



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Karina Peres Ferrassoli

Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato.

São José do Rio Preto

2019

Karina Peres Ferrassoli

Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato.

Dissertação apresentada como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz.
Financiadora: CNPq – Processo: 132638/2017-7

São José do Rio Preto

2019

Ferassoli, Karina Peres

F345p

Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato / Karina Peres Ferassoli.

- São José do Rio Preto, 2019.

95 f. : il., tabs., + 1 CD- ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Biopolímeros. 3. Biossurfactantes. 4. Substratos renováveis. 5. Abacaxi.

Karina Peres Ferrassoli

Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato.

Dissertação apresentada como parte de requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Processo: 132638/2017-7

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP- São José do Rio Preto - Orientador

Prof^a.Dr^a. Silvia Messias Bueno
UNILAGO – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
08 de Maio de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela força e pelo apoio ao longo desse caminho e por confiarem em mim, minha mãe amada que me manteve forte e nunca me deixou desistir.

Ao meu amado Deus e sua enorme magnitude por me manter firme em meus pensamentos e projetos.

Agradeço ao meu companheiro Antônio pela companhia nas noites varadas no laboratório e pela força, eu te amo.

Ao meu orientador que se manteve paciente comigo e sempre acreditou no meu potencial.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, processo: 132638/2017-7.

Agradeço aos colegas de laboratório por me ajudarem nessa caminhada.

Agradeço a minha banca por estarem comigo nessa etapa tão importante da minha vida.

RESUMO

Biossurfactantes são grupos de compostos químicos produzidos por bactérias, fungos e leveduras através da biodegradação de matérias-primas renováveis. Tais compostos possuem característica anfipática, agindo como emulsificantes de hidrocarbonetos. São polímeros que formam micelas que se acumulam na interface entre líquidos de diferentes graus de polaridade. A utilização de biossurfactantes tornou-se uma alternativa bastante interessante em substituição aos surfactantes sintéticos, pois geram menor impacto ambiental devido à sua biodegradabilidade, diversidade estrutural e baixa toxicidade. O abacaxi é uma fruta tropical muito consumida no Brasil, principalmente o suco e a fruta “in natura”, gerando assim uma grande quantidade de resíduos como a casca e o talo de abacaxi. O presente trabalho teve como objetivo a produção de biossurfactante por meio da fermentação dos resíduos hidrolisados do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*), por *Candida tropicalis*. A hidrólise foi realizada utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico submetidas a diferentes tempos de aquecimento em autoclave. Foram realizadas análises de açúcares, composto fenólico e produção de biossurfactantes. Os resultados indicaram que a melhor concentração de ácido sulfúrico para realização da hidrólise foi 2,5% de H₂SO₄ com tempo de aquecimento de 15 minutos. A desintoxicação diminuiu a quantidade de compostos fenólicos. Foi determinada a melhor forma da produção de biossurfactantes por fermentação durante 12 horas e utilizando como fonte de carbono os hidrolisados da casca de abacaxi, talo de abacaxi e glicose na concentração de 5%. A partir destes resultados testou-se a capacidade de produção de biossurfactante utilizando o hidrolisado da casca e do talo de abacaxi e glicose. Os biossurfactantes produzidos após 2h, 4h, 6h e 8h em todos os substratos mantiveram um índice de emulsificação menor do que 50%, já os biossurfactantes produzidos após 10 horas de fermentação tiveram valores próximos de 50% e mantiveram a estabilidade da emulsão acima das 24 horas. Os resultados obtidos para atividade emulsificante mostraram que quanto maior for a concentração de biossurfactante e maior o tempo de fermentação maior foi o valor de atividade emulsificante. Foram constatadas

reduções da tensão superficial para os biossurfactantes produzidos a partir dos hidrolisados de todos os substratos. Deste, o biossurfactante obtido usando o hidrolisado do talo reduziu a tensão superficial até 30 mNm^{-1} . A concentração micelar crítica teve seu valor menor também com o biossurfactante produzido pelo hidrolisado do talo de abacaxi, porém todos os substratos mantiveram valores baixos o que indica que os biossurfactantes produzidos foram eficazes. Foi analisado o índice de emulsificação em ensaios imitando um molho tipo francês. A formulação contendo 6 mL de biossurfactante estabilizou a mistura melhor. A análise em tempos de 15 em 15 dias verificou que com essa formulação há uma estabilização do molho, havendo pouca variação nos 120 dias analisados.

Palavras - chave: Biossurfactante, fermentação, abacaxi.

ABSTRACT

Biosurfactants are groups of chemical compounds produced by bacteria, fungi and yeasts through the biodegradation of renewable raw materials. Such compounds have amphipathic properties, acting as hydrocarbon emulsifiers. They are polymers that form micelles that accumulate at the interface between liquids of different degrees of polarity. The use of biosurfactants has become a rather interesting alternative to synthetic surfactants because they generate less environmental impact due to their biodegradability, structural diversity and low toxicity. Pineapple is a tropical fruit very consumed in Brazil, mainly the juice and the fruit "in natura", thus generating a great amount of residues like the peel and the stem of pineapple. The present work had as objective the production of biosurfactant by means of the fermentation of the hydrolyzed residues of the processing of the pineapple (*Ananas comosus*), by *Candida tropicalis*. The hydrolysis was performed using different concentrations of sulfuric acid submitted to different autoclaving times. Analyzes of sugars, phenolic compounds and biosurfactants production were carried out. The results indicated that the best sulfuric acid concentration for the hydrolysis was 2.5% H₂SO₄ with a heating time of 15 minutes. Detoxification decreased the amount of phenolic compounds. The best form of biosurfactant production was determined by fermentation for 12 hours and using the hydrolysates of pineapple peel, pineapple stem and glucose at 5% concentration as the carbon source. From these results the biosurfactant production capacity was tested using the hydrolyzate of the peel and the stem of pineapple and glucose. The biosurfactants produced after 2h, 4h, 6h and 8h in all substrates maintained an emulsification index of less than 50%, while the biosurfactants produced after 10 hours of fermentation had values close to 50% and maintained the emulsion stability above 24 hours. The results obtained for emulsifying activity showed that the higher the biosurfactant concentration and the longer the fermentation time the higher the emulsifying activity value. Reductions of the surface tension for the biosurfactants produced from the hydrolysates of all the substrates were observed. From this, the biosurfactant obtained using the pineapple stem hydrolyzate reduced the surface tension to 30 mNm⁻¹. The critical micellar

concentration was also lower with the biosurfactant produced by the pineapple stem hydrolyzate, but all the substrates maintained low values indicating that the biosurfactants produced were effective. The emulsification index was assayed in assays mimicking a French type dressing. The formulation containing 6 ml of biosurfactant stabilized the mixture better. The analysis at 15-day times showed that with this formulation there is a stabilization of the sauce, with little variation in the 120 days analyzed.

Keywords: Biosurfactant, fermentation, pineapple.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização molecular de um surfactante.....	20
Figura 2 – Representação esquemática de outras estruturas organizadas de surfactantes.....	21
Figura 3 – Representação esquemática: (A): Gota de água em superfície hidrofóbica. (B): Gota de água em uma superfície hidrofóbica, contendo moléculas de surfactante. A redução da tensão superficial na gota de água, após a adição de surfactante aumentou a área de contato da água com a superfície hidrofóbica.....	22
Figura 4 – Elemento de volume de água de superfície, mostrando a saturação de moléculas de surfactante.....	23
Figura 5 – Principais vias biossintéticas para a produção de biossurfactante.....	27
Figura 6 – Estrutura química do emulsan.....	29
Figura 7 – Fluxograma do processamento do abacaxi para obtenção do suco.....	36
Figura 8 – Preparação do pré-inóculo para fermentação.....	42
Figura 9 – Molho tipo francês comercializado e lista de ingredientes.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Diagrama da variação de tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com relação a concentração do tensoativo.....	24
Gráfico 2 – Concentrações de açúcares totais em g/L liberadas por hidrólise ácida com 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de H ₂ SO ₄ , com aquecimento de 15 e 30 minutos em autoclave.....	49
Gráfico 3 – Concentrações de açúcares redutores em g/L liberadas por hidrólise ácida com 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de H ₂ SO ₄ , com aquecimento de 15 e 30 minutos em autoclave.....	50
Gráfico 4 – Concentrações de compostos fenólicos em g/L liberadas por hidrólise ácida com 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10% de H ₂ SO ₄ , com aquecimento de 15 e 30 minutos em autoclave.....	50
Gráfico 5 – Açúcares redutores em g/L sem desintoxicar, desintoxicado e após concentração.....	52
Gráfico 6 – Compostos fenólicos em g/L sem desintoxicar, desintoxicado e após concentração.....	53
Gráfico 7 - Crescimento microbiano para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	54
Gráfico 8 – Crescimento microbiano para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	54
Gráfico 9 – Crescimento microbiano para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	55
Gráfico 10 – Variação do pH para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção biossurfactantes	

nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	56
Gráfico 11 – Variação do pH para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	56
Gráfico 12 – Variação do pH para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	57
Gráfico 13 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 2 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	58
Gráfico 14 -Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 4 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	58
Gráfico 15 - Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 6 horas de fermentação a 30° C e 200 rpm.....	59
Gráfico 16 - Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 8 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	59
Gráfico 17 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 2 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	60
Gráfico 18 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 4 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	60

Gráfico 19 - Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 6 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	61
Gráfico 20 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 8 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	61
Gráfico 21 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 2 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	62
Gráfico 22 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 4 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	62
Gráfico 23 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 6 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	63
Gráfico 24 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 8 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	63
Gráfico 25 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 10 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	64
Gráfico 26 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 10 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	65
Gráfico 27 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizada pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de	

biossurfactante no período de 10 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	65
Gráfico 28 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	67
Gráfico 29 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	67
Gráfico 30 – Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizada pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactante no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	68
Gráfico 31 –Tensão superficial do sobrenadante livre de células obtido em diferentes concentrações de glicose durante 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação utilizando a levedura <i>Candida tropicalis</i> a 30°C e 200 rpm.....	72
Gráfico 32 – Tensão superficial do sobrenadante livre de células obtido em diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) durante 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação utilizando a levedura <i>Candida tropicalis</i> a 30°C e 200 rpm.....	72
Gráfico 33 – Tensão superficial do sobrenadante livre de células obtido em diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) durante 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação utilizando a levedura <i>Candida tropicalis</i> a 30°C e 200 rpm.....	73
Gráfico 34 – Concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células quando foi utilizado glicose como substrato pela levedura <i>Candida tropicalis</i> no tempo de fermentação de 10 horas a 30°C e 200 rpm.....	74
Gráfico 35 – Concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células quando foi utilizado o hidrolisado de abacaxi (talo) como substrato pela levedura <i>Candida tropicalis</i> no tempo de fermentação de 10 horas a 30°C e 200 rpm.....	74

Gráfico 36 – Concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células quando foi utilizado o hidrolisado de abacaxi (casca) como substrato pela levedura <i>Candida tropicalis</i> no tempo de fermentação de 10 horas a 30°C e 200 rpm.....	75
Gráfico 37 – Estabilidade da emulsão do molho tipo francês por 120 dias.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de HLB e potencial aplicação.....	24
Tabela 2 – Biossurfactantes e micro-organismos produtores.....	31
Tabela 3 – Principais frutas produzidas no Brasil.....	35
Tabela 4 – Funções e aplicações de alguns biossurfactantes.....	39
Tabela 5 –Meio de manutenção utilizado para a levedura <i>Candida tropicalis</i>	41
Tabela 6 – Meio de padrão utilizado para compor o meio de produção.....	43
Tabela 7 – Atividade emulsificante para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	69
Tabela 8 – Atividade emulsificante para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	69
Tabela 9 – Atividade emulsificante para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura <i>Candida tropicalis</i> durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.....	70
Tabela 10 – Formulação do sistema utilizado para análise do índice de emulsificação simulando um molho tipo francês.....	76
Tabela 11 – Índice de emulsificação dos ensaios realizados.....	76

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos gerais	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Surfactantes.....	20
3.2 Biossurfactantes e mercado mundial.....	25
3.3 Classificação dos biossurfactantes e micro-organismos produtores.	28
3.4 Produção de biossurfactantes por leveduras.....	32
3.4.1 Candida tropicalis	32
3.5 Substratos.....	34
3.5.1 Abacaxi.....	34
3.6 Aplicações dos biossurfactantes	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Matéria-prima.....	40
4.2 Preparo da matéria-prima	40
4.3 Pré-tratamento da biomassa	40
4.4 Desintoxicação do hidrolisado	40
4.5 Micro-organismo	41
4.6 Meio de manutenção	41
4.7 Preparo do pré-inóculo para ativação da levedura	41
4.8 Padronização do inóculo	42
4.9 Preparo do meio de fermentação.....	43
4.9.1 Meio Padrão	43
4.9.2 Meio de Produção	43
4.9.3 Fermentação	43
4.10 Métodos analíticos	44
4.10.1 Determinação do pH.....	44
4.10.2 Determinação do crescimento microbiano	44
4.10.3 Determinação da presença de biossurfactante	44

4.10.4 Separação do biossurfactante	45
4.10.5 Construção da curva padrão para determinação da massa celular seca.....	45
4.10.6 Potencial para estabilizar emulsões de molho estilo Francês	46
4.10.7 Determinação de açúcares totais	47
4.10.8 Determinação de açúcares redutores.....	47
4.10.9 Determinação do teor de compostos fenólicos.....	47.
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.1 Padronização da hidrólise da casca e do talo do abacaxi.....	48
5.2 Desintoxicação e concentração dos hidrolisados do talo e da casca do abacaxi	52
5.3 Determinação do crescimento microbiano	53
5.4 Variação do ph.....	55
5.5 Índice de emulsificação	57
5.6 Atividade emulsificante	68
5.7 Tensão superficial	70
5.8 Concentração micelar crítica (cmc).....	73
5.9 Determinação do efeito do biossurfactante para estabilização de um molho tipo francês	76
5.10 Separação do biossurfactante	78
6. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE A - Concentração de glicose e absorvância (490 nm) para padronização da curva padrão de açúcares totais.	90
APÊNDICE B - Curva padrão para açúcares totais.....	90
APÊNDICE C - Concentração de glicose e absorvância (540 nm) para padronização da curva padrão de açúcares redutores.....	91
APÊNDICE D - Curva padrão para açúcares redutores	91
APÊNDICE E - Concentração de ácido vanílico e absorvância (750 nm) para padronização da curva padrão de compostos fenólicos.....	92
APÊNDICE F - Curva padrão compostos fenólicos	92
APÊNDICE G - Peso celular da levedura (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de Candida tropicalis.....	93
APÊNDICE H - Curva Padrão de glicose para crescimento da Candida tropicalis	93

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos que possuem diversas propriedades tensoativas e são amplamente utilizados em vários segmentos industriais. Entretanto, a maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é de origem química, sintetizados a partir de derivados do petróleo, representando assim riscos ao meio ambiente. Em consequência disso e das novas legislações de controle do meio ambiente, a busca por novos compostos bioativos tornou-se um alvo para as indústrias.

Os biosurfactantes são compostos anfifílicos produzidos por micro-organismos, que contem grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, possuem a capacidade de se acumular entre fases dos fluidos imiscíveis, diminuindo a tensão superficial e interfacial, permitindo a formação de um sistema homogêneo.

O grande desafio em relação à produção de biosurfactantes no lugar dos surfactantes sintéticos é a redução dos custos do processo de produção. Portanto, a utilização de substratos agroindustriais como matéria-prima nos bioprocessos tem sido relatada com grande ênfase em diversos estudos e pode se tornar uma solução para as indústrias. Dessa maneira, é possível obter um produto de alto valor agregado, a baixos custos de produção, gerando para as empresas maiores lucros e menores impactos ao meio ambiente.

