

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Coordenação de Engenharia Química/CCET
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC



NIELSON BRITO SIROTHEAU

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE
POR *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 UTILIZANDO
CONSTITUÍNTES DA MANDIOCA COMO SUBSTRATO**

NIELSON BRITO SIROTHEAU

**POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE
POR *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 UTILIZANDO
CONSTITUÍNTES DA MANDIOCA COMO SUBSTRATO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado de Curso da
Engenharia Química do Centro de Ciências
Exatas e Tecnologia da Universidade
Federal do Maranhão, como parte dos
requisitos para obtenção do diploma de
Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Harvey Alexander Villa Vélez
Co-orientador: Prof(a). Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek

São Luís
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Brito Sirotheau, Nielson.
potencial de produção de biossurfactante por
pseudomonas aeruginosa ATCC27853 utilizando constituintes
da mandioca como substrato / Nielson Brito Sirotheau. -
2022.

41 f.

Coorientador(a): Adenilde Nascimento Mourchrek.
Orientador(a): Harvey Alexander Villa Vélez.
Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do
Maranhão, UFMA, 2022.

1. Biossurfactante. 2. Fermentação. 3. Mandioca. 4.
Pseudomonas aeruginosa. I. Alexander Villa Vélez, Harvey.
II. Nascimento Mourchrek, Adenilde. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. ALEXANDER VILLA VÉLEZ
Orientador – COEQ/CCET/UFMA

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO LIMA DE OLIVEIRA
PPGQUI/UFMA

Eng. Dra. ALDILENE DA SILVA LIMA
PPGQUI/UFMA

10 de Fevereiro de 2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus pela oportunidade de cursar o ensino superior, e em especial, o curso que eu realmente tinha vontade de fazer, engenharia química.

Ao meu pai e familiares por me ajudarem em todo o período em que me dediquei ao curso.

Ao Prof. Dr. Harvey Alexander Villa Vélez, por acreditar e me incentivar na realização desse trabalho, cedendo o seu tempo para a orientação e os recursos do seu laboratório para a realização dos experimentos.

À Prof(a). Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek, por ceder o espaço e os recursos do Laboratório de Análise Microbiológica de Alimentos no Pavilhão Tecnológico da universidade.

À Dra. Amanda Mara Teles pela dedicação e disponibilidade para me orientar e acompanhar o desenvolvimento do trabalho realizado.

“Às vezes as diferenças são tão menores do que o valor que um dá para o outro, que no final é isso o que importa”

Charlie Brown Jr.

SIROTHEAU, N. B. **Potencial de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 utilizando constituintes da mandioca como substrato.** 2022. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

RESUMO

A produção de produtos da mandioca (*Manihot E. Crantz*) gera resíduos agroindustriais como a casca, entrecasca e pontas da raiz. Os resíduos gerados na produção podem representar até 1,8% do volume colhido, existindo a necessidade de estudos para a viabilização do seu aproveitamento na indústria. Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar o potencial de produção de biossurfactante tendo as, entrecasca e polpa, da raiz da mandioca como substratos, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 em fermentação submersa. Nas condições de temperatura à 37° C, razão de aeração 0,4 v/v e agitação de 100 rpm por 22 horas, variou-se a concentração de sólidos e o uso de sais. Foi analisado o comportamento cinético de fermentação, onde observou-se a variação da concentração de substrato (S), concentração de microrganismos (X) e tensão superficial (TS). Além disso, avaliou-se o índice de emulsificação (E_{24}). Os resultados demonstraram melhor produção para a concentração de sólidos à 250 g/L para ambos os substratos, na faixa de 16 a 18% de redução de tensão superficial. O uso de sais desfavoreceu a produção de biossurfactante para ambos os substratos. A cinética de fermentação demonstrou uma estabilidade na queda de tensão superficial após 26 horas de produção para a entrecasca, e de 10 horas para a polpa. As maiores reduções de tensão superficial obtidas foram na faixa de 18 a 20%. Já os melhores índices de emulsificação obtidos foram de, 55% para a entrecasca e de 60% para a polpa, utilizando o querosene como fonte de hidrocarboneto. Demonstrando assim, que a apesar da polpa favorecer maior produção de biossurfactante, a entrecasca também obteve boa produção e, portanto, tem potencial para a realização de mais estudos na área biotecnológica.

Palavras-chave: Biossurfactante, *Pseudomonas aeruginosa*, Fermentação, Mandioca.

SIROTHEUA, N. B. **Biosurfactant production potential by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 using cassava constituents as substrate.** 2022. 41 f. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – for Exact Sciences and Technology at the Federal University of Maranhão, São Luís, 2022.

ABSTRACT

The production of cassava products (*Manihot E. Crantz*) generates agro-industrial residues such as the husk, ribs and root tips. The waste generated in production can represent up to 1.8% of the volume harvested, and there is a need for studies to enable its use in the industry. In this sense, the present work sought to evaluate the potential for biosurfactant production using cassava root bark and pulp as substrates, using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 in submerged fermentation. Under temperature conditions at 37° C, aeration ratio 0.4 v /ve stirring at 100 rpm for 22 hours, the concentration of solids and the use of salts were varied. The kinetic behavior of fermentation was analyzed, where the variation of substrate concentration (S), concentration of microorganisms (X) and surface tension (TS) was observed. In addition, the emulsification index (E24) was evaluated. The results showed better production for the solids concentration at 250 g/L for both substrates, in the range of 16 to 18% of surface tension reduction. The use of salts did not favor the production of biosurfactant for both substrates. The fermentation kinetics showed a stability in the surface tension drop after 26 hours of production for the rind, and 10 hours for the pulp. The greatest surface tension reductions obtained were in the range of 18 to 20%. The best emulsification indexes obtained were 55% for the rind and 60% for the pulp, using kerosene as a hydrocarbon source. Thus, demonstrating that, despite the pulp favoring greater production of biosurfactant, the inner bark also obtained good production and, therefore, has the potential for more studies in the biotechnology area.

Keywords: Biosurfactant. *Pseudomonas aeruginosa*. Fermentation. Cassava.

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	vii
DADOS CURRICULARES.....	viii
AGRADECIMENTOS.....	ix
EPÍGRAFE.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
SUMÁRIO.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 MANDIOCA (<i>Manihot esculenta Crantz</i>).....	14
3.2 RESÍDUOS GERADOS PELO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA	15
3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> COMO PRODUTOR DE BIOSSURFACTANTE	15
3.4 BIOSSURFACTANTES E SUAS APLICAÇÕES.....	16
3.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	17
3.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MICRORGANISMO.....	19
4.1.1 Meio para manutenção e ativação da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
4.2 OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	19
4.3 FERMENTAÇÃO	20
4.3.1 Caldo da entrecasca e polpa como substrato.....	20
4.3.2 Caldo da entrecasca e polpa como substrato com enriquecimento de sais	20
4.3.3 Procedimento para o cultivo	20
4.4 ANÁLISES.....	21
4.4.1 Determinação de açúcar redutor.....	21
4.4.2 Determinação da biomassa celular.....	22
4.4.3 Índice de emulsificação (E_{24}).....	23
4.4.4 Determinação de tensão superficial	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25

5.1 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NO SUBSTRATO.....	25
5.2 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO COM MEIO ENRIQUECIDO.....	28
5.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO.....	29
5.4 ANÁLISE DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO.....	32
6 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são espécies químicas constituídas por uma porção hidrofóbica e por outra hidrofílica, caracterizando-as como moléculas anfipáticas, e conferindo a essas biomoléculas, características como a redução da tensão superficial e interfacial de fluidos imiscíveis, capacidade de emulsificação de hidrocarbonetos, entre outras características de interesse comercial e industrial (SAHARAN et al, 2011).

Uma classe específica de surfactantes, os biossurfactantes vem destacando-se devido a mobilização mundial frente a bioeconomia e a ecossustentabilidade (MARCHANT; BANAT, 2012).

Os biossurfactantes são produzidos por microrganismos e apresentam praticamente todas as características dos surfactantes sintéticos, possuindo assim, baixa ou nenhuma toxicidade em relação ao sintéticos, alta biodegradabilidade, alta biocompatibilidade, alta especificidade e são estáveis em condições ambientais extremas, como, variações de pH, temperatura e salinidade, tornando-os substitutos apropriados dos sintéticos (LIU et al., 2011; SANCHES et al., 2021).

