nenhuma concentração além da maior, de 24,56ng/uL. Resultados semelhantes foram observados por Korbut *et al*. (2022) que relatou que o lipopeptídeo SPH6 não apresentou toxicidade significativa em organismos vegetais, o que sugere que lipopeptídeos biossurfactantes podem ser utilizados, em determinadas concentrações, em ambientes com presença de organismos vegetais sem causar efeitos reversos. Em contraste com os dados de Yuan *et al* (2018), que demonstraram que a surfactina inibe a fusão da membrana durante a invasão de células epiteliais por vírus envelopados – ação atribuída às suas propriedades anfifílicas que desestabilizam a bicamada lipídica do envelope viral – nossos resultados com a surfactina produzida pelo isolado UFRA92 não evidenciaram atividade antiviral significativa contra o SARS-CoV-2. Enquanto Yuan *et al*. (2018) relataram que a surfactina interfere eficazmente na fusão membranar, reduzindo a infectividade viral, a surfactina extraída de UFRA92 não atingiu níveis comparáveis de inibição, possivelmente devido a diferenças na estrutura do isoforma produzido, na concentração utilizada ou nos métodos de purificação empregados. Essa discrepância ressalta a importância de otimizar os protocolos de fermentação e purificação para assegurar a obtenção da forma bioativa da surfactina, capaz de exercer seu potencial antiviral conforme demonstrado por Yuan *et al*. (2018).

6 CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou que a extração de surfactina utilizando o meio de cultivo à base de melaço foi adequada. Ao longo dos experimentos, foi possível observar a capacidade dos diferentes isolados utilizados para a produção de surfactina nesse meio, destacando-se, em termos de eficiência, os isolados UFPEDA e UCP.

Os testes de emulsificação realizados indicaram os níveis de atividade produzidos por cada isolado, onde se destacaram os isolados AGRO e UFRA92 possuindo mesmo com menor concentração maior atividade emulsificante.

Os testes de toxicidade demonstraram que não houve prejuízo intenso aparente ao crescimento vegetal, embora ainda seja necessário verificar a significância estatística dos resultados. Esses resultados sugerem que a surfactina pode ser uma alternativa viável para uso em processos de biorremediação com baixo dano a organismos aquáticos.

A análise de atividade antiviral frente ao SARS-CoV-2 revela que não houve capacidade antiviral. Enquanto 6MMPr apresentou capacidade de reduzir a replicação do vírus, mantendo a viabilidade celular, a surfactina extraída do isolado UFRA92 não conseguiu diminuir a contagem viral após a infecção na concentração utilizada.

Os resultados apresentados podem contribuir para o avanço no uso biotecnológico de microrganismos produtores de surfactina e da própria surfactina em diferentes áreas, incluindo biorremediação e terapias antivirais. Estudos futuros devem priorizar a otimização da produção, a redução de custos e a ampliação dos testes de toxicidade para garantir a viabilidade ambiental e biomédica do composto.

REFERÊNCIAS

AHN, C. K. et al. Soil washing using various nonionic surfactants and their recovery by selective adsorption with activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1-3, p. 153-160, 2008.

ALMEIDA, Grazieny Aparecida Mendes de et al. Produção de biossurfactante por Lysinibacillus sp. e Bacillus sp. a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. Matéria (Rio de Janeiro), [S.L.], v. 25, n. 4, p. 1-2, 2020.

ARNAOUTELI, Sofia et al. Bacillus subtilis biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 600-614, 2021.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409-414, 2007.

BENTO, F. M. et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, Alemanha, v. 160, n. 3, p. 249-255, mar. 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.005. Acesso em: 24 jan. 2025.

BERTOLDI, Crislaine F. et al. Vestígios do derrame de petróleo de 2019: avaliação da presença de HPA e BTEX em produtos de pesca. Química Nova, v. 47, n. 10, p. e-20240063, 2024.

BISWAS, Anup; MONDAL, Biplab. A Brief Review on Aromatic Volatile Organic Compounds. Int J Adv Sci Res Manag, v. 4, n. 2, p. 1-6, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Painel Coronavírus – COVID-19*. Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html. Acesso em: 24 jan. 2025.

CAMPELLO, Felipe Arrelaro. Poluição: causas, consequências e soluções. **Editora Senac São Paulo**, 2023.