A maioria das pesquisas relacionadas à produção de biosurfactantes utilizam bactérias, porém as leveduras também são conhecidas pela produção de biosurfactantes em grande escala quando comparadas a produção por bactérias, assim as leveduras do gênero *Candida* têm sido estudadas com sucesso na obtenção dessas biomoléculas.

O abacaxi é uma das frutas mais populares do mundo, sendo o Brasil um dos maiores produtores. Seu consumo é baseado apenas no suco ou da fruta "in natura". Os resíduos como, a casca e o talo, são desperdiçados causando um grande acúmulo quando descartados no meio ambiente. O presente estudo teve como objetivo a produção de biosurfactantes por *Candida tropicalis* a partir de resíduos hidrolisados do abacaxi (*Ananas*

comosus) (casca e talo), com avaliação subsequente do potencial para produção de biossurfactantes e a possibilidade de usá-los como emulsificantes para estabilização de molho tipo francês.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Produzir biossurfactante com a levedura *Candida tropicalis* utilizando glicose (padrão) e como resíduo foi utilizado o caldo hidrolisado do processamento do abacaxi (casca e talo) (*Ananas comosus*).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de glicose, utilizada como padrão, na produção de biossurfactantes e no crescimento da levedura;

- Determinar o efeito da hidrólise ácida da casca e do talo do abacaxi, variando-se:
 - Tempo de aquecimento em autoclave: 15 e 30 minutos;
 - Concentração de ácido sulfúrico: 2,0%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10% (v/v).

- Avaliar o efeito da desintoxicação dos hidrolisados para a remoção de compostos inibidores da fermentação produzidos durante a hidrólise nos diferentes tempos de autoclavagem;

- Determinar os melhores parâmetros para produção de biossurfactante;

- Selecionar a melhor condição de cultivo para a produção de biossurfactantes;

- Analisar o potencial de aplicação dos biossurfactantes produzidos na estabilidade da emulsão de um molho estilo francês.

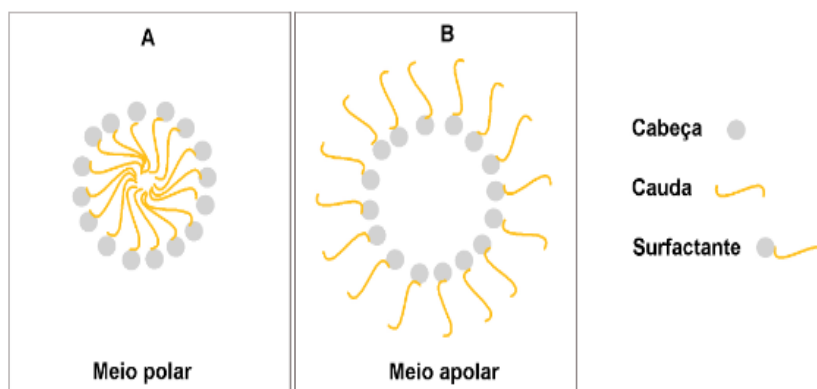
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Surfactantes

Os surfactantes são uma classe importante de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais onde atuam como dispersantes ou solubilizantes de compostos orgânicos e apresentam também baixa solubilidade em água. Os surfactantes possuem grande importância comercial devido a evidente tendência do mercado em aumentar sua produção (GOUVEIA et al, 2003).

São moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, que tendem a se acumular na interface entre fases de diferentes graus de polaridade, tais como óleo/água ou ar/água. A fração apolar geralmente é uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfotérica como ilustrado na Figura 1 (SILVA et al, 2014).

Figura1 – Organização molecular de um surfactante.

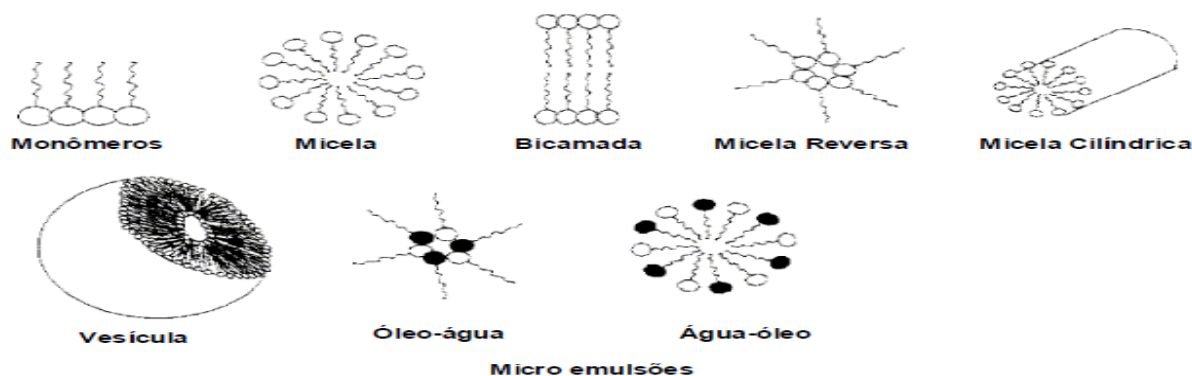


Fonte: FELIPE; DIAS, 2016.

Os surfactantes possuem a tendência de formar agregados chamados micelas. Essas micelas formam-se, na maioria das vezes, em baixas concentrações de água, sendo uma propriedade intrínseca e característica dos surfactantes. A micelização ocorre devido à diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água (OLIVEIRA, 2014).

As estruturas formadas por estes surfactantes dependem da natureza do monômero do surfactante, da natureza do solvente e por possíveis íons vizinhos (PACHECO, 2008). Na Figura 2, mostra outros tipos de formatos das micelas.

Figura 2 - Representação esquemática de outras estruturas organizadas de surfactantes.



Fonte: PACHECO, 2008.

A palavra surfactante é derivada de uma expressão em inglês “surface active agent”, significando agente de atividade superficial. Os surfactantes são considerados tenso-ativos, pois apresentam capacidade de reduzir a tensão superficial e também a tensão interfacial, aumentando assim a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos (DELEU; PAQUOT, 2004).

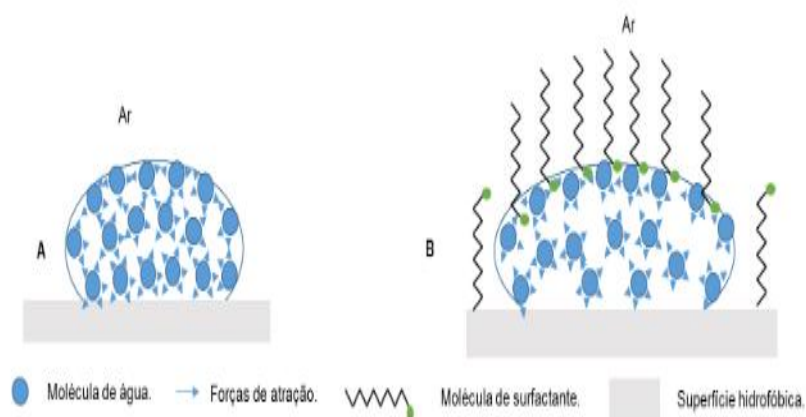
Devido à presença de surfactantes, a energia requerida para trazer uma molécula até a superfície é menor e a tensão superficial também diminui. Isto acontece devido à característica anfifílica que provoca uma distorção da molécula da água pelo grupo hidrofóbico resultando, assim, em um aumento da energia livre desse sistema. Em consequência, o trabalho necessário para uma molécula surfactante vir à superfície é menor do que para uma molécula de água, por exemplo, (SANTOS et al., 2007). Em um estudo realizado por Sousa, et. al (2014), demonstraram que o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de glicerol possui boa atividade superficial, obtendo-se uma tensão superficial mínima de 32,0 mN (SOUSA et al. 2014).

A tensão superficial está diretamente ligada às forças de atração e repulsão que existem nas moléculas de um fluido. Para que estas moléculas se

mantenham coesas na superfície desse fluido, estas forças exercem uma força de atração intermolecular forte agindo sobre as moléculas mais próximas da superfície, dessa maneira os líquidos tendem a diminuir sua área de superfície (PIRÔLLO et al., 2008).