Conforme Barbieri et al. (2012), a principal forma de produção de biotensoativos é por fermentação, que consiste na utilização de fontes de carbono para gerar energia ao organismo microbiológico e produzir biomoléculas.

O uso industrial de biossurfactantes ainda não é competitivo frente a produção de surfactantes derivados de petróleo, dessa forma, uma via oportuna para minimizar impactos ambientais e gerar economia ao processo produtivo, tornando a sua produção mais competitiva é a utilização de resíduos advindos da agroindústria (SENA et al, 2018).

Nesse contexto, faz-se necessário mais pesquisas visando o alinhamento de todos os aspectos citados acima, de forma a atender e viabilizar o seu uso na indústria.

Cruz (2011) afirma que o Brasil produz uma quantidade significativa de resíduos agroindustriais, destacando ainda, o alto valor nutricional e energético desses resíduos, sendo constituídos principalmente, de resíduos sólidos como cascas, caroços e bagaços.

Segundo Meneses et al. (2017) e Santos et al. (2016) esses resíduos possuem uma composição rica em carboidratos e lipídios, e são uma via assimilável pelos microrganismos produtores de biossurfactantes.

Um resíduo da agroindústria que merece atenção, é o advindo da mandioca (*Manihot esculenta*), uma planta tuberosa, que possui um processamento voltado a obtenção de produtos

como a farinha e a fécula, e que pouco se dá atenção a destinação adequada dos resíduos advindos do seu processamento, além disso, a utilização dos seus subprodutos pode contribuir como solução para parte dos problemas ambientais, além de agregar valor a uma matéria-prima que normalmente é descartada e melhorar a economia local (CRUZ, 2011; HOSFALL JR; ABIA; SPIFF, 2006).

Santos (2009) afirma que o resíduo da mandioca é obtido durante o início da fabricação da farinha, sendo constituído de casca, entrecasca e pontas da mandioca, apresentando elevado teor de umidade (85%) e representando um volume de 1,8% do total colhido. Outro resíduo gerado na produção de farinha de mandioca, é a manipueira, um efluente gerado na prensagem da mandioca ralada e lavada durante o seu processamento. Algumas pesquisas utilizando a manipueira para a produção de biotensativo foram realizadas, mas para a casca da mandioca com essa finalidade são quase inexistentes, portanto, faz-se necessário uma investigação mais aprofundada sobre a potencialidade dessa matéria-prima (COSTA et al, 2009; BARROS et al, 2008; NITSCHKE & PASTORE, 2006; BEZERRA, 2012).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm se destacando como produtoras de biossurfactantes sendo utilizadas em muitas pesquisas, para aplicação em recuperação avançada de óleos densos e em outros setores da cadeia do petróleo devido às propriedades ativas de superfície e a estabilidade das emulsões obtidas com os metabólitos sintetizados por espécies desse gênero (DAS & MUKHERJEE, 2005; LI et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 empregando, entrecasca e a polpa da mandioca (*Manihot esculenta*) como substratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de biossurfactante variando a concentração de substrato.
- Avaliar a produção de biossurfactante a partir da fermentação em meio enriquecido de sais diversos.
- Construir e interpretar a curva cinética de fermentação.
- Avaliar a atividade de emulsificação do biossurfactante produzido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MANDIOCA (*Manihot esculenta crantz*)

Coelho (2019) afirma que a mandioca tem seu cultivo em regiões de climas tropicais e subtropicais, sendo a polpa a constituinte da raiz que é consumida. A mandioca pertence à classe das dicotiledôneas, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta*.

Alves (2014) e Coelho (2019) concordam a existência de uma variedade de mandioca, porém, a melhor classificação se dá conforme a sua toxicidade, quando há uma alta concentração de ácido cianídrico, denomina-se popularmente como “brava”, inviabilizando-a ao consumo humano e exigindo processamento para a inativação do cianeto presente em sua composição antes do consumo. Já quando a concentração de cianeto é muito baixa, de forma tolerável ao organismo humano, se denomina “mansa” ou de “mesa”, podendo ser consumida livremente.

A Figura 1 mostra uma raiz da *M. esculenta* de forma a se visualizar as camadas externas e internas.

Figura 1 - Vista externa e interna da mandioca



Fonte: autor (2022)

3.2 RESÍDUOS GERADOS PELO PROCESSAMENTO DA MANDIOCA

Segundo CONAB (2019) a produção de raiz da mandioca para o ano de 2019 foi cerca de 19,8 milhões de toneladas. Dourado et al. (2019) afirma que as maiores produções registradas são nos estados do Pará, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Maranhão. O produto da mandioca é a raiz, sendo o seu processamento destinado a produção de farinha e fecularias, o que acaba por gerar descarte, principalmente das cascas.

A casca da mandioca é o resíduo obtido durante o início da fabricação da farinha da mandioca, sendo constituído de casca, entrecasca e pontas da mandioca, e apresentando elevado teor de umidade (cerca de 85%). O volume gerado chega a atingir 7,8% do total colhido e sua destinação pode não só minimizar problemas ambientais para a indústria, como contribuir com a cadeia produtiva da fécula ou farinha de mandioca se for comercializado, agregando lucro ao seguimento (DOURADO et al., 2019).

A manipueira é o principal efluente, em termos de agressão à natureza, produzido pelas casas de farinha e pelas farinheiras. É o suco ou água de constituição das raízes de aspecto leitoso, de cor amarelo-clara que é extraída das raízes carnosas da mandioca por ocasião da prensagem das raízes frescas, picadas ou raladas na indústria da farinha, e este efluente residuário foi sempre desprezado sem qualquer aproveitamento econômico (CORDEIRO, 2006; CEREDA, 2001).

Fiorda (2013) afirma que independente da escala produtiva, pequenas ou grandes unidades fabris, se gera uma quantidade significativa de resíduos sólidos (casca, entrecasca e bagaço) e líquidos (manipueira e água vegetal).

3.3 *Pseudomonas aeruginosa* COMO PRODUTOR DE BIOSSURFACTANTE

A espécie *Pseudomonas* são bastonetes Gram negativos, de tamanho médio com aproximadamente 1,5–5,0 x 0,5-1,0 µm. São aeróbias, oxidativas, oxidase e catalase positivas, sendo a maioria móvel, através de um ou vários flagelos polares (GOMES, 2008).

Siqueira (2002), Mata (2007) e Linconpan & Trabulsi (2008) caracterizam a espécie do gênero *Pseudomonas aeruginosa* como sendo uma bactéria aeróbia que deriva sua energia de processos oxidativos de carboidratos ao invés de fermentá-los, mas que também pode crescer de forma anaeróbia quando há presença de nitrato, utilizando-o como receptor final de elétrons. Essa versatilidade de assimilação de nutrientes e condições ambientais permitiu o crescimento

da *P. aeruginosa* em solos, água e vegetais, microbiota natural do ser humano, poços de petróleo, entre outros.

Sanchez et al. (2007) e Reis et al. (2011) concordam que em determinadas condições ambientais ocorre a síntese de biomoléculas contendo ramnose-glicolipídios, denominando-as de ramnolipídeos, e que a sua produção é potencializada com aumento de estresse da bactéria através da variação nas condições ambientais, como a privação de nutrientes e exaustão de nitrogênio, mesmo em baixa densidade celular.

Os ramnolipídeos apresentam em sua estrutura uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a moléculas de ácido β hidroxidecanoico. As duas principais moléculas de ramnolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* são raminosil – β – hidroxidecanoil – β – hidroxidecanoato (mono-ramnolipídeo) e raminosil – raminosil – β – hidroxidecanoil – β (LEÃO, 2009; MULLIGAN, 2005).

Monteiro (2007) e Barbosa (2011) afirmam que os ramnolipídeos podem reduzir a tensão superficial da água em até 65,3%, como também promovem a mistura de hidrocarbonetos, a partir da formação de micelas, permitindo assim, uma solubilização mútua com a água.

3.4 BIOSSURFACTANTES E SUAS APLICAÇÕES

Os surfactantes no geral são espécies químicas que possuem a característica singular de reduzir a tensão superficial das substâncias no estado fluido e são constituídos por uma parte hidrofílica (porção polar) e outra hidrofóbica (porção apolar), caracterizando-os como moléculas anfipáticas (DESAI & BANAT, 1997). Visto essas características, os surfactantes se distribuem preferencialmente na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade conforme descrito por Banat et al (2000) e Fathabad (2010).

Em termos práticos, Makkar e Cameotra (2002) informam que a característica de redução superficial confere aplicações de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases.

