

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA DEGRADAÇÃO DE
RESÍDUOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO DE EFLUENTES
MUNICIPAIS**

LAURA NETO GONÇALVES

Monografia apresentada à
coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção
do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

UBERLÂNDIA -MG

Outubro- 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA DEGRADAÇÃO DE
RESÍDUOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO DE EFLUENTES
MUNICIPAIS**

LAURA NETO GONÇALVES

EDGAR SILVEIRA CAMPOS

Monografia apresentada à
coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção
do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

UBERLÂNDIA-MG

Outubro-2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA PARA DEGRADAÇÃO DE
RESÍDUOS PROVENIENTES DO TRATAMENTO DE EFLUENTES
MUNICIPAIS

LAURA NETO GONÇALVES

EDGAR SILVEIRA CAMPOS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/ __/ __

Nilson Nicolau Junior

UBERLÂNDIA-MG

Outubro-2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, Ademir, Beatriz e Lael por todo o apoio durante todos esses anos de graduação e por sempre me incentivaram e torceram por mim. Agradeço meu namorado, Victor Hugo, por estar comigo durante todo processo de realização desse trabalho e sempre me incentivar e torcer por mim, me ajudando a superar as partes cansativas do processo.

Agradeço ao LABBIO, pela oportunidade de aprender e oferecer condições para que esse trabalho acontecesse.

Agradeço ao NUCBIO pelo apoio e suporte durante a realização do projeto, em particular agradeço a Amanda, Adrielle e Mayara por todo o auxílio e orientações durante a realização do projeto. Foram ensinamentos valiosos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edgar, por toda paciência e auxílio durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço a minha parceira de laboratório, Jessi, que foi essencial durante o desenvolvimento desse projeto. Obrigada pela parceria e por todo auxílio durante esse tempo!

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia e ao CNPq pela chance de realizar esse trabalho e me permitir entrar no setor científico.

Por fim, agradeço a todos os meus colegas de turma que estiveram comigo desde o início da graduação e foram fundamentais em tornar todo o processo mais prazeroso. Serei eternamente grata por todo o apoio que me foi dado.

RESUMO

GONÇALVES, L.N. **Desenvolvimento de tecnologia para degradação de resíduos provenientes do tratamento de efluentes municipais.** 2024. p. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) - Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Biossurfactantes são moléculas com propriedades de emulsificação e detergência utilizados na biorremediação de águas contaminadas devido ao potencial de redução da tensão superficial do líquido, promovendo sua maior biodegradabilidade. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* para degradação da espuma, uma camada de matéria orgânica flutuante presente nos reatores UASB utilizados no tratamento de efluentes. O biossurfactante foi produzido em Fermentação Submersa utilizando resíduos de abacaxi. Obteve-se uma concentração de 10,66% do biossurfactante g/L, uma tensão superficial de 43 mN/m-1 e concentração micelar diluída de 60 g/L. O biossurfactante demonstrou uma capacidade de emulsificação com índices variando entre 63% e 70%. Em relação a estabilidade, a amostra de 30°C mostrou maior estabilidade em comparação com a amostra de 4°C, a amostra de pH 6,6 apresentou tensões entre 38 mN/m-1 e 46 mN/m-1. Nos testes de aplicação, foi constatado que a interação entre a levedura e o biossurfactante influenciaram diretamente o aumento da turbidez, especialmente nas concentrações de 4%. Em relação a tensão superficial a condição que continha apenas espuma apresentou maior aumento da tensão e as condições de espuma e biossurfactante permaneceram com valores baixos de tensão superficial ao longo do experimento.

Palavras-chave: biossurfactante; biorremediação; espuma.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivo específico	3
3.JUSTIFICATIVA	4
4.MATERIAIS E MÉTODOS	4
4.1 Microrganismo	4
4.2 Preparo do pré-inóculo	5
4.3 Preparo do Extrato de Abacaxi	5
4.4 Produção do biossurfactante	6
4.5 Extração pelo método de acetona a frio	6
4.6 Determinação da concentração do biossurfactante	6
4.7 Análise da tensão superficial	7
4.8.Índice de Emulsificação	7
4.9. Concentração micelar diluída	8
4.10.Teste de estabilidade	8
4.11. Coleta da espuma	8
4.12. Aplicação	9
4.13 Viabilidade Econômica e Limitações Metodológicas	9
4.14 Análise estatística	10
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5.1 Produção do biossurfactante	10
5.2 Purificação com acetona	10
5.3 Concentração da molécula	12
5.4 Determinação da Tensão	12
5.5 Teste de Emulsificação	13
5.6 Concentração Micelar Diluída	15
5.7 Teste de estabilidade	17
5.8 Aplicação biotecnológica	20
5.8.1 Absorbância	21
5.8.2 Tensão Superficial	24
5.9 Viabilidade Econômica e Limitações Metodológicas	29
6.0 CONCLUSÃO	30
7.0 REFERÊNCIAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Índice de Emulsificação do biossurfactante	14
Figura 2. Concentração micelar Diluída (CMD) do biossurfactante.....	16
Figura 3. Estabilidade da Tensão Superficial do biossurfactante (CMD) com variações de temperatura ao longo de 30 dias. Análise estatística realizada por meio da ANOVA de dois fatores. Os resultados indicam diferenças significativas entre os grupos, com $p < 0,05$. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão para cada grupo.....	18
Figura 4. Tensão superficial do biossurfactante após aplicação do estresse em diversos pH ao longo de 30 dias. Análise estatística realizada por meio da ANOVA de dois fatores. Os resultados indicam diferenças significativas entre os grupos, com $p < 0,05$. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão para cada grupo.....	19
Figura 5. Análise de absorbância : verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + escuma (4%) ; C2 - meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (4%); C3- meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + escuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).....	22
Figura 6. Análise de absorbância : verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + escuma (1%) ; C2 - meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (1%); C3- meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + escuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).....	24
Figura 7. Análise de variação da tensão superficial: verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + escuma (4%) ; C2 - meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (4%); C3- meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + escuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).....	27
Figura 8. Análise de variação da tensão superficial: verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + escuma (1%) ; C2 - meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (1%); C3- meio de cultura + levedura (Rhodotorula mucilaginosa) + escuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + escuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições das amostras utilizadas durante aplicação biotecnológica.....	9
---	----------

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas que possuem uma natureza anfifílica, sendo caracterizadas pela presença de uma porção apolar lipofílica e uma porção polar hidrofílica. Essa característica anfifílica as qualifica como moléculas tensoativas, conferindo-lhes propriedades como emulsificação, detergência e esterilização, tornando-as de grande relevância na indústria (Wang et al, 2015). Derivados de resíduos de petróleo, esses compostos podem ser tóxicos para os organismos, dessa forma, destaca-se os biossurfactantes, mais seguros que os surfactantes convencionais, sendo uma alternativa ecológica (Bahia et al, 2018).

Os biossurfactantes originam-se dos produtos metabólicos de fungos filamentosos, bactérias e leveduras (D'Almeida et al, 2016) e suas propriedades biológicas oferecem vantagens sobre os sintéticos, incluindo maior degradabilidade e menor toxicidade (Chen et al, 2015; Ines e Dhouha, 2015). São utilizados na biorremediação de águas contaminadas por petróleo e óleos, devido ao potencial de redução da tensão superficial do líquido, o que resulta no aumento da área superficial e, conseqüentemente, na promoção de maior biodisponibilidade.

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* tem sido estudada devido ao grande potencial de produção de biossurfactante, destacando-se por possuir rápido desenvolvimento em substratos de baixo custo segundo estudos anteriores de Sousa (2021). Nesse contexto, resíduos agroindustriais são utilizados durante o processo de fermentação com o intuito de redução de custos, são matérias primas originadas de diversas fontes vegetais e são aproveitados como fonte de carbono e nitrogênio para o meio de cultura, o que ajuda a mitigar os impactos ambientais decorrentes do descarte (Nitschke, 2004).

Estudos anteriores realizados por Sousa (2021) e Valadão (2023) indicaram que a suplementação com extrato de abacaxi (*Ananas comosus*), produzido a partir de seus resíduos agroindustriais, contribui para a alta produtividade do biossurfactante produzido por *R. mucilaginosa* devido a alta concentração de açúcares que auxiliam no processo fermentativo, preservando as propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante.