Esta força repulsiva começa a diminuir quando a concentração do surfactante no meio aquoso aumenta, ou seja, a eficácia dos surfactantes é determinada pela sua capacidade em reduzir a tensão superficial medindo-se a energia livre da superfície por unidade de área que será necessária para trazer uma molécula do interior da solução para a superfície: como demonstra a Figura 3 (RUFINO, et al. 2014):

Figura 3 – Representação esquemática: (A): Gota de água em superfície hidrofóbica. (B): Gota de água em uma superfície hidrofóbica, contendo moléculas de surfactante. A redução da tensão superficial na gota de água, após a adição do surfactante aumentou a área de contato da água com a superfície hidrofóbica.

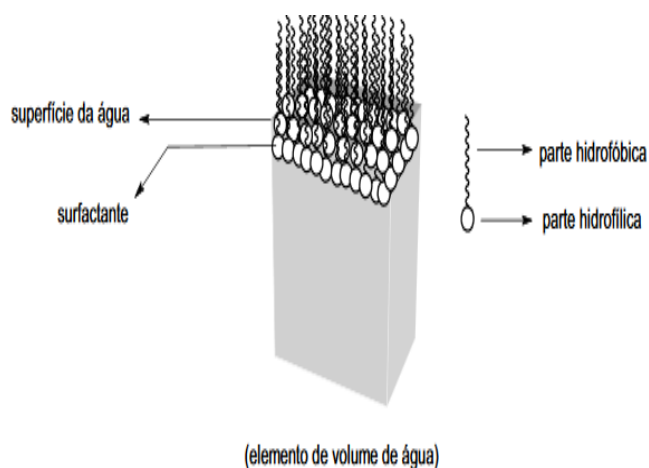


Fonte: FELIPE; DIAS, 2016.

Outro importante parâmetro utilizado frequentemente para avaliação de um surfactante é a concentração micelar crítica (CMC). As moléculas dos surfactantes por terem características anfifílicas apresentam comportamentos distintos ao interagirem com a água, por exemplo, a parte polar (cabeça) atrai as moléculas de água, enquanto a parte apolar (cauda) repele (LAWRENCE, 2000).

Há duas possibilidades pelas quais essas interações ocorrem: (1) as moléculas do surfactante estão abaixo da superfície, neste exemplo, essas moléculas podem formar agregados, sendo que a parte polar ficará orientada em direção as moléculas de água e a parte apolar voltada para o solvente. (2) neste exemplo a parte polar da molécula interage com a água, já a porção apolar fica sobre a superfície, podendo estar em contato com o ar ou com outro solvente apolar, neste caso as moléculas do surfactante estão acima da superfície (Figura 4). O fato de essas moléculas estarem na superfície rompe as forças de ligação que existem nessas moléculas, diminuindo assim a energia existente na superfície (tensão superficial) (BORGES, 2007).

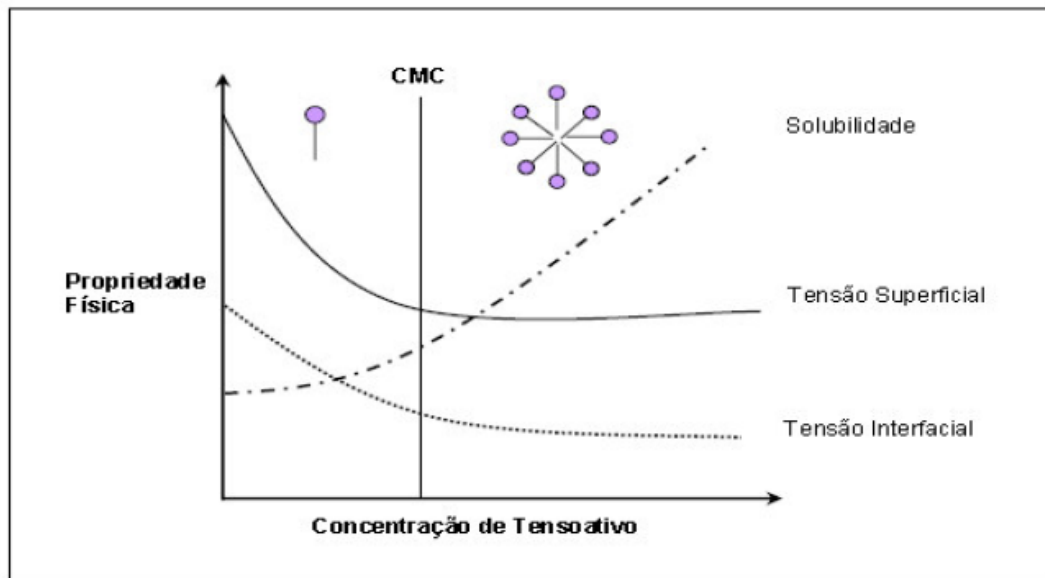
Figura 4 - Elemento de volume de água de superfície, mostrando a saturação de moléculas de surfactante.



Fonte: LAWRENCE, 2000.

A concentração micelar crítica (CMC), portanto, é a concentração micelar mínima de tenso-ativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, na qual se inicia a formação de agregados chamados de micelas (Gráfico 1). A micelização geralmente resulta na solubilização de óleo e água originando uma emulsão. Após a CMC, as micelas, diferentemente dos monômeros, ficam dispersas em toda a solução não apresentando, portanto, nenhum efeito sobre a tensão superficial da água (SANTOS et. al., 2007).

Gráfico 1 – Diagrama da variação de tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com relação à concentração do tensoativo.



Fonte: BUENO, 2008.

A determinação do balanço hidrofílico e lipofílico (HLB) tem sido comumente avaliada, descrevendo uma relação entre as partes hidrofílicas e lipofílicas da molécula (BORGES, 2007). Esta relação pode afetar as propriedades físico-químicas das moléculas sendo este valor uma indicação da solubilidade no óleo ou na água da solução (PARKINSON, 1985). Na Tabela 1 estão representados os valores de HLB e suas aplicações.

Tabela 1 - Valores de HLB e potencial aplicação.

HLB	APLICAÇÕES
1-3	Agentes espumantes
3-6	Agentes emulsificantes (emulsão A/O)
7-9	Agentes de molhabilidade
8-18	Agentes emulsificantes (emulsão O/A)
13-16	Detergentes
16-18	Agentes solubilizantes

Fonte: MOURA, 2017.

Os surfactantes disponíveis no comércio em sua grande maioria são sintetizados a partir de derivados de petróleo (DESAI; BANAT, 1997). Esses surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a sua carga iônica, a qual reside na parte polar da molécula. Esta carga iônica pode ser classificada como aniônica ou catiônica não iônica ou anfotérica, já a porção polar geralmente é uma cadeia hidrocarbonada (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Existe grande ênfase para os impactos ambientais gerados pela utilização dos surfactantes químicos; muitos desses surfactantes são tóxicos e não são biodegradados, podendo se acumular e assim provocar efeitos adversos para o ambiente e também à saúde humana. Levando, portanto, em consideração a questão dos recursos ambientais e sua consequente devastação pelo uso exagerado de produtos químicos, dentre eles os surfactantes sintéticos, é importante que haja mais estudos sobre possibilidades menos agressivas ao meio ambiente, por isso a biotecnologia tem estado em constante desenvolvimento tentando otimizar a produção de biossurfactantes (OLIVEIRA, 2014).

3.2 Biossurfactantes e mercado mundial

Os surfactantes sintéticos, existem há pouco mais de 100 anos e são usados pela sociedade em grandes quantidades e em diversas áreas. Sendo assim, esses compostos sintéticos têm acompanhado a evolução de vários setores industriais, porém o uso em demasia dessas substâncias trouxe em geral diversos danos ao ambiente. Portanto, diversos estudos para substituição desses produtos visando à diminuição dos danos ao meio ambiente começaram a ser realizados, fazendo que o uso de biossurfactantes se destaque no conceito atual (MARCELINO, 2016).