Segundo Makkar e Cameotra (2002) a obtenção dos surfactantes podem ser a partir de vias sintéticas, originárias do petróleo, ou biológicas, a partir da fermentação de hidrocarbonetos.

07

Os biossurfactantes são caracterizados por Nitchke e Pastore (2002) e Peixoto (2008) como metabólitos, substâncias químicas produzidas por microrganismos com estrutura anfifílica dos surfactantes, existindo uma grande variedade de constituintes para as porções hidrofílicas e hidrofóbicas de sua estrutura. Conforme Peixoto (2008) a parte hidrofílica é

constituída de carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, álcoois, fosfatos ou peptídeo cíclico. A parte hidrofóbica é formada por ácidos graxos de cadeia longa, ou hidroxiácidos.

Nitchke (2002) explica que esses metabólitos possuem baixa toxicidade comparados aos sintéticos e atuam de forma idêntica, além de serem de fácil degradação na água e solo, sendo assim, uma via alternativa de alto valor ambiental.

Os biossurfactantes podem ser utilizados, principalmente, em processos de biorremediação e tratamentos residuais, devido a sua fácil biodegradação em água e solo (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Além disso, podem ser utilizados na limpeza de reservatórios de óleos, com a diminuição de viscosidade e a formação de emulsões de resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem.

Arima et al. (1968) e Peypoux (1999) afirmam que essas biomoléculas podem ser utilizadas com finalidades terapêuticas na inibição de formação de coágulos, canais iônicos em membranas; atividades antibacterianas e antifúngicas; atividade antiviral e antitumoral.

Na indústria alimentícia utiliza-se biossurfactantes como emulsionantes, conferindo consistência, textura e dispersão aos componentes e solubilização de aromas, bem como aplicação na panificação e derivados da carne (BANAT, 2000).

Segundo Brown (1991) esses metabólitos possuem compatibilidade com a pele, possibilitando-os na utilização em produtos de higiene e cosméticos. Observou-se também, aplicação como hidratante para peles e cabelos, produtos de maquiagem e batons. Banat (2000) afirma outras aplicações direcionadas a produtos de limpeza, tintas, mineração, transporte em tubulações, mistura carvão-água, recuperação terciária de petróleo entre outras.

3.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Uma forma de se produzir químicos de alto valor agregado a partir de matéria-prima com baixo custo, é pela via biológica utilizando resíduos da agroindústria, pois, esses resíduos possuem uma composição rica em compostos que são assimiláveis pelos microrganismos e incluem palhas, caules, folhas, cascas, leguminosas, grãos, efluentes ricos em fonte de carbono e demais nutrientes, entre outros (PANESAR e KAUR, 2015).

A obtenção de biossurfactante a partir dessas fontes de matéria-prima gera redução de custos e volume de compostos despejados em corpos receptores, diminuindo assim o impacto ambiental gerado por resíduos de produção, além de valorizar economicamente esses resíduos,

gerando oportunidades de ganhos para grandes e pequenos produtores (ACCORSINI et al, 2012).

Ehrhardt et al. (2014) utilizou resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato para produzir tensoativos por *Bacillus subtilis* e obtiveram uma redução de 20% na tensão superficial do caldo fermentado, conseguindo um índice de emulsificação de 53%. Já Rovina (2018) obteve uma redução de 25% com casca de laranja, utilizando o mesmo microrganismo sob as mesmas condições de operação, alterando apenas o substrato e suas concentrações.

Silva et al, (2010) reduziu a tensão superficial em até 33,72 mN/m em 24 horas utilizando milho-cina na produção do tensoativo e Bezerra (2012) chegou a um índice de emulsificação de 68% utilizando a manipueira como substrato, onde obteve 30% de redução de tensão superficial na sua melhor produção por *Pseudomonas aeruginosa*, após submeter o sistema de fermentação à diversas condições de operação.

3.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Couro et al, (2005) considera dois tipos de vias de produção para a sintetização de produtos a partir da abordagem biológica, a via em estado sólida (FES) e líquida (FSM). A fermentação em estado sólido (FES) utiliza um suporte sólido para o crescimento microbiano, que pode ser sintético, como espuma de poliuretano ou natural como resíduos sólidos ricos em carboidratos e nutrientes.

A fermentação submersa (FSM) consiste na solubilização dos nutrientes para a fermentação em meio líquido, onde neste processo também podem ser utilizados resíduos, como o glicerol, um produto da reação de transesterificação do biodiesel, e que é facilmente metabolizado por muitos microrganismos (CHAMPE et al. 2009).

Couto (2006) informa que em decorrência dessas características, a condução da produção pela FSM possui maior aceitação e facilidade para cultivo em larga escala, pois se obtém um melhor controle das condições de operação.

A FSM possibilita a variação do meio de cultivo, fácil controle biológico em relação ao meio sólido assim como condições ambientais como temperatura, consumo mais uniforme dos nutrientes e fonte de carbono, fornecimento controlado de oxigênio e facilidade de trocas, absorção e excreção, pois as células ficam expostas ao meio, o que conseqüentemente facilita a separação dos metabólitos produzidos em relação a via sólida (REGUKY, 2000; PRIETRO, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado nesse trabalho foi a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 fornecida pelo laboratório de análise de alimentos da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), fazendo parte do estoque de cepas destinadas à realização de trabalhos esporádicos de pesquisas na área da saúde e tecnologia.

4.1.1 Meio para manutenção e ativação da *Pseudomonas aeruginosa*

As cepas da *P. aeruginosa* são mantidas em meio Agar sob refrigeração à 7°C, sendo repicada a cada 90 dias.

Para a ativação das células, a cepa utilizada foi submetida a temperatura de 35°C em incubadora, por no mínimo 24 horas antes da inoculação.

4.2 OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS

Para a produção do biossurfactante realizado neste trabalho, foi utilizado como substrato (fonte de carbono) subprodutos da mandioca (*Manihot esculenta crantz*) com baixo teor de cianeto, raiz comumente produzida na região local, sendo adquirida em feira local no bairro Cidade Operaria em São Luís no estado do Maranhão.

As raízes foram lavadas em água corrente para a retirada da sujidade, após a higienização, separou-se cada parte: casca, entrecasca e polpa.

A entrecasca foi separada da camada mais externa, onde a casca foi descartada logo em seguida, lavada em água corrente, tendo o tamanho reduzido (para facilitar a preparação do caldo), e novamente lavada em água destilada para desprender qualquer outro resíduo.

Foi estabelecido 3 concentrações de sólidos, sendo elas 125g/L, 250g/L e 500g/L. Onde as massas foram pesadas em balança geral, com a ajuda de Beckers, e em seguida solubilizadas em água destilada, sendo liquidificadas por 3 minutos.

A mistura resultante foi processada em centrífuga digital macro (MOD 1128) à 3500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e armazenado em Becker de 500mL e o sólido residual descartado. Posteriormente, o meio foi aquecido em banho-maria até a fervura para

inativar enzimas e microrganismos presentes. O caldo final foi armazenado em frasco de vidro com tampa, após foi resfriado ao natural até obter a temperatura ambiente e armazenado em refrigerador à -12°C para ser conservado. O mesmo procedimento foi realizado com a polpa da mandioca.

Antes da inoculação do microrganismo nos substratos, os caldos foram esterilizados em autoclave à 121°C por 15 minutos e pressão de 1atm.

4.3 FERMENTAÇÃO

4.3.1 Caldo da entrecasca e polpa como substrato

Os caldos para o cultivo foram preparados de forma a obter, um somente com a polpa e o outro somente com a entrecasca da raiz, objetivando avaliar e comparar a produção entre ambos.

Para os primeiros ensaios foi realizado um estudo variando as concentrações de cada substrato (entrecasca e polpa) afim de avaliar a melhor produção em termos de síntese de biossurfactante. Portanto, estabeleceu-se as concentrações de 125g/L, 250g/L e 500g/L, para cada substrato como descrito no tópico 4.3.

4.3.2 Caldo da entrecasca e polpa como substrato com enriquecimento de sais

Para a melhor produção obtida no item 4.3.1, foi realizada uma nova fermentação utilizando ambos os substratos com a adição de sais, objetivando observar uma melhora na produção do biossurfactante.

Foi adicionado ao substrato 5,0mL de solução de sais em uma proporção de 5% v/v (0,5460g/100mL de KH_2PO_4 , 0,4760g/100mL de Na_2HPO_4 , 0,25g/100mL de NH_4Cl , 0,08g/100mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/100mL de NaCl) (Souza, 2009).