É sabido que vários métodos de tratamento de água podem resultar na produção de resíduos, como manchas de óleo compostas principalmente por hidrocarbonetos. Isso pode causar contaminação no efluente, levantando sérias preocupações ambientais. No Brasil, grande parte das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) utiliza reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) devido ao seu baixo custo e eficácia na remoção da carga orgânica.

Os reatores UASB operam com fluxo hidráulico ascendente e utilizam um separador trifásico para dividir as fases sólida, líquida e gasosa, otimizando o processo de tratamento biológico, no qual bactérias degradam substâncias biodegradáveis e nutrientes. A zona de decantação no separador é responsável pela separação final do efluente, que segue para as etapas seguintes do tratamento (Souza, 2006).

Entretanto, um dos desafios operacionais nos reatores UASB é a formação de espuma nas interfaces líquido-gás, seja no interior do separador trifásico ou na unidade de decantação. A espuma pode se acumular nessas regiões, especialmente se não houver dispositivos adequados, como retentores de espuma ou saídas submersas do efluente. Além disso, a taxa de liberação de biogás no interior do separador precisa ser suficientemente alta para superar a camada de espuma, garantindo o bom funcionamento do reator e evitando bloqueios que possam comprometer o processo de tratamento (Van Haandel & Lettinga, 1994; Chernicharo, 1997).

De acordo com Souza e colaboradores (2005) a espuma pode ser definida como: “Uma camada de material flutuante que se desenvolve nas superfícies dos reatores, constituída principalmente de gordura, óleos, ceras, sabões, restos de comida, cabelos, papel, algodão, materiais plásticos, partículas de areia e materiais similares”. Esses materiais sobem à superfície, já quase sem gases e permanecem retidos contribuindo para a formação da espuma.

A espuma no interior do reator provoca desafios de manutenção pois sua acumulação excessiva especialmente no separador trifásico, pode comprometer e impedir o caminho do biogás, resultando no escape para a zona de decantação e conseqüentemente prejudicando a sedimentação do lodo. Além disso, pode impactar a qualidade do efluente final se grandes quantidades escaparem com o efluente e maior corrosão das estruturas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial de biorremediação de um biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* para a eliminação de espuma presente nos reatores UASB utilizados no tratamento de água e esgoto de Uberlândia-MG.

2.2. Objetivo específico

- Produzir biossurfactante a partir do processo otimizado de fermentação submersa utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono.
- Analisar os parâmetros: índice de emulsificação, concentração micelar crítica e estabilidade.
- Analisar a interação do biossurfactante na espuma.

3. JUSTIFICATIVA

Os surfactantes produzidos por processos químicos são derivados de petróleo ou fontes oleoquímicas, considerados prejudiciais ao meio ambiente devido à sua toxicidade e falta de biodegradabilidade, limitando assim sua aplicação. O crescente foco na preservação ambiental, a implementação de novas regulamentações ambientais e o desejo de superar as desvantagens dos surfactantes sintéticos têm levado os biossurfactantes microbianos a se tornarem áreas promissoras de pesquisa em Biotecnologia. Contudo, a produção em larga escala dessas biomoléculas ainda não é viável quando comparada aos surfactantes sintéticos.

O Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da Universidade Federal de Uberlândia desenvolveu um método biotecnológico para produzir um biossurfactante usando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada de algas marinhas da Antártica. Em estudos anteriores, o biossurfactante foi produzido com alto rendimento usando resíduos agroindustriais do processamento de abacaxi, reduzindo significativamente os custos, além disso, o processo de extração e purificação mostrou-se eficaz.

Os efluentes oleosos são difíceis de tratar devido à elevada carga orgânica, e pesquisas anteriores indicam que biossurfactantes microbianos podem ser promissores na melhoria da eficiência da flotação. Nesse contexto, esta proposta visa continuar a investigação da aplicabilidade deste biossurfactante, que pode ser eficaz na remoção de espuma presente nos reatores UASB utilizados no tratamento de água e esgoto de Uberlândia, MG.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* contendo codificação de isolamento L69 foi coletada em Punta Plaza (Admiralty Bay, Ilha King George, Antártica) a partir de algas

marinhas. A levedura se encontra armazenada conservada pelo método de criopreservação em ultra-freezer a -80°C , utilizando 50% (v/v) de glicerol no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2 Preparo do pré-inóculo

A preparação do pré-inóculo consistiu em reativar a levedura em meio YPD sólido (g.L-1): glicose (10), peptona (5), extrato de levedura (3) e ágar (20), incubadas por 30°C por 24-48 horas para que houvesse a formação das colônias. Posteriormente, duas a três colônias puras e isoladas foram coletadas e inoculadas em 100ml de meio líquido de YPD (g.L-1): glicose (10), peptona (5), extrato de levedura (3) incubados em agitador de bancada em temperatura ambiente 25°C e 120 rpm, durante 24 horas.

4.3 Preparo do Extrato de Abacaxi

Segundo estudos de Vieira (2017) e Sousa (2021) a suplementação do meio de fermentação com o extrato de abacaxi (*Ananas comosus*) preparado a partir dos seus resíduos: casca e coroa apresentaram bons resultados no processo de fermentação. Os resíduos foram lavados com detergente para retirada de terra e poeira e posteriormente foram trituradas com água destilada utilizando um liquidificador industrial. O caldo foi peneirado e centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos a 25°C para remoção das partículas insolúveis e obtenção do extrato de abacaxi puro. Subsequente o extrato de abacaxi foi congelado em freezer comum a -20°C até o momento de sua utilização.

4.4 Produção do biossurfactante

Uma porção do pré-inóculo com uma unidade de densidade óptica (DO), a 600 nm, foi transferida para um erlenmeyer que continha 150 ml de um meio de cultivo de fermentação otimizado com base em pesquisas realizadas pelo Laboratório de Processos Biotecnológicos (LABBIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O meio de cultivo industrial para fermentação submersa foi formulado com os seguintes componentes (g.L-1): extrato de abacaxi (25), extrato de levedura (15), peptona (1,5), sulfato de amônio (1), e em solução salina (g.L-1): NaCl (10), Na₂HPO₄ (5), KH₂PO₄ (2) e MgSO₄.7H₂O (0,2).

A fermentação ocorreu a 15°C e 120 rpm ao longo de 24 horas, com a adição da fonte de carbono (extrato de abacaxi) após 10 horas para atingir uma concentração final de 25 g.L-1 de glicose no meio. Após as 24 horas de fermentação, as células de levedura foram separadas do caldo fermentado por centrifugação a 8000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante, que continha os metabólitos microbianos, incluindo o biossurfactante, foi recuperado e armazenado a -20°C em um freezer convencional até o momento da extração.

4.5 Extração pelo método de acetona a frio

A acetona fria foi utilizada para extrair o biossurfactante produzido, sendo adicionada às amostras na proporção 1:3 (v/v), como descrito por Ilori e Amund (2001) e avaliado por Sousa (2021). Em seguida, foi realizada a incubação do caldo fermentado em um béquer aberto na geladeira por 10 horas a 4°C.

4.6 Determinação da concentração do biossurfactante

Após a precipitação do biossurfactante, o mesmo foi ressuscitado com água destilada e a concentração foi calculada de acordo com o método gravimétrico descrito por Machado e colaboradores (2020), aplicando a liofilização. Amostras de 2ml de biossurfactante extraído foram colocadas em Eppendorf e vedado com parafilme com leves perfurações, essas amostras ficaram 24 horas no ultrafreezer a -80°C e posteriormente foram liofilizadas por 24 horas. Em seguida, houve a pesagem do pó com o auxílio da balança analítica.

4.7 Análise da tensão superficial

Para a análise da tensão superficial, foi adotado 5 ml da amostra, biossurfactante, utilizando o anel de Noüy, com o tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemanha), em temperatura ambiente. Concomitantemente a análise da amostra, foi realizada a tensão do 5ml álcool etílico com o intuito de calibrar.

4.8 Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado a partir da metodologia descrita por Cai e colaboradores (2014), a qual consiste na mistura de solução aquosa livre de células do caldo fermentativo com o hexano, óleo de soja, óleo de motor e azeite na proporção de 1:1. As misturas foram agitadas vigorosamente no vortex durante dois minutos à temperatura ambiente e deixadas em repouso por 24 horas. A taxa de emulsificação foi calculada pela equação abaixo:

$$\% = \frac{\text{altura da emulsão} \times 100}{\text{altura total}}$$

4.9 Concentração micelar diluída

Utilizou-se da técnica descrita por Desai e Banat (1997) e realizou-se a mediação da tensão superficial para determinar a diluição micelar crítica (CDM). No teste a amostra de biossurfactante foi diluída em diferentes concentrações (de 300 a 0.05 g.L⁻¹) e a tensão superficial foi determinada para cada concentração.