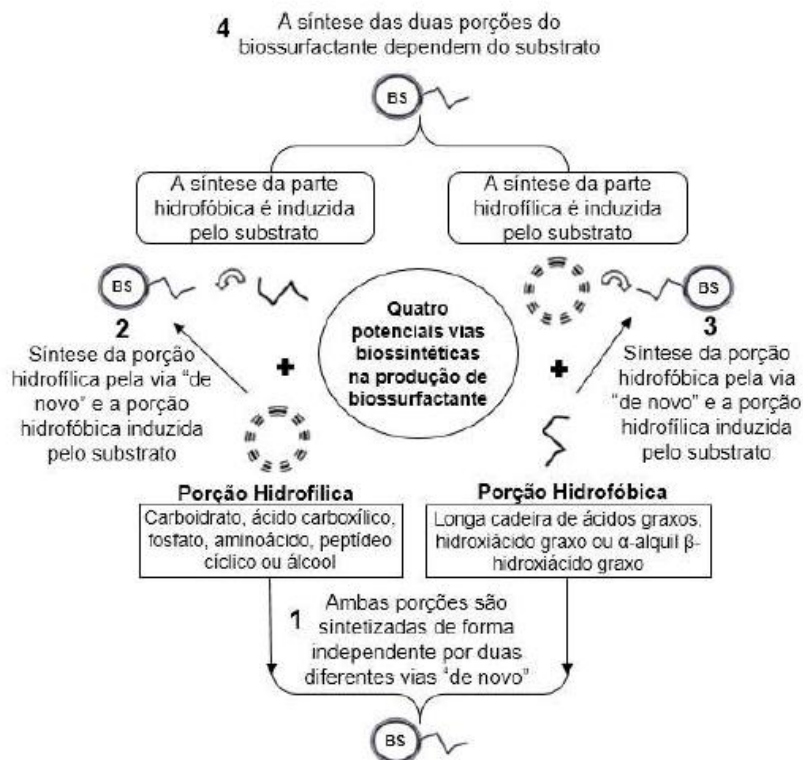
Os biossurfactantes, tenso-ativos produzidos por bactérias, leveduras e fungos, são moléculas que apresentam biodegradabilidade, excelente eficiência em condições extremas de pH, temperatura, força iônica e biocompatibilidade em comparação com surfactantes sintéticos. Podem ser produzidos utilizando substratos renováveis, e uma das maiores vantagens é o fato serem moléculas atóxicas. Devido ao fato de serem produzidos por micro-

organismos, estes não derivam do petróleo, portanto, não são dependentes do preço (AQUINO, 2011).

As vantagens dos biossurfactantes, em relação aos surfactantes sintéticos, concedem uma gama maior de aplicações industriais, principalmente pelo fato da possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas, o que permite a produção de biossurfactantes para necessidades específicas (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A aplicabilidade de biossurfactantes é bem extensa e observada em vários campos: construção, indústrias alimentícias, agricultura, têxtil, farmacêuticas, papel, cosméticos, etc. (REIS et al, 2013).

Os biossurfactantes são produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de micro-organismos em meios aquosos, sendo excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano. Eles auxiliam no transporte e na translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua natureza bioquímica, com a espécie microbiana produtora e também com a composição química, ou seja, na natureza, as fontes de carbono e nitrogênio são as limitações nutricionais e a temperatura, aeração e pH vão influenciar no tipo de polímero que será produzido (CALVO et al, 2009). Ter controle desses parâmetros é extremamente importante, pois somente assim pode-se potencializar a produção de biossurfactantes (OLIVEIRA, 2014). Em um estudo realizado por Satpute et al. (2010), foram descritos quatro vias potenciais para a produção de biossurfactante (Figura 5).

Figura 5 – Principais vias biossintéticas para a produção de biossurfactante (BS)



Fonte: SATPUTE et al., 2010.

A produção de biossurfactantes tem como desvantagem a dificuldade em encontrar um resíduo com composição adequada de nutrientes que irá permitir o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse. Assim se faz necessária uma adequação na padronização do processo biotecnológico e, em consequência disso, há um rendimento menor na produção, necessidade de grande investimento de capital, equipamentos adequados para padronização do processo, etc. (CALVO et al., 2009).

Em relação ao mercado mundial de biossurfactantes, a produção em alta escala vem sendo implementada. Em 2013, um total de 300 toneladas foram produzidas de acordo com a Transparency Market Research, em Nova York (MARQUES, 2017).

A estimativa é que no ano de 2018 essa produção tenha atingido mais de 400 toneladas de biossurfactantes, crescendo com uma taxa anual de 4,3%. O Brasil vem se destacando entre os países latino-americanos, em relação à produção e patentes de biossurfactantes, sendo o Brasil também detentor da

única planta piloto construídos exclusivamente para a produção de biossurfactante (BRUMANO, 2016).

A maior parte dos estudos para produção de biossurfactantes é sobre o uso de bactérias, sendo poucos sobre a produção por leveduras. As leveduras são conhecidas pela produção em grande escala, se comparada com as bactérias. Destas, o gênero *Candida* tem sido o mais estudado e empregado com sucesso na produção de biossurfactantes (ACCORSINI, 2010).

3.3 Classificação dos biossurfactantes e micro-organismos produtores

Segundo Darvishi e colaboradores (2011), os biossurfactantes são agrupados levando em consideração a sua composição química e sua origem microbiana. As classes principais são: glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

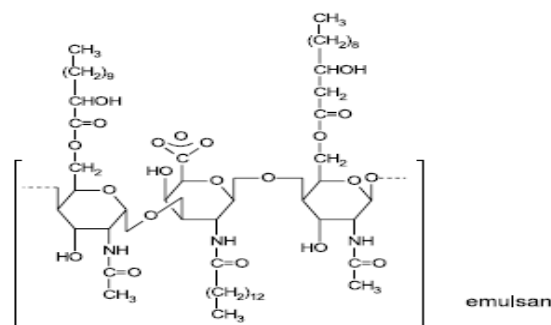
Os biossurfactantes do tipo glicolipídios possuem em sua estrutura carboidratos (glicose, galactose, manose ou ramnose) e são combinados com ácidos graxos de cadeia longa (FELIX, 2012).

Os lipopeptídeos e lipoproteínas são compostos por peptídeos ou proteínas ligados a ácidos graxos, os aminoácidos estão ligados em forma cíclica e a porção proteica é aniônica ou neutra (BARROS et al, 2005).

Os biossurfactantes do tipo fosfolipídio são encontrados em todos os micro-organismos, havendo poucos exemplos de produção extracelular esta classe de biossurfactante é produzida por leveduras ou bactérias que utilizam alcanos como fontes de carbono e energia para o crescimento (SILVA et al, 2014).

Em relação aos biossurfactantes poliméricos ou lipopolissacarídeos, são caracterizados por ácidos graxos e polissacarídeos ligados covalentemente. Por exemplo, o emulsan (Figura 6), no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto heteropolissacarídico, ou o liposan de *C. lipolytica*, constituído por carboidratos e proteínas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Figura 6 - Estrutura química do emulsan.



Fonte: NITSCHKE; PASTORE, 2002.

Os biossurfactantes particulados são vesículas extracelulares produzidas por algumas bactérias, apresentando elevada atividade tensoativa e transportando alcanos para o interior da célula (FELIX, 2012).

Em um estudo realizado na Índia em 2007, Joshi e colaboradores produziram biossurfactantes com a bactéria *Bacillus subtilis* 20B que foi isolada de alimentos fermentados e posteriormente foi analisada a sua utilização em recuperação de óleos, obtendo bons resultados. Em outro estudo, Fox e Bala (2000) obtiveram níveis elevados no rendimento de produção de biossurfactante pela mesma bactéria a partir de um meio rico em amido.

Damião (2012) estudou a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* em meio salino mineral utilizando como fonte de carbono a glicerina comercial e a glicerina bruta a 2%, e os resultados mostraram que no meio salina mineral com glicerina bruta houve uma produção de 2,87 g/L, já utilizando a fonte de carbono glicerina comercial a linhagem produziu 2,47 g/L, mostrando assim a viabilidade do uso da glicerina para a produção de biossurfactantes.