4.3.3 Procedimento para o cultivo

Após a esterilização, cada substrato foi deixado à temperatura ambiente até atingir 40 °C. Posteriormente, para cada substrato, foi inoculado com três alçadas de *Pseudomonas aeruginosa* oriundas do meio de manutenção, um volume de 100mL de substrato e levado para

a incubadora.

A produção de biossurfactante foi realizada a partir da técnica de fermentação submersa em batelada utilizando os substratos, entrecasca e polpa, em uma razão de aeração 0,4 v/v, temperatura à 38°C e agitação de 100 rpm por um período de 22 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a fermentação com o uso de sais, no entanto, utilizando 5% v/v de solução de sais.

Para o estudo da cinética de fermentação, a cada 4 horas uma alíquota de 10mL foi retirada do caldo fermentado, para as análises de concentração de substrato, tensão superficial e crescimento de microrganismos, em um período total de 48 horas.

4.4 ANÁLISES

4.4.1 Determinação de açúcar redutor

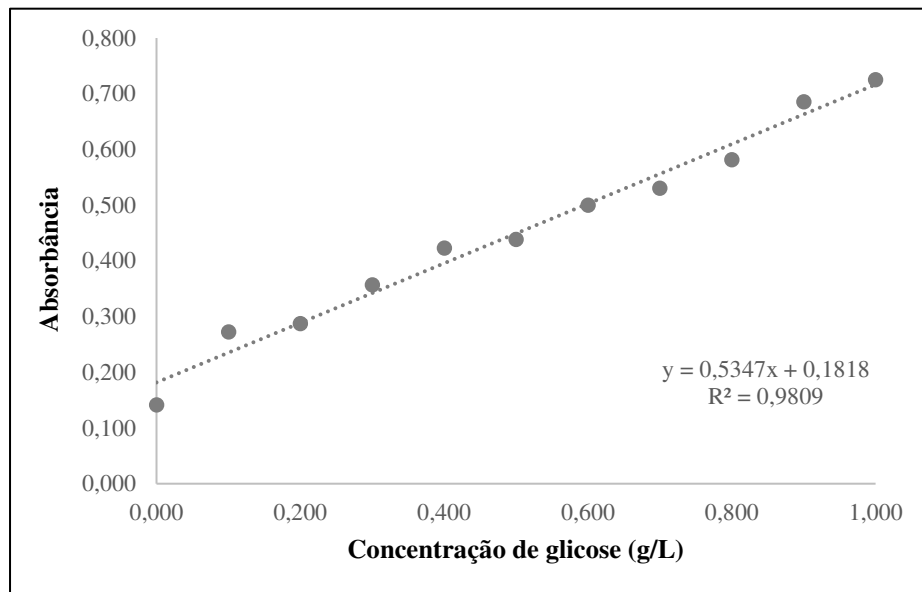
O método para a determinação de açúcar redutor foi realizado de acordo com Miller (1959) a partir de solução de ácido 3,5 - Dinitrosalicílico (DNS).

A característica principal do método é a redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5- nitrosalicílico, ocorrendo simultaneamente a oxidação do grupo aldeído do açúcar ao carboxílico, desenvolvendo-se assim, uma coloração avermelhada, aferida em espectrofotômetro em 540nm.

Uma alíquota de 1mL do sobrenadante resultante da centrifugação do fermentado foi transferida a um tubo de ensaio, onde foi adicionado o mesmo volume de solução DNS, agitando-se vigorosamente a mistura, posteriormente, o tubo foi levado à banho-maria com água em ebulição (100°C) por 15 min. Após, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente, adicionado 10 mL de água destilada e homogeneizado.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV – M51 BEL à 540nm, e posteriormente foi calculado o valor da concentração de açúcar redutor a partir da curva de calibração construída conforme a Figura 3.

Figura 2 - Curva de calibração para açúcar redutor à 540nm



Fonte: autor (2022)

4.4.2 Determinação da biomassa celular

O método da massa seca (peso seco) foi utilizado para obter o valor da concentração de biomassa de acordo com Lobato (2003). Consiste na separação das células do meio de cultivo, secagem e pesagem.

Para a separação das células foi retirado 10,0mL de amostra a partir do fermentado, e centrifugada à 3500 rpm (MOD 1128) por 15 minutos. Anteriormente, os tubos de ensaios foram colocados em estufa à 70°C por 24 horas até obter peso constante, valor de massa obtido em balança geral.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado para a realização de outras análises, e a massa retida nos tubos foi lavada adicionando-se 10mL de água destilada, sendo posteriormente centrifugadas por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi realizado novamente conforme adaptação a descrição de Bezerra (2012). Por fim, as amostras foram colocadas em estufa à 70°C por 24 horas, retiradas e colocadas em dessecadores por 5 minutos, e em seguida, sendo pesadas. Cada ponto foi realizado em duplicata e o valor médio obtido considerado para os cálculos.

O valor de concentração de biomassa (g/L) foi expresso por:

$$m_{seca} = \frac{T_1 - T_2}{5} \times 1000 \quad (1)$$

onde:

m_{seca} = concentração de biomassa seca

T_1 = massa de tubo com biomassa seca

T_2 = massa de tubo vazio

4.4.3 Índice de emulsificação (E₂₄)

O método utilizado foi o de Wei et al. (2005). Onde 3,0mL do sobrenadante do caldo fermentado foi adicionado em um tubo contendo 3,0mL de querosene comercial. O volume resultante foi agitado por 2 minutos e mantido em repouso por 24 horas.

O valor do índice de emulsificação foi obtido pela relação a seguir:

$$E_{24} = \frac{H_{emulsão}}{H_{total}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

E_{24} = índice de emulsificação após 24h (%)

$H_{emulsão}$ = Altura da emulsão no volume da mistura (cm)

H_{total} = Altura total do volume da mistura (cm)

4.4.4 Determinação de tensão superficial

O método utilizado para a determinação da tensão superficial da amostra, com o objetivo de observar a produção de biossurfactante de forma indireta, foi o método do peso da gota conforme Behring et al. (2004), considerando nos cálculos o valor das massas e não do número de gotas com volumes fixados.

Uma bureta foi fixada em suporte universal e acoplada a uma Erlenmeyer, de forma que a parte inferior à torneira ficasse dentro do recipiente coletor. Desta forma evita-se a influência de correntes de ar sobre a formação da gota (BEHRING et al, 2004).

A torneira foi ajustada de modo a tornar a queda das gotas em uma velocidade de aproximadamente 1gota/min, o aparato foi montado em local com o mínimo de vibração. Foram coletadas 10 gotas, sendo o experimento realizado em triplicata à uma temperatura média de 25°C e em seguida, foram aferidas as massas em balança analítica Bel M214Ai.

A partir do cálculo de tensão superficial:

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot f} \quad (3)$$

onde:

γ = tensão superficial do analito líquido (mN/m)

m = massa de uma gota do analito líquido (kg)

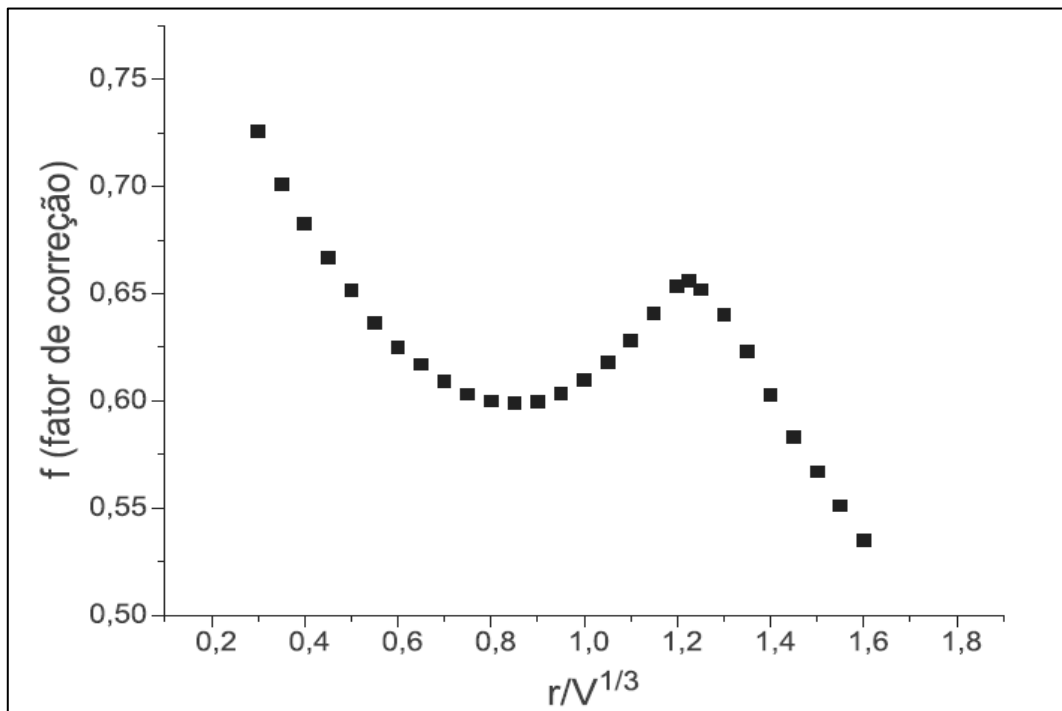
r = raio da circunferência da gota formada na bureta (m)

g = aceleração da gravidade (m/s²)

f = fator de correção (pois a gota formada não se separa da forma esférica)