4.10 Teste de estabilidade

A estabilidade do biossurfactante produzido foi avaliada sob diferentes estresses seguindo a metodologia de Dubey e colaboradores (2012). As amostras do biossurfactante, na CMD foram submetidas a diferentes estresses, em relação a estabilidade térmica as amostras foram submetidas às seguintes temperaturas: 4°C e 30°C. Em relação ao pH diferentes tampões foram empregados com o intuito de manter o pH inalterado no decorrer dos dias, testou-se o pH de 4,5; 6,6 e 8,6 e os dados foram coletados ao longo de 30 dias pré-determinados. Posteriormente, realizou-se os testes de tensão superficial.

4.11 Coleta da espuma

A coleta da espuma ocorreu no decantador dos reatores UASB do Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) na cidade de Uberlândia-MG. Foi realizada a coleta do material flutuante, acumulado superficialmente no reator, toda espuma coletada foi colocada em balde e recipientes plásticos para serem congelados em ultra-freezer a -80°C até o momento de uso.

4.12. Aplicação

Para verificar a aplicação utilizou-se da espuma obtida no DMAE e do meio de cultivo industrial padronizado pelo LABBIO. Os experimentos foram realizados segundo a metodologia modificada de Santos e Colaboradores (2017) . Foram realizados testes com diversas variáveis, usou-se do tubo falcon contendo um volume final de 5ml, no qual foi utilizado o biossurfactante em sua concentração micelar diluída (60g/L), porcentagens de 1% e 4% de espuma, meio de cultivo industrial e a adição de 1 DO do pré-inóculo da levedura. Posteriormente, os frascos foram incubados em shaker rotativo a 120 rpm a 15 °C durante 21 dias. As amostras foram retiradas nos dias 1,5,7,15, e 21 para análise.

O experimento foi conduzido nas seguintes condições:

Tabela 1 - Condições experimentais de tratamento de espuma de UASB utilizando biossurfactante.

Amostras	Biossurfactante (g/L)	Meio Industrial (ml)	Escuma (ml)	Pré- inóculo (ml)
C1 - 1% (CN)	0	4,95	0,05	0
C1- 4% (CN)	0	4,80	0,2	0
C2 - 1%	0	4,28	0,05	0,67
C2 - 4%	0	4,13	0,2	0,67
C3 -1%	60	3,98	0,05	0,67
C3- 4%	60	3,83	0,2	0,67
C4 -1%	60	4,65	0,05	0
C4 - 4%	60	4,50	0,2	0

Legenda: CN- controle negativo

4.13 Limitações Metodológicas

Para verificar as limitações que surgiram ao decorrer do experimento foi conduzida uma análise focada em identificar os principais fatores que impactaram a viabilidade da técnica utilizada, além dos aspectos que impedem a aplicabilidade desse método em larga escala.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram demonstrados por gráficos de dispersão e pelo teste ANOVA two way ($p < 0,05$) usando o Graph Prism versão 10. Os erros padrão foram calculados e apresentados como barras de erro nas representações gráficas.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção do biossurfactante

Após a fermentação obteve-se 1500 ml de caldo fermentado que posteriormente foi centrifugado para separação da levedura . A reutilização dos resíduos industriais do abacaxi, como casca, talo, coroa e folhas correspondem grande parte do peso total da fruta, ou seja, transformar esses materiais que seriam descartáveis em uma fonte econômica e acessível de carbono em processos de fermentação é extremamente vantajoso, segundo estudos conduzidos por Sousa (2021).

O uso do extrato proveniente dos resíduos de abacaxi já são amplamente usados em processos fermentativos, pois sua composição é repleta de açúcares fermentáveis (glicose, frutose e sucrose) e nutrientes diversos (Dorta e Sogi, 2016). O aproveitamento desse extrato diminui a dependência de meios de cultura comerciais, que podem ser caros, dessa forma o processo fermentativo se torna mais acessível, especialmente em larga escala (Vieira et al,2021).

5.2 Purificação com acetona

O processo de extração e purificação do biossurfactante são etapas essenciais pois a partir deles obtém-se o biossurfactante puro para ser utilizado. Diversas técnicas de purificação podem ser utilizadas para obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como recuperação com solventes miscíveis em água, como acetona e etanol, acidificação e adição de sais à solução (Sanches et al, 2021).

Durante esse estudo foi realizada a extração por acetona à frio na proporção 1:3 de acetona, que resultou em um líquido amarelado que passou por um processo de incubação. Posteriormente, o biossurfactante precipitado foi ressuspendido em água destilada e armazenado, o sobrenadante foi descartado.

Sousa (2021) em estudos anteriores analisou diversos processos de extração com diferentes solventes e o método utilizando acetona foi o método mais eficiente, apresentando rendimento de 27g.L⁻¹ quando comparado a extração com demais solventes que apresentaram rendimentos em torno de 4g.L⁻¹, e 5,5g.L⁻¹.

Diferentemente, Saimmai e colaboradores (2013) demonstraram que o uso de acetato de etila demonstrou maior atividade do extrato bruto em comparação com sistemas baseados em misturas de clorofórmio e metanol, acetona fria ou diclorometano na recuperação de componentes tensoativos do sobrenadante da cultura de *I. limosus KB3* após 54 horas de cultivo.

Dessa forma, pode-se afirmar que a eficiência dos métodos de extração de biossurfactantes varia conforme o microrganismo e o meio de cultivo utilizado, isso ocorre porque cada microrganismo possui características específicas que podem influenciar a produção e a extração do biossurfactante, como a composição da célula e os metabólitos produzidos. Ademais, o meio de cultivo pode impactar a quantidade e a qualidade do biossurfactante gerado, afetando diretamente a escolha do método de extração mais adequado.

5.3 Concentração do Biossurfactante

Para verificação da concentração do biossurfactante, utilizou-se do método gravimétrico de liofilização para retirar toda água presente na amostra por meio da sublimação. Tubos eppendorf com 2ml de amostra foram liofilizados por cerca de 24 horas e ao final foi calculado a quantidade em gramas do pó branco referente ao biossurfactante concentrado, obtendo-se uma média de 10,66 g/L .

Os resultados obtidos neste estudo apresentam tendências semelhantes às reportadas na literatura, ainda que com algumas variações. Embora não coincidam completamente com os dados previamente descritos, as diferenças observadas podem ser atribuídas a fatores específicos das condições experimentais adotadas. O estudo conduzido por Derguine-Mecheri e colaboradores (2021) a *cepa de Rhodotorula sp. YBR* registrou um rendimento de biossurfactante de 10,08 g/L .

5.4 Determinação da Tensão

Os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial pois suas porções hidrofóbicas e hidrofílicas distribuem-se em interfaces líquidas com diferentes polaridades formando microemulsões, dessa forma os hidrocarbonetos são solubilizados em água ou vice - versa (Sarubbo et al, 2022). Segundo Banat (1995), os biossurfactantes necessitam de uma menor concentração para obter os mesmos resultados que os surfactantes sintéticos na redução da tensão superficial e interfacial.

Utilizando-se do equipamento Kruss K6 foi colocado 5ml do biossurfactante que apresentou uma tensão de 43mN/m⁻¹. A presença do biossurfactante no caldo de fermentação conseguiu reduzir de 60mN/m⁻¹ para 43mM/N⁻¹. Esse resultado concorda com

a produção de biossurfactantes a partir de *Rhodotorula mucilaginosa* relatada na literatura por Sousa (2021).

Em estudos conduzidos por Mendoza e colaboradores (2022), analisou-se diferentes fontes de carbono, para produção de biossurfactante por *Bacillus* DS03. O meio que continha melaço (rico em sacarose, frutose e glicose) mostrou a redução mais significativa na tensão superficial (35 mN/m) do que os outros meios testados.

Rufino e colaboradores (2014) cultivou *C. lipolytica* em meio otimizado com 6% de resíduo de refinaria de óleo de soja e 1% de ácido glutâmico, a tensão superficial do meio começou em 50 mN/m, caiu rapidamente após a inoculação, chegando a 25 mN/m em cerca de 16 horas durante a fase exponencial e se estabilizou.