Em um estudo realizado por Vera (2017), foi analisada a produção de biossurfactantes por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais, tais como o soro de leite e vinhaça de uva e foram suplementados com sacarose e extrato de levedura, os resultados mostraram que na concentração de 15% de soro de leite o emulsificante produzido reduziu a tensão superficial em 18,1 mN/m, alcançando uma produção máxima de biossurfactante equivalente em surfactina de 11,02mg/L.

Antunes (2010) analisou a produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo realizando um planejamento fatorial para analisar o melhor resultado quanto à produção de biossurfactante e a melhor redução da tensão superficial, sendo o melhor resultado no ensaio que continha 8% de milhocina, 1% de lactose e 7,5% de óleo de milho pós-fritura no tempo de 72 horas de fermentação, diminuindo a tensão superficial da água de 71 para 29 mN/m.

Ehrhardt (2015) produziu biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando como substrato os resíduos do processamento do abacaxi. Neste estudo, foram realizadas fermentações com três diferentes concentrações de glicose (1%, 3% e 5%). Posteriormente, essas concentrações foram enriquecidas com glicerol comercial (3%, 5% e 10%). Os melhores resultados foram com 5% de glicose e sem adição de glicerol, com redução da tensão superficial em 25% e índices de emulsão de 67%. Na Tabela 2, podem-se observar os biossurfactantes e seus respectivos micro-organismos produtores.

Tabela 2 - Biossurfactantes e micro-organismos produtores.

Biossurfactantes	Micro-organismos
Glicolipídeos	
Rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipídeos sulfurados	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apícola</i> <i>T. petrophilum</i>
Celobiolipídeos	<i>Ustilago zeaе</i> <i>U. maydis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
Surfactina	<i>B. subtilis</i>
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>
Gramicidina	<i>B. brevis</i>
Polimixina	<i>B. polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeo neutro	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Biossurfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Proteína-manana-lipídeo	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>
Carboidrato-proteína-lipídeo	<i>P. fluorescens</i>
Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>

Fonte: DESAI; BANAT, 1997.

3.4 Produção de biossurfactantes por leveduras

As leveduras produzem emulsificantes extracelulares quando crescem em substratos imiscíveis em água, facilitando seu consumo; elas também produzem biossurfactantes em alta concentração (FONTES, et al, 2008).

Em 2000, Ijah isolou 20 bactérias de um solo poluído devido ao derramamento de óleo e lixo na Nigéria e 10 leveduras isoladas de um solo não poluído nos campos da Universidade de Calabar (Nigéria), a levedura *Candida tropicalis* apresentou uma maior eficiência ao atuar como biossurfactante se comparado a outras duas bactérias *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus*.

Em um estudo também utilizando leveduras, Aragão e colaboradores (2007) utilizaram as espécies *Pichia membranaefaciens* e *Pichia anomala* obtendo a produção de biossurfactantes em um meio mineral contendo glicerol.

Felse e colaboradores (2007) estudaram a produção de soforolipídeos por *Candida bombicola*, quando cultivada em ácidos graxos residuais, obtendo uma concentração de 120 g/L em um sistema operado por batelada alimentada.

Em um estudo realizado por Sarubbo e Farias (2007), foram aperfeiçoadas as condições de produção do biossurfactante por *Candida lipolytica* em meio que continha óleo de canola e glicose. O biossurfactante reduziu a tensão superficial de 72 mN/m para valores em torno de 30 mN/m.

A produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* foi estudada por Luna e colaboradores (2008), onde se utilizou um planejamento fatorial avaliando a influência dos componentes do meio, os quais eram: milhocina, resíduo de refinaria de óleo vegetal e água do mar para redução da tensão superficial, obtendo resultados melhores no ponto central do planejamento (meio contendo 4% do resíduo, 4% de milhocina e 50% de água do mar).

3.4.1 *Candida tropicalis*

Leveduras do gênero *Candida* são classificadas como um grupo de fungos com a forma leveduriformes encontrados em diversos ecossistemas,

que apresentam células ovaladas ou alongadas, com o comprimento de 3 a 14 μm e de 3 a 7 μm de largura, com micélio em forma de pseudo-hifas ou também como hifas verdadeiras. Suas colônias são úmidas, cremosas, aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada (BARROS, 2005).

A levedura *Candida tropicalis* é diploide asporogenica, sendo capaz de consumir diferentes substratos como, por exemplo, dissacarídeos, fenóis, alcanos e ácidos, obtendo sempre altos rendimentos de biomassa. É considerada também uma levedura termotolerante (JAMAI et al, 2001).

Diversos estudos têm sido relatados sobre o uso dessa levedura para produção de biossurfactantes, obtendo na maioria deles bons resultados e um alto rendimento (LUNA et al. 2008).

Almeida e colaboradores (2014) estudaram a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* usando um planejamento experimental a partir de resíduos industriais, sendo eles, melaço, milhocina e óleo de canola residual. Neste estudo, obteve-se um melhor resultado na condição contendo 2,5% de melaço, 2,5% de milhocina e 2,5% de óleo de canola residual, sob agitação de 250 rpm, tendo diminuído a tensão superficial do meio para 29,52 mN/m.

Sarubbo et. al (2016) realizaram a produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* e sua aplicação para remoção de metais pesados. Os meios utilizados foram melaço, óleo de fritura e milhocina e os resultados em biorreator mostraram que a tensão superficial ficou em torno de 31mN/m com um rendimento de 27 g/L. Este biossurfactante produzido removeu 80% de Zn, 70% de Cu e 15% de Pb.

Em um estudo para a produção de biossurfactantes utilizando *Candida tropicalis* isoladas de mangue, Ribeaux (2016) obteve resultados que demonstraram que esta linhagem possui a capacidade em converter resíduos agroindustriais (soro de leite, manipueira e óleo de soja pós-frituras) em biossurfactante. A pesquisa foi realizada utilizando planejamento fatorial, sendo que o melhor resultado foi o meio basal (3% de soro de leite, 7% de manipueira e 10% de óleo de soja pós-frituras), observando-se uma redução na tensão superficial da água de 72 para 30,8 mN/m, tendo um cultivo de 96 horas e 150 rpm.

3.5 Substratos

O aspecto econômico é geralmente o primeiro parâmetro a ser avaliado nos processos biotecnológicos. Assim, o sucesso da produção depende exclusivamente do desenvolvimento e planejamento de processos mais baratos utilizando, portanto, substratos renováveis e de baixo custo (DAMIÃO, 2012).

Devido a crescente necessidade de se ter planejamentos mais desenvolvidos, por conta principalmente da exigente competitividade do mercado global, as indústrias passaram a utilizar toda e qualquer matéria-prima para o melhoramento de bens de consumo que tragam em curto prazo produtos melhores e com o custo de produção menor (MORAIS, 2012).

Além de agregar valor aos subprodutos em relação as tradicionais sínteses químicas as vantagens dos biossurfactantes são: pH do meio de cultivo ou reacional próximo da neutralidade dependendo do micro-organismo utilizado, utilização de condições brandas de processo, já que são utilizados micro-organismos e estes crescem na temperatura ambiente, acarretando um menor gasto energético, baixa carga de resíduos gerados durante o processo, além da toxicidade ser mínima ou nenhuma, regioespecificidade e estereosseletividade das reações nos processos biocatalíticos produzindo compostos enantiomericamente puros, e, por último, a possibilidade de realizar processos em meio sólido (COMASSETO, 2010).

Há uma grande dificuldade na seleção de um resíduo que contenha a composição adequada de nutrientes que permitirá o crescimento microbiano e o acúmulo do produto de interesse, porém, em geral os resíduos de origem agroindustrial que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos superam essa necessidade de fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (ANTUNES, 2010).

3.5.1 Abacaxi

É uma fruta tropical e está entre as mais populares do mundo. No Brasil é a terceira fruta mais produzida, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais frutas produzidas no Brasil.