O fator de correção (f) foi estimado a partir de um gráfico que relaciona o raio e o volume da água, a Figura 3 mostra a curva que correlaciona as variáveis.

Figura 3 - Curva para a obtenção do fator de correção (f)



Fonte: Adaptado de Behring et al, (2004)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em 4 tópicos conforme a evolução dos resultados observados nos experimentos.

O tópico 5.1 é uma avaliação da fermentação das 3 diferentes concentrações de sólidos consideradas para cada substrato, o tópico 5.2 é uma a avaliação dos resultados da fermentação em que houve enriquecimento dos dois tipos de substratos com o uso de sais, e que obtiveram a melhor produção de biossurfactante. Já o tópico 5.3 é referente a interpretação do comportamento cinético de fermentação para a melhor produção obtida de cada substrato. Por fim, o tópico 5.4 foi destinado a avaliar os resultados do índice de emulsificação de todas as fermentações.

5.1 AVALIAÇÃO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NO SUBSTRATO

Os resultados da fermentação variando a concentração de sólidos, da entrecasca e polpa como substratos, e *P. aeruginosa* como produtor de biossurfactante em 22 horas de fermentação, estão dispostos na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1: Resultados da biomassa (X), substrato (S) e tensão superficial (P) nas concentrações de sólidos da entrecasca à 125g/L, 250g/L e 500g/L em 22 horas de fermentação.

Concentração de sólidos (g/L)	Concentração de microrganismo (g/L)		Concentração de substrato (g/L)		Tensão superficial (mN/m)	
	0 h	22 h	0 h	22 h	0 h	22 h
125	0,00	0,67	13,23	11,22	64,13	62,29
		(±0,67)	(±1,29)	(±0,09)	(±1,44)	(±0,40)
250	0,00	0,65	26,49	21,99	69,73	57,56
		(±0,05)	(±0,01)	(±0,60)	(±0,06)	(±1,02)
500	0,00	1,80	21,71	20,42	65,58	54,62
		(±1,0)	(±0,25)	(±0,58)	(±0,54)	(±1,18)

Fonte: Autor (2022).

A melhor fermentação obtida, utilizando a entrecasca como substrato conforme demonstrado na Tabela 1, em termos de redução de tensão superficial foi para a concentração de sólidos de 250 g/L, com uma redução de tensão superficial de 17,45% e chegando-se a um valor de tensão superficial de 57,56 mN/m.

Apesar de obter a produção de biossurfactante mais efetiva, essa concentração ficou apenas 4,4% acima da redução obtida pelo substrato em uma concentração de sólidos de 500 g/L com 16,72% de redução da tensão superficial, chegando-se a um valor de tensão superficial de 54,62 mN/m.

Em termos de crescimento de massa microbiana, a fermentação que obteve maior rendimento em relação ao crescimento de microrganismo por consumo de substrato ($Y_{x/s}$) foi para a concentração de sólidos 500 g/L obtendo-se um valor de 1,39.

Observou-se uma grande disponibilidade de açúcar redutor para a entrecasca, sugerindo-se um substrato potencial para a realização de estudos de fermentação, onde para a mesma obteve-se valores 21,99 g/L (concentração de sólidos de 250g/L) e 20,42 g/L (concentração de sólidos de 500 g/L) de açúcar redutor.

O maior consumo de substrato para o fermentado advindo da entrecasca também foi para a concentração de sólidos 250 g/L com cerca de 17%, em uma eficiência maior em relação a fermentação realizada com a polpa da mandioca de mesma concentração.

Tabela 2: Resultados da biomassa (X), substrato (S) e tensão superficial (P) nas concentrações de sólidos da polpa à 125g/L, 250g/L e 500g/L em 22 horas de fermentação.

Concentração de sólidos (g/L)	Concentração de microrganismo (g/L)		Concentração de substrato (g/L)		Tensão superficial (mN/m)	
	0 h	22 h	0 h	22 h	0 h	22 h
125	0,00	1,45	5,63	0,80	60,9	60,75
		(±0,35)	(±0,02)	(±0,03)	(±5,24)	(±0,01)
250	0,00	1,33	16,79	3,15	57,77	47,89
		(±0,26)	(±0,34)	(±0,26)	(±0,90)	(±0,75)
500	0,00	3,60	8,74	6,15	63,29	57,39
		(±1,2)	(±0,26)	(±1,49)	(±0,57)	(±1,03)

Fonte: Autor (2022).

Pode-se observar pela Tabela 2 que a melhor fermentação em termos de queda de tensão superficial foi para a concentração de sólidos de 250g/L, chegando-se a uma redução de 17,09% e atingindo-se um valor de 47,89 mN/m, no tempo considerado para o estudo.

A fermentação menos efetiva (concentração de sólidos de 125g/L), em termos de produção de biossurfactante, resultou em uma tensão superficial 26% superior a mais efetiva.

O melhor rendimento em termos de crescimento de microrganismo por substrato ($Y_{x/s}$) foi de 0,7 para a concentração de sólidos de 500 g/L, apesar de a fermentação de 250 g/L obter a melhor produção de biossurfactante, resultou em um rendimento de apenas 0,09. Observa-se ainda, que o consumo de substrato para a concentração de sólidos 250 g/L foi cerca de 81,12%.

Figura 4 - Fermentação após 22 horas de produção



Fonte: Autor (2022)

A Figura 4 demonstra uma pequena formação de espuma na superfície do caldo fermentado, segundo Wei *et al.* (2005) essa é uma característica marcante da produção de biossurfactante, em cepas selvagens de *P. aeruginosa*, advindas de poços de petróleo, a produção de biossurfactante é tão alta que a formação de espuma no caldo fermentado chega a ser vigorosa.

Silva *et al.* (2010) atingiu uma redução de tensão superficial de 34% na produção do biossurfactante com *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 chegando a 33,7 mN/m utilizando

como substrato milhocina e óleo de girassol pós-fritura em 24 horas de produção. Já Ehrhardt (2015) obteve 12% de redução de tensão superficial em 24 horas, chegando a 20% de redução após 72 horas com *Bacillus subtilis* utilizando resíduo de abacaxi como mosto. Rovina et.al (2018) conseguiu obter uma redução de tensão superficial de 25% utilizando *Bacillus subtilis* e casca de laranja como substrato em 24 horas de fermentação.

Dessa forma, foi atingido valores de redução de tensão superficial próximos aos trabalhos citados, dentro do período de estudo considerado.

5.2 AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO COM MEIO ENRIQUECIDO

A tabela 3 mostra os resultados quantitativos após as 22 horas de fermentação.

Tabela 3: Resultados da biomassa (X), substrato (S) e tensão superficial (P) nas concentrações de sólidos 250 g/L.

Concentração de sólidos (g/L)	Concentração de microrganismo (g/L)		Concentração de substrato (g/L)		Tensão superficial (mN/m)	
	0 h	22 h	0 h	22 h	0 h	22 h
250 g/L s/sais (Polpa)	0,00	1,33 (±0,30)	16,79 (±0,29)	3,15 (±0,26)	57,77 (±0,90)	47,89 (±3,75)
250 g/L c/sais (Polpa)	0,00	1,30 (±0,1)	16,79 (±0,29)	1,65 (±0,40)	57,77 (±0,90)	64,40 (±2,91)
250 g/L s/sais (Entrecasca)	0,00	0,65 (±0,05)	26,49 (±0,01)	21,99 (±0,35)	69,73 (±0,06)	57,56 (±0,85)
250 g/L c/sais (Entrecasca)	0,00	0,65 (±0,04)	26,49 (±0,01)	20,97 (±0,50)	69,73 (±0,06)	58,91 (±1,16)

Uso de sais 5%v/v :0,5460g/100mL de KH_2PO_4 , 0,4760g/100mL de Na_2HPO_4 , 0,25g/100mL de NH_4Cl , 0,08g/mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/100mL de NaCl . Fonte: Autor (2022).