5.5 Teste de Emulsificação

Uma das principais características dos biossurfactantes é a habilidade de criar emulsões, a capacidade de dispersar óleos é crucial para o tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, pois facilita a quebra do resíduo em gotículas menores, aumentando a área de contato com os microrganismos responsáveis pela degradação do contaminante (Hazra *et al*,2011).Nesse estudo realizou-se a emulsificação do biossurfactante com diversos tipos de hidrocarbonetos e com os resultados obtidos plotou-se o gráfico a seguir (figura 1):

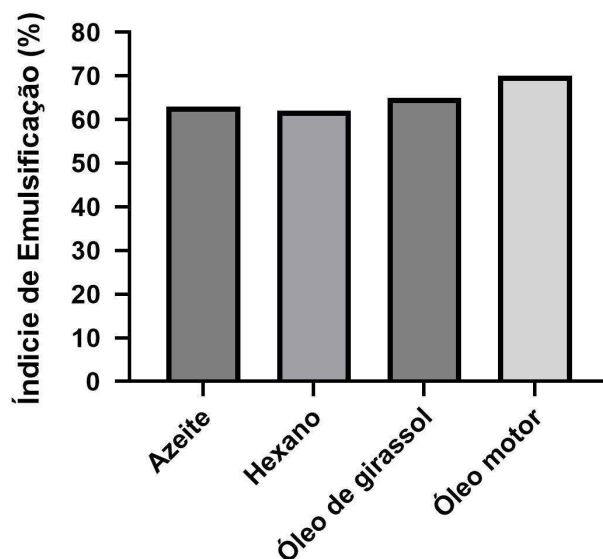


Figura 1: Índice de Emulsificação do biossurfactante .

Conforme mostrado na figura, a capacidade do biossurfactante produzido pela *Rhodotorula mucilaginosa* em emulsionar os diversos óleos foi positiva, apresentando índices de emulsificação variando entre 62% a 70%. O melhor índice de emulsificação foi obtido pela amostra do óleo motor que demonstrou 70% de emulsificação, já o hexano apresentou o valor mais baixo, cerca de 62%. O azeite apresentou um índice de 63% e o óleo de girassol apresentou 65%, resultados próximos.

Segundo Bharali e colaboradores (2011), para o índice de emulsificação ser significativo, ele deve ser igual ou acima de 60%, dessa forma todos os valores encontrados no presente estudos podem ser considerados significativos. O óleo motor é mais propenso a ser emulsionado por um biossurfactante devido à sua composição de hidrocarbonetos de cadeia longa e maior viscosidade, que facilitam a formação de interfaces estáveis. Diferentemente do hexano que é um alceno de cadeia curta altamente volátil e com baixa viscosidade, reafirmando os resultados obtidos pelo estudo.

Em estudos realizados por Souza (2021), a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L69 apresentou 100% de emulsificação para óleo motor. Durval e colaboradores (2021)

analisaram o biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* que apresentou valores de emulsificação de 65,8% para óleo canola e 56% para óleo de soja.

Na pesquisa conduzida por Sousa e colaboradores (2011), as propriedades emulsificantes dos biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* MSIC02 apresentou melhor emulsificação para óleo de soja, biodiesel de mamona e óleo naftênico (de 64% a 65%).

Luna e colaboradores (2015), realizaram testes para determinação dos índices de emulsificação, *C. sphaerica* UCP0995 cultivado em água destilada suplementada com 9,0% de resíduo de refinaria de óleo de soja e licor de maceração de milho. Os melhores resultados para as emulsões foi o óleo de motor seguido do óleo de milho, enquanto a emulsificação do óleo de soja pelo biossurfactante produzido no biorreator foi desprezível.

5.6 Concentração Micelar Diluída

A figura 2 foi elaborada a partir dos resultados das tensões superficiais obtidas nas diferentes concentrações de biossurfactantes testadas.

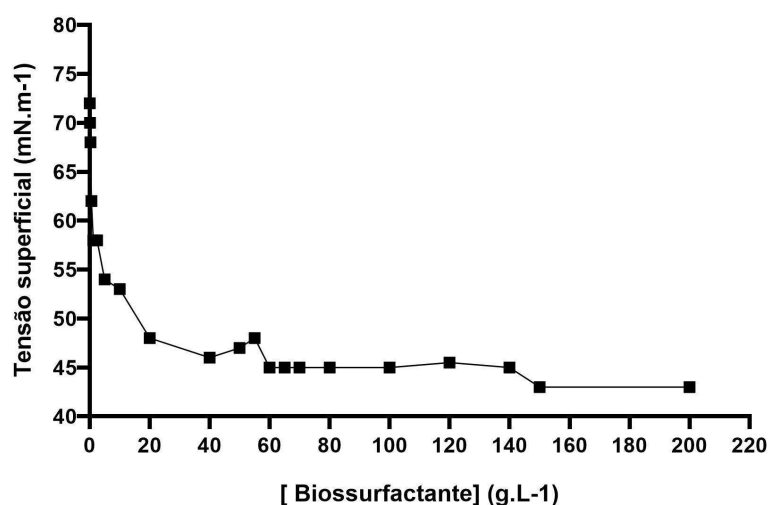


Figura 2: Concentração micelar Diluída (CMD) do biossurfactante.

A Concentração Micelar Crítica (CMC) e a Concentração Micelar Diluída (CMD) são parâmetros importantes na caracterização de surfactantes. A partir do gráfico é possível analisar a CMD ao verificar que a tensão se estabilizou na concentração de cerca de 60g/L, no qual apresentou uma redução de tensão de 72 mN.m⁻¹ para 45 mN.m⁻¹. A CMD refere-se à concentração a partir da qual o surfactante começa a afetar significativamente as propriedades da solução, como a tensão superficial.

A diluição na qual a tensão superficial começa a aumentar é conhecida como concentração micelar crítica (CMC), indicando que a concentração do biossurfactante ultrapassou o ponto crítico. Uma CMC mais elevada sugere que o surfactante é mais promissor para aplicações industriais, pois auxilia na determinação da concentração ideal para otimizar o desempenho e reduzir custos (Wahaibi *et al*,2014).

Segundo Souza (2021), quando a concentração do surfactante excede a concentração micelar diluída (CMD), a tensão superficial permanece constante em um valor mínimo. No entanto, abaixo dessa concentração, a tensão superficial aumenta gradualmente. Dessa forma, os resultados desse estudo estão de acordo com as evidências descritas em pesquisas anteriores.

Rufino e colaboradores (2014) analisaram o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988 no qual constataram que a tensão superficial da água diminuiu gradualmente com o aumento da concentração de biossurfactante, de 70 mN/m para 25 mN/m, com uma concentração de biossurfactante de 0,03%, e então permaneceu constante.

5.7 Teste de estabilidade

Fatores ambientais podem afetar a atividade do biossurfactante, incluindo temperatura, pH e salinidade. Considerando a aplicabilidade dos biossurfactantes na

biorremediação, a eficácia do biossurfactante deve ser avaliada sob condições de diferentes temperaturas, pH e salinidade (Li *et al*, 2022).

As figuras 3 e 4 foram feitas com o auxílio do software *GraphPad prism 10* no qual foi possível verificar a significância da temperatura e dos diferentes pH pelo teste ANOVA.

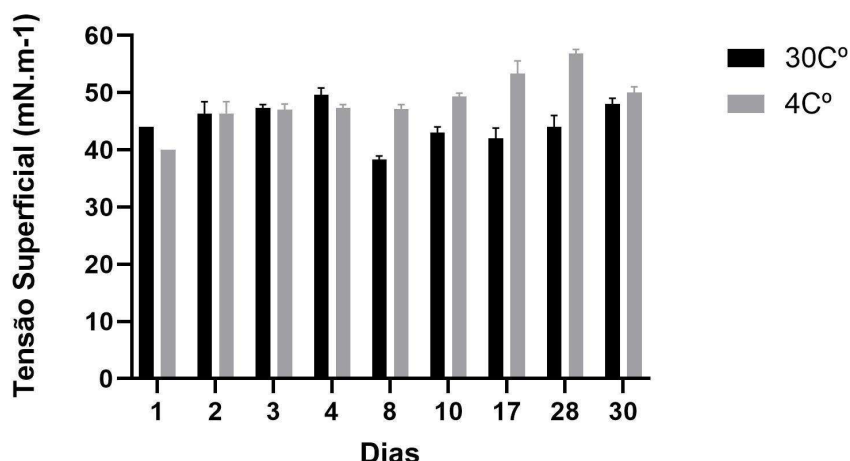


Figura 3: Estabilidade da Tensão Superficial do biossurfactante (CMD) com variações de temperatura ao longo de 30 dias. Análise estatística realizada por meio da ANOVA de dois fatores. Os resultados indicam diferenças significativas entre os grupos, com $p < 0,05$. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão para cada grupo.