Fruta	Área (há)	Produção (ton)	Valor	%Produção	% Valor
Laranja	667.529	15.983.273	4.397.201	40,5	20,5
Banana	474.054	6.962.134	4.155.030	17,6	19,3
Abacaxi	68.618	3.417.729	1.623.963	8,7	7,6
Uva	77.119	984.493	1.327.722	2,5	6,2
Maça	34.399	1.064.708	803.988	2,7	3,7
Demais	1.256.929	11.087.158	9.174.163	2,81	42,7
Total	2.578.648	39.499.495	21.482.067	100,0	100,0

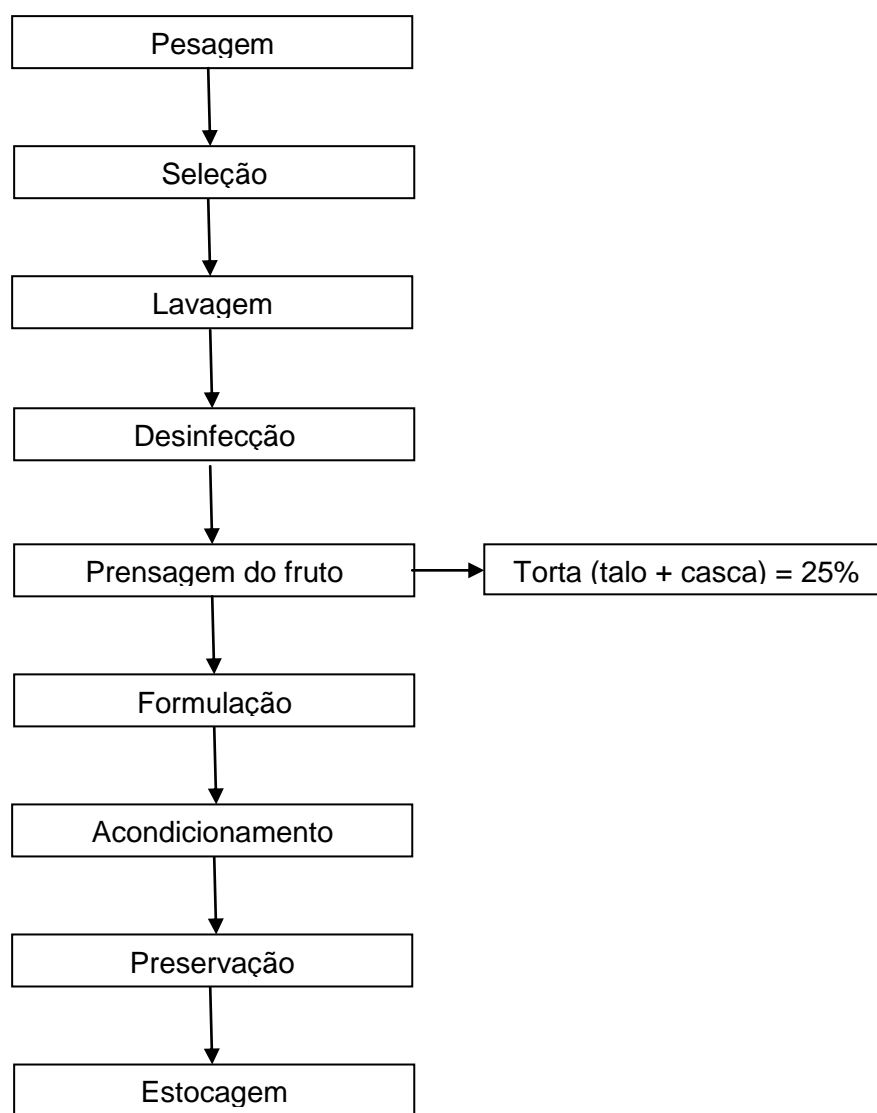
Fonte: IBGE/LSPA, 2016.

O abacaxi é um pseudofruto pertencente a família *Bromeliaceae*, da qual a espécie mais conhecida é a *Ananas comosus* sendo este o único cultivado extensivamente como fonte de alimento. O fruto, normalmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, é constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos que são fundidos entre si sobre o eixo central (EMBRAPA, 2000).

A sua composição química varia muito de acordo com a época do ano. Geralmente a sua produção inicia-se no verão e produz frutos com um maior conteúdo de açúcares utilizados na maioria das vezes na forma de suco. Existem diversos estudos mencionando a diversidade de vitaminas e minerais contidas no abacaxi, o que aumenta o interesse em seu consumo. Diante disso, há uma geração de resíduos muito grande (casca e talo), contabilizando cerca de 50% do peso total do abacaxi (EHRHARDT, 2015).

Na prensagem do fruto para obtenção do suco, 15 a 25% resultam na torta que é composta de casca e talo. Esse resíduo é rico em fibras e um razoável conteúdo proteico, além de uma quantidade alta de carboidratos que são encontrados no talo (ROGÉRIO et al, 2007). Na Figura 7 pode-se observar o fluxograma da produção de suco de abacaxi.

Figura 7 – Fluxograma do processamento do abacaxi para obtenção do suco.



Fonte: AGEITEC, 2018.

Em um estudo realizado por Ehrhardt (2015), se obteve bons resultados ao produzir biossurfactante por *Bacillus subtilis* usando como substrato os resíduos do processamento do abacaxi, reduzindo-se a tensão superficial em 20% e os índices de emulsificação atingiram valores de 53% tanto para o óleo de soja como para o óleo de motor.

3.6 Aplicações dos biossurfactantes

Atualmente, há um potencial muito grande para a aplicação de biossurfactantes nas indústrias devido à existência de muitas propriedades, tais

como: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas nos mais diversos campos industriais, sendo esses campos: agrícolas, indústrias alimentícias, de bebidas, de papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (ROCHA, 2017).

Na recuperação melhorada do petróleo utiliza-se um biossurfactante, pois os óleos que possuem frações mais pesadas se sedimentam no fundo do reservatório, sendo muito difícil sua aspiração por meio de bombas. Portanto, a lavagem requer o uso de solventes e limpeza manual. Esses métodos se baseiam na formação de emulsões concentradas de óleo em água através de agentes de superfície, com posterior bombeamento da emulsão formada. Em seguida, é feita a quebra da emulsão e recolhimento do óleo. Para este fim, o biossurfactante mais utilizado é o derivado da bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, denominado “emulsan”, cuja estrutura contém um ácido graxo e uma cadeia proteica ligada a um polissacarídeo (BOGNOLO, 1999).

O uso de biossurfactantes na biorremediação também vem sendo destaque desde o ano 2000. Por exemplo, na Alemanha a empresa Biodetox possui um processo de descontaminação de solos, lamas industriais e águas residuais. O procedimento envolve o transporte de material contaminado para “biopilhas”, onde receberá tratamento através de um produto comercial contendo bactérias, nutrientes e biossurfactantes, que promovem a degradação e limpeza do material (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Existem vários estudos para remediação de solos contaminados com metais pesados, seja pela complexação das formas livres do metal em solução aquosa, promovendo a adsorção do metal ao biossurfactante, ou pelo acúmulo de biossurfactantes na interface sólido/líquido, sob condições de tensão interfacial reduzida, permitindo, assim seu contato com o metal adsorvido. Como exemplo, no trabalho realizado por NEILSON et al. (2003), foi analisada a atividade de ramnolipídios na remoção de metais pesados, como Ni e Cd do solo, com eficiência de 80-100% em laboratório e 20-80% no solo.

Em relação a aplicações terapêuticas, um dos mais conhecidos biossurfactantes, a surfactina possui várias aplicações farmacêuticas, como a inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral,

produzido por *Rhodococcus erythropolis*, o biossurfactante inibiu o vírus da herpes simples e vírus parainfluenza (NITSCHKE ; PASTORE, 2002).

Na agricultura, os biossurfactantes são utilizados principalmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos dessas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo, portanto, necessário agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Os surfactantes produzidos por *Bacillus* foram utilizados para emulsionar a formulação de pesticidas organofosforados imiscíveis (BARROS, et al. 2005). Mnif et al, (2015), em seu estudo demonstraram, que a surfactina possui propriedades antifúngicas, podendo, dessa maneira, ser utilizada como fungicida natural para o combate de fungos que infestam diversas plantações.