Conforme a Tabela 3, em relação ao crescimento de microrganismo, o fermentado obtido do caldo da polpa da mandioca não enriquecido, demonstrou um rendimento de 13,55% superior ao caldo sem o enriquecimento, já para a entrecasca foi de 22% superior, demonstrando assim, uma queda de eficiência no crescimento de microrganismo em decorrência da fermentação com uso de sais, para ambos os substratos.

Em relação a redução de tensão superficial, para a entrecasca, a fermentação sem a adição de sais, resultou em um valor 12,5% acima do caldo fermentado enriquecido. Apesar da produção de biossurfactante ocorrer, não houve otimização. Para a polpa, o caldo fermentado com a adição de sais obteve um desempenho ruim de forma que, a tensão superficial obtida foi 10,3% acima do valor inicial.

Bezerra (2012) utilizou sais metálicos para enriquecer a manipieira, utilizada como substrato na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIA, onde obteve um rendimento em crescimento de massa 2 vezes superior em relação ao meio sem o enriquecimento, bem como, uma redução de tensão superficial do caldo fermentado 28% maior em relação a fermentação do meio sem o uso de sais.

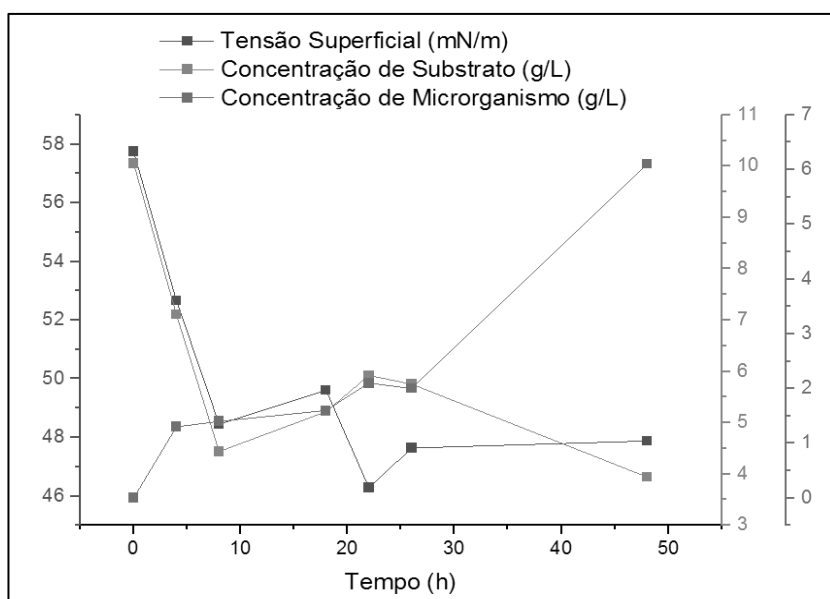
Em outro trabalho, utilizando melação como substrato e NaNO_3 como fonte de nitrogênio, Bezerra (2006) também utilizou os sais metálicos para avaliar a produção de biossurfactante e obter o melhor inóculo, onde conseguiu uma redução de tensão superficial 5% superior com o enriquecimento do meio.

Os resultados obtidos conforme a Tabela 3 demonstraram que a utilização de sais desfavoreceu o crescimento de microrganismo e a produção de biossurfactante.

5.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO

A figura 5 representa a curva cinética de fermentação do biossurfactante produzido tendo a polpa da mandioca como substrato.

Figura 5 - Curva cinética da fermentação com a polpa como substrato.



Fonte: autor.

Conforme a Figura 5 percebeu-se um equilíbrio na queda de tensão superficial do caldo fermentado a partir de 8 horas de produção, dentro da faixa de tempo considerada para estudo e condições operacionais em que a fermentação foi submetida, sugerindo-se assim, que a maior taxa de produção de biossurfactante foi nas primeiras 8 horas.

Durante as 48 horas de produção em estudo, na polpa como substrato, a maior redução de tensão superficial observada foi de 19,9%, onde o menor valor de tensão superficial atingido foi de 46,3mN/m.

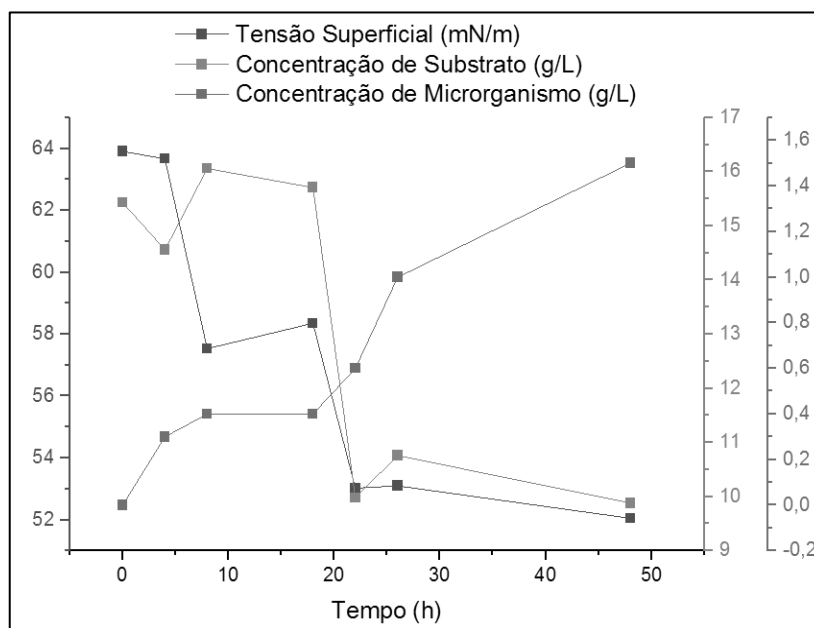
Em paralelo, foi observado um maior consumo do substrato também durante as primeiras 8 horas, havendo uma pequena redução do consumo posteriormente. O consumo total observado foi de 65,5%.

Em relação ao crescimento de microrganismo, observou-se uma fase lag extensa, que perdurou as primeiras 26 horas de produção, percebe-se ainda, um crescimento abrupto de crescimento de microrganismo entre 26 e 48 horas de fermentação.

No entanto, entre essa faixa de tempo não se pôde inferir mais pontos da curva, devido a indisponibilidade de acesso ao laboratório na referida faixa de tempo, de forma a limitar a visualização do comportamento na fase log, ou determinar se a fase estacionária ocorre já dentro da faixa de tempo não aferida.

O rendimento obtido em termos de crescimento de massa microbológica e consumo de substrato ($Y_{x/s}$) foi de 1.

Figura 6 - Curva cinética da fermentação tendo a entrecasca como



Fonte: autor.

Para a entrecasca conforme a Figura 6, percebeu-se um equilíbrio na queda de tensão superficial do caldo fermentado a partir de 22 horas de produção, dentro da faixa de tempo considerada para estudo e condições operacionais em que a fermentação foi submetida, se observando uma maior taxa de produção de biossurfactante ocorrida nas primeiras 22 horas. Durante as 48 horas de produção, a maior redução de tensão superficial observada foi de 18,55%.

Em relação ao consumo de substrato, observou-se uma queda abrupta do substrato entre 18 e 22 horas, 35,9% redução de substrato, considerando-se nessa faixa de tempo a maior velocidade de consumo de substrato da fermentação 1,62 g/L.h.

O crescimento de microrganismo acompanha a queda abrupta de substrato, apresentando a fase log no mesmo período de tempo, e iniciando a fase estacionária após as 26 horas de fermentação, se observou uma baixa inclinação da reta entre 26 e 48 horas em um valor de cerca 0,8.

O rendimento obtido em termos de crescimento de massa microbológica e consumo de substrato ($Y_{x/s}$) foi de 0,27, aferindo-se um baixo rendimento, no entanto, se observou uma boa redução de tensão superficial.