Observando a figura 3 é possível verificar que na temperatura de 4°C houve maior variação de tensão ao longo dos 30 dias quando comparada a amostra de 30°C. A amostra de 30°C se mostrou mais estável entre os dias 10 e 28 na faixa entre 44 mN/m-1 e 46 mN/m-1 . Já a temperatura de 4°C se apresentou mais estável entre os dias 02 e 08 apresentando valores entre 47 mN/m-1 e 48 mN/m-1, após esse período houve um aumento da tensão.

A partir da análise estatística é possível verificar que a temperatura tem um efeito estatisticamente significativo na variável dependente. Isso significa que as diferenças nas temperaturas (30°C e 4°C) influenciam significativamente os resultados. Em relação ao tempo é verificado que ele não tem um efeito estatisticamente significativo na variável dependente. Isso indica que as medições ao longo dos dias não mostram uma diferença

significativa. Dessa forma, pode-se concluir que o biossurfactante possui grande estabilidade ao decorrer dos dias.

Estudos conduzidos por Bezerra (2012) foi verificado que o biossurfactante produzido cepa de *Pseudomonas aeruginosa* AP029- GLVIA se apresentou pouco estável em diferentes condições de temperaturas, foi analisado a tensão depois de 24 horas em temperaturas de 50 C°, 60C° e 70C°, foi constatado que a temperatura afetou a estabilidade do biossurfactante, verificou-se um aumento da tensão superficial.

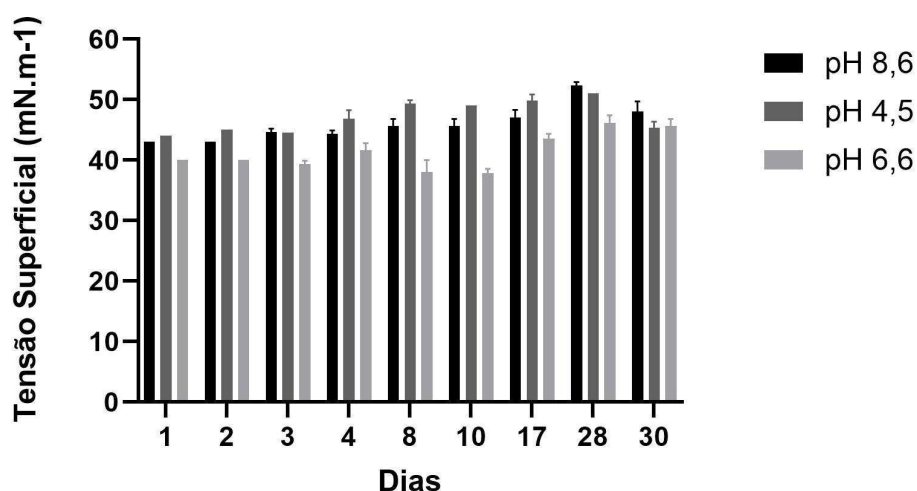


Figura 4: Tensão superficial do biossurfactante após aplicação do estresse em diversos pH ao longo de 30 dias. Análise estatística realizada por meio da ANOVA de dois fatores. Os resultados indicam diferenças significativas entre os grupos, com $p < 0,05$. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão para cada grupo.

Ao analisar a figura 4 é possível afirmar que a amostra de pH 8,6 permaneceu sem variações drásticas entre os dias 01 até dia 17 entre 43 mN/m-1 e 45 mN/m-1, houve pouca variação ao longo dos 30 dias quando comparado ao pH 4,5 que permaneceu mais constante entre os 3 primeiros dias (cerca de 44 mN/m-1) e depois houve um aumento da tensão entre os dias 8 e 28 ficando entre 49 mN/m-1 e 51 mN/m-1.

O pH 6,6 apresentou poucas variações ao longo dos 30 dias, apresentando tensões mínimas de 38 mN/m-1 e máxima de 46 mN/m-1 no dia 28. Conclui-se que o biossurfactante consegue atuar em uma ampla variedade de temperatura e pH, afirmando sua versatilidade de uso.

França e colaboradores (2015) discutem a produção de um biossurfactante por *Bacillus subtilis* ICA56 visando a biorremediação de solos impactados. Foi demonstrado alta estabilidade e eficiência em condições extremas de pH, temperatura e salinidade. O biossurfactante manteve baixos valores de tensão superficial (abaixo de 40 mN/m) em uma faixa de pH de 6,0 a 10,0, com a menor tensão (31 mN/m) em pH 8,0. As propriedades tensoativas do biossurfactante permaneceram inalteradas em temperaturas entre 4°C e 75°C, destacando o potencial de aplicação em ambientes adversos.

Foi mostrado por Li e colaboradores (2022) que ao variar o pH do sobrenadante livre de células entre 2 e 12, a tensão superficial permaneceu relativamente estável em condições neutras e ácidas. A menor tensão superficial (26,2 mN/m) foi alcançada em pH 7, indicando que o biossurfactante é mais ativo em condições neutras. Em pH alcalino, a tensão superficial e o índice de emulsificação diminuíram gradualmente, mostrando que condições extremas de pH afetam a estrutura e a atividade do biossurfactante.

5.8 Aplicação biotecnológica

A espuma gerada no tratamento de esgoto é geralmente destinada a aterros, o que acarreta custos de transporte e disposição, tornando-se um problema ambiental e econômico. Dessa forma, o biossurfactante apresenta ser promissor devido sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade e degradar hidrocarbonetos presentes na espuma. Mesmo após passar por processos de desidratação e desinfecção, a espuma não é recomendada para uso, como na

agricultura devido à presença de óleos e gorduras, que podem causar a impermeabilização do solo (Chernicharo, 2010; Metcalf e Eddy *et al*, 2003).

Os surfactantes aumentam a degradação microbiana ao melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade dos compostos orgânicos hidrofóbicos (HOCs), aumentar a hidrofobicidade da membrana celular e reduzir as tensões interfaciais, promovendo mais contato entre os HOCs e os microrganismos presentes no local (Zhang *et al*, 1998).

A taxa de biodegradação de um surfactante específico depende diretamente de sua capacidade de solubilização, que por sua vez é influenciada pelas características de suas micelas (Zheng *et al*, 2012). Assim, foi conduzido um estudo que verificou o comportamento do biossurfactante, levedura e espuma em conjunto durante 21 dias de fermentação, analisando parâmetros de absorbância e tensão superficial.

5.8.1 Absorbância

As figuras 5 e 6 abordam o comportamento do biossurfactante em relação a absorbância ao longo dos dias nas diferentes concentrações de espuma, 4% (figura 5), 1% (figura 6) os gráficos foram feitos utilizando pontos de dispersão no software *GraphPad prism 10*.

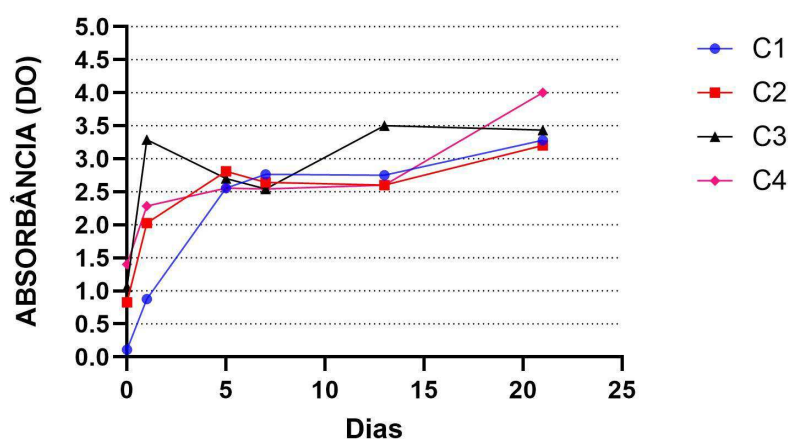


Figura 5: Análise de absorvância : verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle-meio de cultura + espuma (4%) ; C2 - meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + espuma (4%); C3- meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + espuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + espuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1). ANOVA - TWO WAY ($p < 0,05$)

Observando a figura 5 pode-se afirmar que a condição C3 teve um crescimento inicial mais elevado quando comparada às demais amostras, isso sugere uma interação positiva entre a levedura e a espuma, onde a levedura pode estar facilitando a degradação ou assimilação de componentes da espuma, aumentando a turbidez. Após o quinto dia, há uma leve estabilização, indicando que o sistema chegou a um equilíbrio ou que a ação da levedura sobre a espuma atingiu um ponto máximo.