CERQUEIRA, Walter Ramos Pinto et al. Registro de petróleo em poríferos e cnidários durante o impacto agudo de derramamento no Nordeste brasileiro em 2019**. Scientia Plena**, v. 16, n. 8, 2020

CHEN, Wei-Chuan; JUANG, Ruey-Shin; WEI, Yu-Hong. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms**. Biochemical Engineering Journal,** v. 103, p. 158-169, 2015.

CHIRANI, Mahboobeh Rafieepoor et al. Environmental impact of increased soap consumption during COVID-19 pandemic: Biodegradable soap production and sustainable packaging. **Science of the Total Environment**, v. 796, p. 149013, 2021.

CHOWDHURY, Trinath; BAINDARA, Piyush; MANDAL, Santi M. LPD-12: a promising lipopeptide to control COVID-19. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 1, p. 106218, 2020.

CROVELLA, Sergio et al. Surfactin bacterial antiviral lipopeptide blocks in vitro replication of SARS-CoV-2. **Applied Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 680-687, 2022.

FAKRUDDIN, M. D. Biosurfactant: Production and Application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, Londres, v. 3, n. 4, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000124. Acesso em: 24 jan. 2025.

FERNANDES, P. L. et al. Microbial enhanced oil recovery: Use of metabolic products of Bacillus subtilis RI4914 in non-consolidated porous media and influence of environmental parameters. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 697, p. 134431, 2024.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. *Surfactants Market Size, Share & Industry Analysis, By Type (Anionic, Cationic, Non-ionic, Zwitterionic), By Application (Detergents, Personal Care, Textiles, Elastomers & Plastics, Others), and Regional Forecast, 2024–2032*. Fortune Business Insights, 2024. Disponível em: https://www.fortunebusinessinsights.com/surfactants-market-102385. Acesso em: 24 jan. 2025.

GEISSLER, Mareen et al. Evaluation of surfactin synthesis in a genome reduced Bacillus subtilis strain. **AMB Express**, v. 9, p. 1-14, 2019.

HERMANN, Alexander et al. Genetic Code Expansion for Controlled Surfactin Production in a High Cell-Density Bacillus subtilis Strain. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 353, 2025.

JOHNSON, Bryan A. et al. Peptidoglycan-associated cyclic lipopeptide disrupts viral infectivity. **Journal of virology**, v. 93, n. 22, p. 10.1128/jvi. 01282-19, 2019.

JING, Ya-Fei et al. Genetic engineering of the branched-chain fatty acid biosynthesis pathway to enhance surfactin production from Bacillus subtilis. **Biotechnology and Applied Biochemistry,** v. 70, n. 1, p. 238-248, 2023.

KIM, Irene S. et al. Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 1, p. E28-E36, 2017.

KHALIFA, S. A. M. et al. Screening for natural and derived bio-active compounds in preclinical and clinical studies: One of the frontlines of fighting the coronaviruses pandemic. **Phytomedicine**, Alemanha, v. 85, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153311. Acesso em: 24 jan. 2025.

KHAN, Shamshad et al. Global soil pollution by toxic elements: Current status and future perspectives on the risk assessment and remediation strategies–A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 417, p. 126039, 2021.

KORBUT, Rozalia et al. Toxicity of the antiparasitic lipopeptide biosurfactant SPH6 to green algae, cyanobacteria, crustaceans and zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 243, p. 106072, 2022.

KOVÁCS, Ákos T. Bacillus subtilis. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.

LARINI, Mariana Munhoz et al. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência**, v. 17, n. 2, p. 105-118, 2017.

LI, Fang. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. Annual review of virology, v. 3, n. 1, p. 237-261, 2016.

LILGE, Lars et al. Surfactin shows relatively low antimicrobial activity against Bacillus subtilis and other bacterial model organisms in the absence of synergistic metabolites. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 779, 2022.

LIU, Jianghong et al. Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oilfield wastewater. **Indian journal of microbiology**, v. 53, p. 168-174, 2013.

MAO, Xuhui et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 285, p. 419-435, 2015.

MYERS, Drew. **Surfactant science and technology**. John Wiley & Sons, 2020.

MEENA, Khem Raj; SHARMA, Abhishek; KANWAR, Shamsher S. Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from Bacillus subtilis KLP2015. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 423-433, 2020.

MUBARAK, Muhammad Qadri Effendy et al. A simple and effective isocratic HPLC method for fast identification and quantification of surfactin. **Sains Malays**, v. 44, n. 1, p. 115-120, 2015.