Conforme Barros (2006) e Batista *et al.* (2015) a produção de biossurfactante é paralela ao crescimento de microrganismo, diferentemente do comportamento da maioria dos metabólitos secundários em que a sua produção é observada após o estabelecimento da fase estacionária.

Essa afirmação pôde ser observada no comportamento cinético da fermentação dos dois substratos, se diferindo apenas no tempo necessário para estabilizar a queda de tensão superficial no caldo. Pois, para entrecasca ocorreu somente após as 22 horas de produção. Já para a polpa, a estabilidade na queda de tensão superficial ocorreu já nas primeiras 10 horas de fermentação, sugerindo um tempo menor para atingir o equilíbrio.

Bezerra (2006) obteve a estabilização da queda de tensão superficial do caldo fermentado já nas primeiras 8 horas de produção, chegando a um valor de 32 mN/m na melhor produção, para o melaço como substrato. Variando as condições operacionais, em todas as fermentações observou-se uma estabilização da tensão superficial antes das 10 horas de fermentação. No entanto, a fase log de crescimento do microrganismo ocorreram somente após 60 horas de produção.

Silva *et al.* (2010) obteve a maior redução de tensão superficial do fermentado nas primeiras 12 horas, atingindo a fase estacionária em 24 horas de produção, utilizando a

milhocina como substrato. Já Rovina et.al (2018) observou a maior queda de tensão nas primeiras 5 horas de produção em 25 horas de fermentação.

Já Soares (2018) observou a fase estacionária ocorrer em 24 horas de fermentação, e coincidentemente obteve a maior redução de tensão superficial na mesma faixa de tempo. Dessa forma, os resultados observados nesse trabalho estão de acordo com a literatura.

5.4 ANÁLISE DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

As Tabela 4 e 5 dispõe dos valores de índice de emulsificação obtidos a partir do sobrenadante do caldo fermentado com a utilização do querosene como fonte de hidrocarboneto a ser emulsificada.

Tabela 4: Índice de emulsão determinado para 22 horas de fermentação da polpa, variando a concentração de sólidos.

Concentração de sólidos	Índice de emulsificação (E₂₄)
125 g/L	3,5% ($\pm 0,5\%$)
250 g/L s/ sais	57,0% ($\pm 1,0\%$)
250 g/L c/ sais	14,0% ($\pm 2,0\%$)
500 g/L	8,0% ($\pm 1,0\%$)

Fonte: Dados autor (2022).

É possível observar que o maior índice de emulsificação obtido foi para a fermentação da polpa com 250 g/L de concentração de sólidos sem adição sais em 22 horas de produção, obtendo-se o valor 57%. Conforme Willumsen e Karlson (1997), este valor pode ser considerado como um biossurfactante com boas propriedades de emulsificação, sendo o valor mínimo de 50%.

Tabela 5: Índice de emulsão determinado para 22 horas de fermentação da entrecasca, variando a concentração de sólidos.

Concentração de sólidos	Índice de emulsificação (E₂₄)
125 g/L	4,0% ($\pm 1,0\%$)

250 g/L s/ sais	35,0% ($\pm 0,5\%$)
250 g/L c/ sais	11,0% ($\pm 1,0\%$)
500 g/L	33,0% ($\pm 2,0\%$)

Uso de sais 5%v/v :0,5460g/100mL de KH_2PO_4 , 0,4760g/100mL de Na_2HPO_4 , 0,25g/100mL de NH_4Cl , 0,08g/mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/100mL de NaCl. Fonte: Autor (2022).

Já para a fermentação com a entrecasca, pode-se observar valores muito próximos entre as concentrações de sólidos 250 g/L e 500 g/L, em uma diferença de apenas 6%. Em 22 horas de produção, não se atingiu um valor acima de 50% de índice de emulsificação, valor considerado como um biossurfactante bom para emulsificação.

Para a continuidade dos estudos com a utilização da entrecasca como substrato, foi considerada a concentração de sólidos de 250 g/L como a melhor produção, pois apesar de obter um valor aproximado ao da concentração de sólidos de 500 g/L, requereu menor utilização de substrato, ou seja, boa produção com menor utilização de recursos.

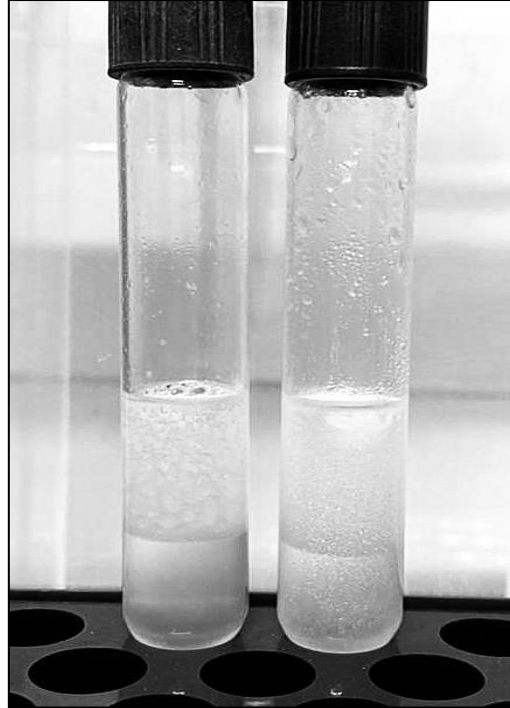
Em 22 horas de produção, a fermentação com a polpa demonstrou um valor de emulsificação superior em relação a entrecasca, em um grau de 1,6.

Conforme a Tabela 5, para os dois caldos fermentados com a adição de sais em 250g/L de sólidos, entrecasca e polpa, observou uma atividade de emulsificação inferior em relação aos caldos sem a utilização de sais, sendo atividades de emulsificação 3 e 4 vezes superiores para os fermentados sem o uso de sais em relação aos com o uso de sais, para a entrecasca e polpa, respectivamente.

Após 48 horas de fermentação foi realizado o teste de atividade de emulsificação, para observar se houve uma melhora na capacidade de emulsificar hidrocarbonetos dos fermentados. A partir da Figura 7 pode-se observar visivelmente melhora para a fermentação com os dois caldos, onde resultou-se em 55% e 60% para entrecasca e polpa, respectivamente.

Dessa forma, foi possível observar que a condição de Willumsen e Karlson (1997) foi satisfeita, pois o índice de emulsificação acima de 50% por 24 horas ou mais foi obtido para os dois caldos fermentados após 48 horas de produção.

Figura 7: Índice de Emulsificação após 48 horas de fermentação.



Fonte: Autor (2022).

Além disso, os valores se encontram próximos de trabalhos como Barros (2012) que obteve de 50 a 68% ao utilizar caldo de manipueira para fermentação com *P. aeruginosa*, Haba et al. (2000) atingiu até 64% a partir de vários tipos de *Pseudomonas*, já Wei et al. (2005) conseguiu atingir até 80% de índice de emulsificação utilizando o querosene como fonte de hidrocarboneto no teste.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos e discutidos no estudo realizado pode se concluir que, ambos os substratos demonstraram serem assimiláveis pela *P. aeruginosa*, bem como, potenciais para mais estudos na produção de biossurfactante.

A entrecasca da mandioca demonstrou possuir disponibilidade de açúcar redutor, em valores de até 21,9 g/L, de forma a ser uma matéria-prima em potencial para estudos na área da fermentação.

A melhor fermentação obtida nas condições operacionais de temperatura à 37°, razão de aeração à 0,4 v/v, agitação de 100 rpm em 22 horas de fermentação, foi para a concentração de sólidos de 250 g/L, em ambos os substratos, com redução de tensão superficial na faixa de 16 a 18%.

O uso de sais para o enriquecimento do meio desfavorece a produção de biossurfactante.

A produção de biossurfactante utilizando a polpa como substrato demonstrou maior velocidade na produção de biossurfactante em relação a entrecasca.

O biossurfactante produzido pela *P. aeruginosa* em ambos os substratos, demonstrou ser um bom emulsificante, chegando à valores de até 60% de emulsão formada.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. N. B. (Eds.). **Cultura da mandioca: apostila**. 1. ed. Belém – PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. Cap. 13. p. 170.

ARIMA K, KAKINUMA A, TAMURA G (1968) **Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation**. *Biochem Biophys Res Commun* 31:488–494

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. (2012) **Biosurfactant production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 116-25. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000100013>>.

BANAT IM, MAKKAR RS, CAMEOTRA SS (2000) **Potential commercial applications of microbial surfactants**. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:495–508.