A amostra C4 apresentou um comportamento relativamente estável ao longo dos dias, a presença do biossurfactante parece ter proporcionado um ambiente onde a espuma não promoveu grandes alterações no comportamento de absorvância. Nesse caso sugere-se que o biossurfactante pode ter ação estabilizadora sobre o sistema com espuma ou reduzir sua efetividade na formação de uma barreira, limitando o aumento da absorvância.

A absorvância da condição C1, controle , aumentou de forma gradual, atingindo seu pico por volta do 5º dia. Isso sugere que a espuma, sozinha, tem uma certa influência na turbidez do meio, mas sem a presença de agentes externos como a levedura ou o biossurfactante, não há mudanças significativas após um tempo inicial de ajuste ao meio de cultura.

A condição C2 apresenta que a presença da levedura permite um aumento mais significativo da absorvância após o 5º dia, sugerindo que a levedura pode estar metabolizando ou interagindo com os componentes da espuma, aumentando a turbidez do meio. A levedura resulta em um aumento progressivo da absorvância ao longo do tempo, o que não é observado na C1. Dessa forma, a levedura está desempenhando uma função ativa no sistema,

provavelmente degradando componentes da espuma ou utilizando nutrientes presentes no meio, o que pode aumentar a densidade celular e, conseqüentemente, a absorbância.

A condição (C3) que combina ambos, levedura e biossurfactante, mostrou o maior efeito, especialmente nos primeiros dias, enquanto o biossurfactante sozinho (C4) parece ter uma ação mais estabilizadora sobre o sistema. Se a absorbância aumenta devido à melhor emulsificação e dispersão de compostos orgânicos, pode ser indício que biossurfactante está ajudando na quebra da espuma, o que, em contextos industriais, pode ser positivo por aumentar a solubilidade dos compostos.

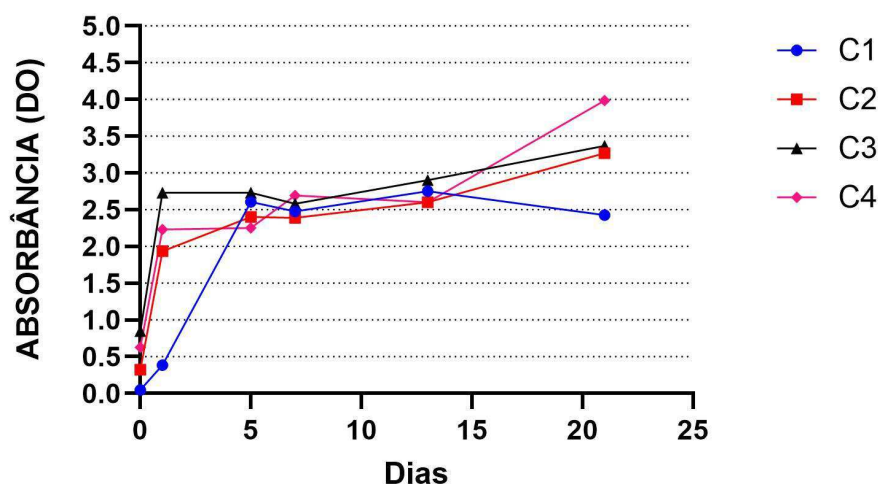


Figura 6: Análise de absorbância : verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + espuma (1%) ; C2 - meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + espuma (1%); C3- meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + espuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + espuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).ANOVA - TWO WAY (p<0,05)

Observando a figura 9, entre os dias 0 a 5 a absorbância aumenta rapidamente, indicando um crescimento inicial acelerado da levedura, isso é comum nas fases iniciais de fermentação onde os nutrientes são abundantes e a levedura está se multiplicando rapidamente. Dos dias 5 a 10, a taxa de aumento da absorbância começa a diminuir, sugerindo que a levedura está entrando em uma fase de crescimento mais lento devido à

diminuição dos nutrientes disponíveis ou ao acúmulo de produtos metabólicos que inibem o crescimento.

Posteriormente, a absorbância atinge um platô, indicando que a levedura atingiu a fase estacionária. Nesta fase, a taxa de crescimento é equilibrada o que pode estar relacionado com a taxa de morte celular, resultando em uma população estável. A condição C1 mostra um aumento inicial na absorbância, seguido por uma estabilização ou leve diminuição, apresentando o mesmo comportamento relatado na figura 5. Já a C2 mostra um aumento constante na absorbância ao longo dos dias, a presença de levedura junto com a espuma resulta em um crescimento contínuo, isso ocorre devido a levedura se multiplicar, resultando em um aumento constante na absorbância.

A C3 mostra que a adição de biossurfactante junto com a levedura e a espuma inicialmente promove um crescimento rápido, mas depois a atividade se estabiliza. Kitamoto e colaboradores (1993) afirmam que a produção de biossurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, ou seja, durante a fase estacionária. Isso pode indicar que o biossurfactante facilita a absorção de nutrientes inicialmente, mas a disponibilidade de nutrientes ou outros fatores limitantes estabilizam o crescimento.

Diferentemente da C4, em que a combinação de biossurfactante e espuma, sem a presença de levedura, ainda resulta em um aumento significativo na absorbância. Isso sugere que o biossurfactante tem um efeito positivo na atividade do meio e da espuma, possivelmente facilitando a liberação ou a absorção de nutrientes.

A diferença observada entre os valores de 1% e 4% é bastante sutil, indicando uma variação pequena que não resulta em mudanças significativas. Para uma análise mais robusta, seria necessário utilizar valores mais discrepantes de concentração de espuma, onde a diferença seria suficientemente para evidenciar um impacto mais claro e conclusivo.

5.8.2 Tensão Superficial

Conforme descrito por Santos e colaboradores (2016), dois mecanismos de degradação principais podem estar envolvidos no processo de biodegradação. O primeiro é o aumento da biodisponibilidade do substrato hidrofóbico, enquanto o segundo envolve a interação do biossurfactante com a superfície da célula bacteriana, tornando-a mais hidrofóbica. Isso favorece a adesão dos substratos hidrofóbicos às células, facilitando sua degradação.

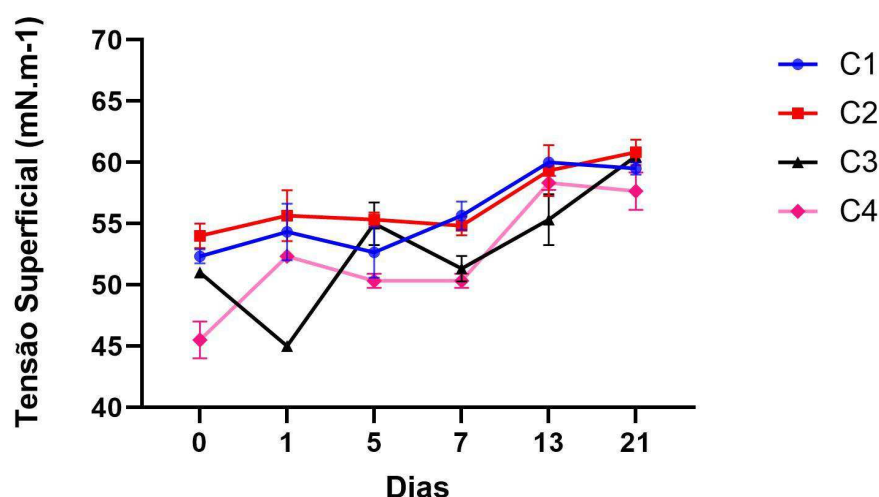


Figura 7: Análise de variação da tensão superficial: verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + escuma (4%) ; C2 - meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + escuma (4%); C3- meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + escuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + escuma (4%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).ANOVA - TWO WAY ($p < 0,05$)

Observando a figura 7 é possível afirmar que a C2 teve um crescimento da tensão sem muita variação ao longo dos dias, diferentemente da C3 que apresentou grandes variações, apresentando no final uma tensão de 60 mN/m⁻¹. A C4 apresentou a menor tensão ao final do experimento, isso pode ter ocorrido devido à ausência de levedura, ou seja, não houve mortalidade celular, apenas a ação do biossurfactante foi observada.