NASCIMENTO, Regina Célia Macêdo et al. Derramamento de óleo na zona costeira do Brasil:: Uma análise das unidades de conservação marinhas. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, 2022.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Surfactin. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Surfactin#section=Biologic-Description. Acesso em: 2 mar. 2025.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013. Acesso em: 24 jan. 2025.

PATEL, Seema et al. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 27-37, 2019.

PENA, Paulo Gilvane Lopes et al. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de saúde pública**, v. 36, p. e00231019, 2020.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.

REZAEI, Mohsen et al. Enhanced biodegradation of styrene vapors in the biotrickling filter inoculated with biosurfactant-generating bacteria under H2O2 stimulation. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135325, 2020.

RIBEIRO, Beatriz G.; GUERRA, Jenyffer MC; SARUBBO, Leonie A. Biosurfactants: production and application prospects in the food industry. **Biotechnology progress**, v. 36, n. 5, p. e3030, 2020.

ROCHA, Patrícia Maria. Produção de surfactina por Bacillus subtilis UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como substrato. Universidade Federal do Rio Grande Do Norte-UFRN, 2017.

SANTOS, Vanessa Santana Vieira; SILVEIRA, Edgar; PEREIRA, Boscolli Barbosa. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. **Journal of toxicology and environmental health,** part B, v. 21, n. 6-8, p. 382-399, 2018. SHAH, Mansoor Ul Hassan et al. A binary mixture of a biosurfactant and an ionic liquid surfactant as a green dispersant for oil spill remediation. **Journal of Molecular liquids,** v. 280, p. 111-119, 2019.

SANTOS, Danyelle Khadydja F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SANTOS, A. P. P.; SILVA, M. D. S.; COSTA, E. V. L. Biossurfactantes: Uma alternativa para o mercado industrial. **Journal of Social, Technological and Environmental Science**, Paraná, v. 5, n. 1, p. 88-103, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.21664/2238-8869.2016v5i1.p88-103. Acesso em: 24 jan. 2025.

SEYDLOVÁ, Gabriela; SVOBODOVÁ, Jaroslava. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, p. 123-133, 2008.

SILVA, Ivison A. et al. Oil spills: impacts and perspectives of treatment technologies with focus on the use of green surfactants. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 3, p. 143, 2022.

SILVA, Débora Caribé Passos et al. Derramamento de óleo no mar e implicações tóxicas da exposição aos compostos químicos do petróleo. **Revista Contexto & Saúde**, v. 21, n. 44, p. 332-344, 2021.

SHAH, Afzal et al. Micelles as soil and water decontamination agents. **Chemical reviews**, v. 116, n. 10, p. 6042-6074, 2016.

SCHENK, Roy U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian journal of botany**, v. 50, n. 1, p. 199-204, 1972.

SOHRABI, C. et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). **International Journal of Surgery**, Reino Unido, v. 76, p. 71-76, fev. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.02.034. Acesso em: 24 jan. 2025.

SOULE, M. H. Identity of bacillus subtilis, Cohn 1872. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 191-215, 1932.

TASAKI, Sohei; NAKAYAMA, Madoka; SHOJI, Wataru. Morphologies of Bacillus subtilis communities responding to environmental variation. **Development, Growth & Differentiation**, v. 59, n. 5, p. 369-378, 2017.

VOLPATO, Caroline Portilho Trentini et al. Utilização de glicerol como substrato na produção de biossurfactante. **Research, Society and Development,** v. 11, n. 16, p. e474111638391-e474111638391, 2022.

VOLLENBROICH, Dirk et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin fromBacillus subtilis. **Biologicals**, v. 25, n. 3, p. 289-297, 1997.

V'KOVSKI, Philip et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

WANG, Xiaoqing et al. Bacillus subtilis and surfactin inhibit the transmissible gastroenteritis virus from entering the intestinal epithelial cells. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 2, p. BSR20170082, 2017.

WANG, Wenguo et al. Effects of high ammonium level on biomass accumulation of common duckweed Lemna minor L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 14202-14210, 2014.

WAGENER, Angela de Luca Rebello et al. Avaliação de contaminantes orgânicos em águas superficiais da Bacia de Campos. **In: Quimica Ambiental**. Campus, 2017. p. 157-178.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard: Cases*. World Health Organization, 2024. Disponível em: https://data.who.int/dashboards/covid19/cases. Acesso em: 24 jan. 2025.

YUAN, Lvfeng et al. Surfactin inhibits membrane fusion during invasion of epithelial cells by enveloped viruses. **Journal of virology**, v. 92, n. 21, p. 10.1128/jvi. 00809-18, 2018.