BARBOSA, A.P.A.; GONDIM, A.L.N.; PAZ, M.C.F. **Remoção do Corante Preto Pirazol por *Pseudomonas aeruginosa***. II CONEPI - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007.

BEZERRA, M. S., **Levantamento e Avaliação de Critérios para a Ampliação de Escala da Produção de biossurfactantes utilizando melaço como substrato**. 2006. 101f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/15864/1/MarcioSB.pdf>>.

BROWN, M. J. **Biosurfactants for cosmetic applications**. *Int. J. Cosmetic Sci.*, v. 13, p. 61-64, 1991.

CEREDA, M. P. et al. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo. Fundação Cargill. 2001. 320p.

COSTA, S. G. V. A. O.; MILOT, F. L. S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. **Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa***. *J. Ind Microbiology Biotechnology*. v. 36, p. 1063–1072, 2009.

CODEIRO, G. Q. **Tratamento de manipueira em reator anaeróbico compartimentado**. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas; Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto. 2006.

COÊLHO, Jackson Dantas. **Produção de mandioca: raiz, farinha e fécula**. Caderno Setorial ETENE. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 4, n.102, 2019.

CONAB (Companhia Nacional De Abastecimento). **Análise mensal, Mandioca**, abril de 2019. Disponível em: Acesso em 30 de agosto de 2019.

CRUZ, E. A. **Produção de alfa-amilase por *Aspergillus Niger* em resíduos de cascas de mandioca**. Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e de Saúde, v.13, n. 4, p. 245-249, 2011.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K; SEN, R. **Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin**. Chemosphere. V. 72, Issue 9, p. 1229–1234, 2008.

Desai JD, Banat IM (1997) **Microbial production of surfactants and their commercial potential**. Microbiol Mol Biol Ver 61:47–64

DOURADO, DAISY PARENTE; MACEDO, DENY ALVES; NOGUEIRA, WILLIAM ALMEIDA; LÁZARI, THIAGO, MAGALHÃES DE; MURAIISHI, CID TACAoca; SIQUEIRA, FLAVIA, LUCILA TONANI. **potencialidade da casca da mandioca como resíduo proveniente de fecularia**. Agronomia: Jornadas Científicas. 2ed.: 2020, v., p. 167-172.

EHRHARDT, D. D.; SECATO, J. F. F.; TAMBOURGI, E. B. **Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 1960-1965, 2015

FATHABAD, E. G.; **Biosurfactants in pharmaceutical industry (a mini-review)**. American journal of drug discovery and development, v. 1, p. 58-69, 2010

FIORDA, FERNANDA ASSUNÇÃO; SOARES JÚNIOR, MANOEL SOARES; SILVA, FLÁVIO ALVES DA; SOUTO, LUCIANA REIS FONTINELLE; GROSSMANN, MARIA VICTÓRIA EIRAS. **Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca**. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 408-416, out./dez. 2013. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/pat/article/view/23381/15577>>.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Pseudomonas* spp. Microbiologia Clínica.** LABACVET 2008-2 Bacteriologia.

HORSFALL, JR. M.; ABIA, A. A.; SPIFF, A. I. **Kinetic Studies On The Adsorption Of Cd²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ íons from aqueous solutions by cassava (*Manihot succulenta* Cranz) tuber bark waste.** Bioresource technology, v. 97, n. 2, p. 283-291, 2006.

LEÃO, B.A. **Agentes Inibidores da Atividade Metabólica e do Processo de Adesão de *Desulfotomaculum nigrificans* em Euperfície de Aços Inoxidável.** (Dissertação) UFV-Viçosa, 2009. Disponível em: <http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/36/TDE-2010-03-17T061631Z-2164/Publico/texto%20completo.pdf>.

LEONEL, M. **O farelo, subprodutos da extração de fécula de mandioca.** In: Cereda, Marney Pascoli (Coord.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, cap. 15, p. 211-216.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia. *Pseudomonas aeruginosa*.** Cap. 49, Ed. Atheneu, 5ª edição, São Paulo, 2008.

LI, Q.; KANG, C.; WANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C. **Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield.** Biochemical Engineering Journal, v.11, p.197-199, 2002.

LIU, Y.; KOH, C. M. J.; JI, L. **Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*.** Bioresource Technology, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 3927–3933, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.115.

LOBATO, A. K. C., **Estudo da Produção de Biossurfactantes por Micro-organismos Isolados de Poços de Petróleo.** 2003. 148f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN.

MAKKAR RS, CAMEOTRA SS. **An update on the use ofunconventional substrates for biosurfactant production and theirnew applications.** Appl Microbiol Biot. 2002. 58:428–434.

MATA, P.T.G.; ABEGG, M.A. **Descrição de Caso de Resistência a Antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*.** Arq Mudi. 2007;11(2):20-25.

MILLER RM, ZHANG Y (1997) **Measurement of biosurfactant-enhanced solubilization and biodegradation of hydrocarbons, bioremediation protocols**. Humana Press, New Jersey, pp 59–66

MONTEIRO, S.A. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes Produzidos por Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614**. (Tese). UFPR, 2007. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/11333/SAFI%20AMARO%20MONTEIRO.pdf;jsessionid=02600E587273588D38A30761AEE971FA?sequence=1>>.

MULLIGAN, C. N.; **Environment applications for biosurfactants. Environmental pollution**, v.133, p.183-198, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, D. W. F. **Produção e caracterização de biosurfactantes obtidos por linhagens de Bacillus sp. isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil)**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PEIXOTO, RENATA DE MELO. **Bioprospeção de microrganismos do gênero Pseudomonas produtores de biosurfactantes**. 2008. 98p. Dissertação 52 (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2008.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.; WALLACH, J. **Recent trends in the biochemistry of surfactin**. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 51, p. 553-563, 1999.

REIS, R.S. et al. **Gene regulation of rhamnolipid production in Pseudomonas aeruginosa – A review**. Bioresource Technology 102 (2011) 6377-6384.

SANCHES, M. A.; LUZEIRO, I. G.; CORTEZ, A. C. A.; DE SOUZA, E. S.; ALBUQUERQUE, P. M.; CHOPRA, H. K.; DE SOUZA, J. V. B. **Production of Biosurfactants by Ascomycetes. International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2021, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1155/2021/6669263.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. **A Review on Biosurfactants : Fermentation , Applications** , Current. [S. l.], v. 2011, p. 1–42, 2011.

SÁNCHEZ, M., ARANDA, F.J., ESPUNY, M.J., MARQUÉS, A., TERUEL, J.A., MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? Biotechnology letters**, v. 34, n. 9, p. 1597–605, set. 2012.

MANRESA, A., ORTIZ, A., **Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media.** *Journal of Colloid and Interface Science*, V. 307, p. 246-253, 2007.

MENESES, D. P.; GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, F.; GONÇALVES, L. R. B.; RODRIGUES, L. R.; RODRIGUES, S. **The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer.** *Microbiological Research*, [S. l.], v. 204, p. 40-47, 2017. DOI: 10.1016/j.micres.2017.07.004.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE Glauca Maria. **Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, julho/dezembro, 2003, p. 63-67.

ROVINA, Fernanda. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduos do processamento da casca da laranja e sua aplicação na remoção de óleo em solo contaminado.** 2018. 1 recurso online (80 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

SENA, H. H. et al. **Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest** *International Journal of Microbiology*, 2018.

SILVA, T. A. L. E. ; LUNA, J. M. ; MORAES FILHO, M. A. ; TAMBOURGI, Elias Basile ; CAMPOS-TAKAKI, G. M. ; Campos-Takaki, Galba Maria. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milho como substrato.** *Exacta* (São Paulo. Impresso) , v. 8, p. 19-26, 2010.

R. Panesar, S. Kaurt; P. S. Panesar, *Curr. Opin. Food Sci.* 2015, 1, 70.

SIQUEIRA, F.S. **Mecanismos de resistência a β -Lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*.** *Revista do Biomédico*, Julho /Agosto 2002, pag 24.

SOARES, Camylla Carneiro et al.. **Avaliação da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando cascas de mamão como substrato.** *Anais III CONEPETRO...* Campina Grande: Realize Editora, 2018. Disponível em: <<https://www.editorarealize.com.br/artigo/visualizar/43933>>.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R. **Práticas de microbiologia.** Editora Guanabara, 1ª edição, 256p, 2006.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. **Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater.** Biochemical Engineering Journal. v. 27, p.146–154, 2005.