A condição C1 4%, considerada a controle, apresenta uma curva que começa com valores de tensão em torno de 54 mN/m⁻¹, flutua levemente, mas tem uma tendência geral de aumento até o dia 20, chegando a aproximadamente 60 mN/m⁻¹. Isso ocorre porque a espuma contém microrganismos em sua composição, de modo que, mesmo sem a adição da levedura, os microrganismos presentes na amostra se desenvolveram utilizando os nutrientes do meio de cultura.

A condição C2 4% começa com uma tensão em torno de 54 mN/m⁻¹ mas no final alcança cerca de 60 mN/m⁻¹. Já a condição C3 4% começa mais baixa (45 mN/m⁻¹), sobe até cerca de 55 mN/m⁻¹ no dia 5, mas depois estabiliza. A condição C4 4% começa próxima de 50 mN/m⁻¹ e depois mantém-se quase constante em torno de 55 mN/m⁻¹, apresentando a menor variação de tensão.

Devido a capacidade dos biossurfactantes em emulsionar eficientemente dois líquidos imiscíveis (óleo e água), pode-se deduzir que quanto mais o biossurfactante consegue reduzir a tensão superficial e interfacial, maior pode ser a biodegradação dos hidrocarbonetos. A diminuição da tensão superficial melhora a dispersão dos hidrocarbonetos em gotículas menores e aumenta a área de contato disponível para as enzimas microbianas, o que pode levar a uma taxa mais alta de degradação.

O estudo realizado por Faccioli e colaboradores (2022) apresentou o biossurfactante produzido por *Pseudomonas cepacia* CCT 6659 no qual analisou os resultados da degradação de óleo de motor adsorvido na areia ao longo de 70 dias. A remoção de óleo foi significativamente maior com o uso do biossurfactante isolado (94,5%) quando comparado a condição sem biossurfactante.

A formação de micelas pelo biossurfactante pode aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos, tornando-os mais acessíveis para os microrganismos. Dessa forma,

conclui-se que a adição do biossurfactante, condição C4 consegue reduzir de forma efetiva a tensão superficial apresentando valores mais baixos quando comparada ao controle.

Em estudos conduzidos por Sponza e Gok (2010), foi observado um aumento de 18% na eficiência de remoção de hidrocarbonetos poliaromáticos ao adicionar 15 mg/L de ramnolípido no tratamento de efluentes de refinaria de petróleo com sistema de lodo ativado. Os modelos propostos para simular essa remoção indicaram que 94% dos hidrocarbonetos foram eliminados por biodegradação, afirmando a capacidade do biossurfactante em aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos.

D'Almeida e colaboradores (2024) analisaram o potencial de biorremediação do bioemulsificante produzido pela cepa *A. venetianus AMO1502* que foi avaliado quanto à sua eficácia na dispersão de óleo em ambiente marinho. Os resultados apresentados neste relatório indicaram uma redução na massa de óleo do meio atribuída ao bioemulsificante. Na concentração de 10% (p/v) e 1% (p/v), o agente tensoativo dispersou $11,9 \pm 0,4\%$ e $6,9 \pm 0,6\%$, respectivamente.

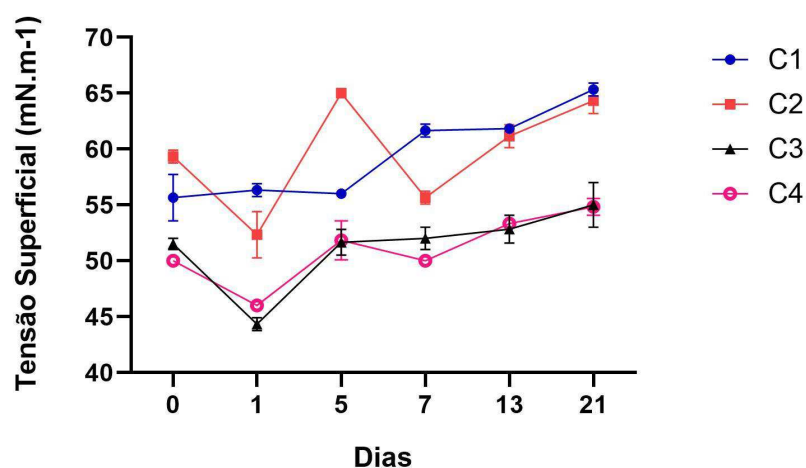


Figura 8: Análise de variação da tensão superficial: verificação da fermentação ao longo dos dias. Condições : C1- controle- meio de cultura + espuma (1%) ; C2 - meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + espuma (1%); C3- meio de cultura + levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) + espuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1); C4- meio de cultura + espuma (1%)+ biossurfactante na CMD (60 g.L-1).ANOVA - TWO WAY ($p < 0,05$)

Avaliando a figura 8, a condição C1, apresentou os valores mais altos de tensão superficial ao longo do experimento devido ao fato de ser composto apenas por espuma e meio de cultivo, atingindo aproximadamente 62 mN/m no dia 20, finalizando com a maior tensão superficial entre todas as condições avaliadas. A C2 representa uma das maiores reduções entre as condições, iniciando com 53mN/m e finalizando com aproximadamente 60 mN/m, assim, a C2 atingiu valores de tensão superficial próximos aos da condição C1 ao final do experimento.

A condição 3 iniciou com uma tensão superficial de 53 mN/m, posteriormente apresentou uma leve queda atingindo aproximadamente 47 mN/m, ao final C3 sobe até cerca de 54 mN/m, permanecendo em uma tensão relativamente mais baixa .

A condição C4 iniciou com a tensão superficial em torno de 50 mN/m e no decorrer dos dias apresentou uma queda para aproximadamente 44 mN/m e posteriormente do dia 5 em diante começa a subir gradualmente, mas permanece como a condição com a menor tensão superficial ao longo de todo o experimento, atingindo, ao final, cerca de 53 mN/m.

O comportamento observado no gráfico pode ser explicado por vários fatores relacionados às condições de fermentação e à interação dos componentes envolvidos. A queda acentuada na tensão superficial nos primeiros dias (especialmente em C2, C3 e C4) pode ser causada pela produção de metabólitos, nos primeiros estágios da fermentação, os microrganismos podem estar produzindo substâncias como ácidos orgânicos ou surfactantes, que inicialmente podem reduzir a tensão superficial do meio.

A recuperação da tensão superficial após o dia 5 em C1 e C2 pode ser explicada pela produção de biossurfactantes durante a fase de crescimento logarítmico ou estacionária, a produção de biossurfactantes pode aumentar, o que explicaria a subida da tensão superficial. Além disso, substâncias que inicialmente diminuíram a tensão superficial (como ácidos

orgânicos) podem ser consumidas ou degradadas pelos microrganismos com o tempo, permitindo que a tensão superficial se recupere.

Outro ponto importante é o substratos limitantes, nessas condições, os microrganismos podem estar enfrentando limitações nutricionais ou estresse ambiental, o que prejudica sua capacidade de recuperação ou produção de compostos responsáveis pelo aumento da tensão superficial. Ademais, microrganismos podem produzir compostos que afetam a tensão superficial, como proteínas de superfície, polissacarídeos e lipídeos. O tempo de produção desses compostos varia com as condições do meio.

Em estudos conduzidos por Guo e colaboradores (2022) , após 21 dias de crescimento a 4 °C em meio com 1% de óleo bruto e 1% de caldo de bactérias uma cepa adaptada ao frio, chamada *Planococcus* sp. XW-1, que foi isolada do Mar Amarelo, degradou 54% do óleo bruto . O resultado mostrou que a cepa XW-1 tem uma boa capacidade de degradar petróleo em baixa temperatura.

5.9 Viabilidade Econômica e Limitações Metodológicas

O meio de cultura utilizado durante o processo de fermentação foi economicamente vantajoso devido ao aproveitamento dos resíduos industriais de abacaxi como fonte de substrato, o que reduziu significativamente os custos com o meio de cultura e contribuiu para um processo mais sustentável, sendo um ponto positivo quando comparado a métodos que usam exclusivamente substratos e componentes químicos.

Entretanto, a etapa de extração do biossurfactante encarece o processo, o método utilizado de extração por acetona durante o experimento é considerado o método mais eficiente de extração devido ao alto rendimento de biossurfactante conforme descrito em estudos anteriores de Sousa (2021) contudo, a compra de acetona é controlada por órgãos governamentais devido sua alta utilização em processos de fabricação de drogas ilícitas.

Utilizou-se do rotaevaporador com o objetivo de reutilizar essa acetona contudo, a quantidade não foi suficiente, além de ser uma etapa adicional, dessa forma, essa limitação dificultou que fosse extraído um volume maior de biossurfactante, consequentemente, impossibilitando a realização de experimentos mais direcionados para quantificação da espuma degradada pelo biossurfactante.

Para estudos futuros, é interessante a realização de testes de quantificação de nitrogênio, oxigênio e carbono presentes na espuma gerada, a fim de compreender melhor sua composição química e o potencial de aplicação em diferentes contextos industriais.

Além disso, seria interessante quantificar o nível de degradação da espuma proporcionado pela ação do biossurfactante, o que possibilitaria avaliar a eficácia do composto em processos de biorremediação. Outro ponto relevante é a busca por métodos de extração mais acessíveis e simples, que possam ser facilmente escaláveis, facilitando o uso em larga escala e reduzindo os custos e as dificuldades logísticas atualmente observadas.

6.0 CONCLUSÃO

Embora a hipótese inicial sugerisse que o biossurfactante aumentaria significativamente a degradação dos hidrocarbonetos com os resultados obtidos a partir dos estudos realizados, não foi possível afirmar essa hipótese com convicção. No presente estudo foi produzido biossurfactantes a partir da levedura *Rhodotorula mulaciginosa* utilização de resíduos agroindustriais de abacaxi como fonte de substrato pelo método de fermentação submersa, no qual foi obtido uma concentração de biossurfactante foi de 10,66 g/L.

A capacidade de emulsificação do biossurfactante apresentou índices variando entre 63% e 70%. Em relação a interação do biossurfactante com a espuma houve em ambas as concentrações (1% e 4%) de espuma uma interação que gerou o aumento da turbidez. Quanto à tensão superficial, as amostras com biossurfactante apresentaram valores mais baixos de

tensão superficial ao longo dos 21 dias de fermentação, concluindo que houve uma interação positiva. Dessa forma, conclui-se que o biossurfactante possui grande potencial para ser usado em processos de biorremediação, contudo futuramente serão necessários experimentos mais específicos para o cálculo da porcentagem de degradação de espuma.

7.0 REFERÊNCIAS

AL-WAHAIBI, Y. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 114, p. 324–333, 2014.

BAHIA, F. M. et al. Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 2905, 2018.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.

BHARALI, P. et al. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. [s.l.] **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2011.

CAI, Q. et al. Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 402–410, 2014.

CHEN, W.-C.; JUANG, R.-S.; WEI, Y.-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical engineering journal**, v. 103, p. 158–169, 2015.

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores anaeróbios.1 ed. Belo Horizonte: **Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 1997. 246p.

CRUZ MENDOZA, I. et al. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and application in cleaning out place system in a pilot sausages processing. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1518, 2022.

DA SILVA FACCIOLO, Y. E. et al. Application of a biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* CCT 6659 in bioremediation and metallic corrosion inhibition processes. **Journal of biotechnology**, v. 351, p. 109–121, 2022.

D'ALMEIDA, A. P. et al. Bioemulsifier production by *Acinetobacter venetianus* AMO1502: Potential for bioremediation and environmentally friendly applications. **Marine pollution bulletin**, v. 203, n. 116436, p. 116436, 2024.

DE ALMEIDA, D. G. et al. Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1718, 2016.

DE FRANÇA, Í. W. L. et al. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis today**, v. 255, p. 10–15, 2015.

DE SOUSA, J. R. et al. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1831–1839, 2011.

DERGUINE-MECHERI, L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; DJENANE, D. Biosurfactant production from newly isolated *Rhodotorula* sp.YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, 2021.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews** :MMBR, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DORTA, E.; SOGI, D. S. Value added processing and utilization of pineapple by-products. Em: Handbook of Pineapple Technology. **Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd**, 2016. p. 196–220.

DUBEY, K. V. et al. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource technology**, v. 126, p. 368–374, 2012.

DURVAL, I. J. B. et al. Application of a biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 from waste frying oil as an emulsifier in a cookie formulation. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 189, 2021.

GUO, P. et al. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain *Planococcus* sp. XW-1 from the cold marine environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 2, p. 782, 2022.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Biosurfactant-assisted bioaugmentation in bioremediation. Em: Microorganisms in Environmental Management. Dordrecht: **Springer Netherlands**, 2012. p. 631–664.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985–992, 2005.

ILORI, M. O.; AMUND, D. I. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. Zeitschrift für Naturforschung. C, **Journal of biosciences**, v. 56, n. 7–8, p. 547–552, 2001.

INÈS, M.; DHOuha, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 2015.

KITAMOTO, D. et al. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Journal of biotechnology**, v. 29, n. 1–2, p. 91–96, 1993.

LI, Z. et al. Biosurfactants: Production and application in remediation of oil-contaminated soil and water. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 2022.

LUNA, J. M. et al. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. Colloids and surfaces. A, **Physicochemical and engineering aspects**, v. 480, p. 413–418, 2015.

MACHADO, T. S. et al. Effects of homemade biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* on bioremediation efficiency of a clay soil contaminated with diesel oil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 201, n. 110798, p. 110798, 2020.

NITSCHKE, Marcia. **Produção e caracterização do biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manípueira como substrato**. 2004. 88f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1596681>. Acesso em: 06 out. 2024.

RUFINO, R. D. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic journal of biotechnology: EJB**, v. 17, n. 1, p. 34–38, 2014.

SAIMMAI, A.; UDOMSILP, S.; MANEERAT, S. Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium *Inquilinus limosus* KB3 grown on low-cost raw materials. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1327–1339, 2013.

SANCHES, M. A. et al. Production of biosurfactants by ascomycetes. **International journal of microbiology**, v. 2021, p. 6669263, 2021.

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

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process biochemistry**, v. 54, p. 20–27, 2017.

SARUBBO, L. A. et al. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical engineering journal**, v. 181, n. 108377, p. 108377, 2022.

SOUSA, T. G. C. **Produção de biossurfactante pela levedura da antártica *Rhodotorula mucilaginosa* CRM747: desenvolvimento de um meio de cultura ótimo e aplicação biotecnológica**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Curso de Engenharia Química-Universidade Estadual de Campinas,Campinas,2021.

SOUZA, C. L. **Produção e caracterização físico-química da espuma originária de reatores UASB tratando esgotos tipicamente domésticos**. 2005.

SOUZA, C. L. **Estudo quantitativo e qualitativo de espuma acumulada em reatores UASB tratando esgotos domésticos**. 2006.

SPONZA, D. T.; GÖK, O. Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater. **Bioresource technology**, v. 101, n. 3, p. 914–924, 2010.

VALADÃO, G. V. **Efeitos ecotóxicos do biossurfactante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* utilizando espécie de cladócero de água doce**. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/39718>>. Acesso em: 18 out. 2024.

VAN HAANDEL, A.; LETTINGA, G. Tratamento anaeróbio de esgoto. Um manual para regiões de clima quente. [s.l: s.n.].

VIEIRA, E. C. S. et al. Aceitabilidade e características físico-químicas de geleia mista de casca de abacaxi e polpa de pêssego. **Cientifica**, v. 45, n. 2, p. 115, 2017.

VIEIRA, I. M. M. et al. Potential of pineapple peel in the alternative composition of culture media for biosurfactant production. **Environmental science and pollution research international**, v. 28, n. 48, p. 68957–68971, 2021.

WANG, Y. et al. Exploring the effects of different types of surfactants on zebrafish embryos and larvae. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 10107, 2015.

ZHENG, C. et al. Optimization of biosurfactant-mediated oil extraction from oil sludge. **Bioresource technology**, v. 110, p. 338–342, 2012.