Os biossurfactantes possuem compatibilidade com a pele, portanto, eles podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. Desde o ano de 2002, existe no mercado um produto que contém 1 mol de soforolipídios e 12 moles de propilenoglicol, o qual apresentou excelente compatibilidade dérmica, sendo utilizado em hidratantes faciais (NITSCHKE ; PASTORE, 2002).

Alguns soforolipídios são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. Ltda. desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídios, que posteriormente sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (BARROS et al., 2007).

A emulsificação tem um papel muito importante nas indústrias de alimentos na formação da consistência e textura, assim como na dispersão de fases e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsificante no processamento de matérias-primas, na panificação e em produtos derivados de carne, influenciando nas propriedades reológicas da farinha de trigo e a emulsificação de gorduras (AQUINO, 2011) Alguns biossurfactantes produzidos por micro-organismos, tais como os de *Candida utilis*, têm sido muito utilizados em molhos prontos para saladas (NITSCHKE, PASTORE, 2002). Silva et al (2016), analisaram a capacidade emulsificante em um preparado alimentício óleo/água (molho grego) utilizando um biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica*, obtendo bons resultados para a capacidade emulsificante. Os biossurfactantes também são utilizados em laticínios retardando a colonização de *Streptococcus thermophilus*, que causa o

cheiro ou gosto ruim durante a pasteurização (BOGNOLO, 1999). Os biossurfactantes também podem ser utilizados nas indústrias de papel, têxtil e cerâmica, por exemplo, o biodispersan é um produto usado na indústria de tintas, pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura. As propriedades de estabilização de espumas são necessárias na fabricação de extintores de incêndio (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Na Tabela 4, há um resumo das aplicações e funções de alguns biossurfactantes.

Tabela 4 - Funções e aplicações de alguns biossurfactantes.

Função do Biossurfactante	Aplicações
Recuperação de óleo residual, Redução da viscosidade de óleo	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química
Solubilização	Alimentícia, cosmética farmacêutica e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética petrolífera, plástico, curtumes e biorremediação
Detergente, formadores de espuma	Curtumes, química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizadores	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizantes	Têxtil e alimentícia
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de resíduos
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia e cascalho	Construção civil

Fonte: SINGH et al, 2007.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Os substratos utilizados foram os resíduos do abacaxi (*Ananas comosus*) coletados em barracas de venda de frutas e sucos localizados no mercado municipal de São José do Rio Preto – SP.

4.2 Preparo da matéria-prima

Os resíduos do abacaxi (casca e talo) foram cortados manualmente com auxílio de um facão inox em pedaços menores que 3 cm, distribuídos em bandejas de inox e expostos ao sol, durante aproximadamente 24 h ou até que ficassem duros e quebradiços.

As amostras secas foram moídas em um moedor de facas e peneiradas até 14 mash, acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas à temperatura ambiente.

4.3 Pré-tratamento da biomassa

Para o preparo da hidrólise das amostras de biomassa, o pré-tratamento foi realizado de acordo com o método proposto por Monsalve, Perez e Colorado (2006), com algumas modificações, adicionando 100 ml de ácido sulfúrico nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%, respectivamente, para cada 10 g de amostra seca e moída, com subsequente aquecimento em autoclave a 121°C durante 15 e 30 min.

4.4 Desintoxicação do hidrolisado

O processo de desintoxicação foi realizado de acordo com Mussato e Roberto (2004), com algumas modificações. Primeiramente, foram adicionados 2,5% de carvão ativado ao hidrolisado, e a mistura foi submetida à agitação de 200 rpm, a 30°C, por 1 h. A mistura foi centrifugada (3000g, 20 min.) e filtrada.

Posteriormente, no sobrenadante filtrado, foram realizadas análises de açúcares totais, açúcares redutores e compostos fenólicos, conforme descrito nos itens 4.10.7, 4.10.8, 4.10.9, respectivamente.

4.5 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Candida tropicalis*, adquirida da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello – Pesquisa e Tecnologia de Campinas, Estado de São Paulo.

4.6 Meio de manutenção

A levedura foi crescida em estufa a 30° C por 24 h no meio de manutenção descrito na Tabela 5, e depois mantida em refrigeração a 4° C. Todo mês foi realizado repique da levedura para manter a viabilidade.

Tabela 5 – Meio de manutenção utilizado para a levedura *Candida tropicalis*.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona de carne	5,0
Ágar	20,0

4.7 Preparo do pré-inóculo para ativação da levedura

O inóculo foi preparado pela transferência de uma amostra de *Candida tropicalis*, crescida previamente por 24 horas como descrito no item 4.6 para frascos de Erlenmeyer (250 ml) contendo 150 ml do meio de manutenção descrito na Tabela 5 sem adição do Ágar, obtendo-se assim um caldo. Este Erlenmeyer foi incubado em estufa a 30°C por 24 h com agitação de 200 rpm. Após foi centrifugado a 7000 g por 15 minutos. A Figura 8 mostra o “pellet” formado no fundo do tubo da centrifuga.

Figura 8 - Preparação do pré-inóculo para fermentação.



Fonte: Próprio autor.

4.8 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi realizada a partir do sedimento (Figura 9). Esse “pellet” foi ressuspendido em água destilada estéril de forma a se obter uma suspensão celular com absorvância de 0,6 em um comprimento de onda de 600nm. Primeiramente foram colocados em uma cubeta de espectrofotômetro 3 ml de água destilada (branco), depois nessa mesma cubeta gotejou-se a suspensão da levedura até atingir a absorvância 0,6. Por meio de uma regra de três foi determinada a quantidade de inóculo a ser adicionada em cada erlenmeyer contendo o meio de cultura para fermentação.

Cálculo:

3 ml-----X
A-----B

Equação 1

Onde:

X: volume utilizado de suspensão da levedura

A: volume final de meio de fermentação

B: volume de suspensão de levedura utilizada para a fermentação

4.9 Preparo do meio de fermentação

Para a produção de biossurfactante, foram utilizados os meios de fermentação especificados a seguir:

4.9.1 Meio Padrão

O meio padrão foi semelhante ao definido por Rodríguez e Callieri (1986), com algumas modificações, conforme especificado na Tabela 6.

Tabela 6 – Meio Padrão utilizado para compor o meio de produção.

Composto	Concentração (g.L⁻¹)
Extrato de levedura	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0

4.9.2 Meio de Produção

Para os ensaios, utilizaram-se as concentrações de glicose e água destilada 1, 2, 3, 4 e 5% somando 75 mL e esterelizou-se, depois adicionou-se 75 mL do meio padrão já esterelizado e com a quantidade padronizada de inóculo descrita no item 4.8, somando no total 150 mL. O mesmo foi realizado com os hidrolisados da casca e do talo do abacaxi. Calculou-se a concentração inicial de açúcares nos hidrolisados de casca e talo, obtendo assim o valor inicial de açúcares de cada concentração e adicionou-se a água destilada para obter 75 mL no final e conseqüente esterelização, após foi adicionado os 75 mL do meio padrão já esterilizado e com a quantidade de inóculo padronizado.

4.9.3 Fermentação

Após a preparação do meio de produção descrito no item 4.9.2, os frascos contendo no total 150 ml de cada concentração (75 ml do meio padrão + 75 ml de cada concentração) para os substratos (glicose, casca e talo do abacaxi), foram incubados, separadamente, a 30°C e 200 rpm e foi avaliada a

produção de biossurfactantes nos intervalos de fermentação de 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12 horas.

4.10 Métodos analíticos

4.10.1 Determinação do pH

O pH foi determinado ao final de cada tempo de fermentação e foi analisado diretamente no caldo fermentado utilizando o potenciômetro pHmetro Digimed modelo DM20.

4.10.2 Determinação do crescimento microbiano

A determinação do crescimento microbiano foi determinada por meio das medidas de absorbância no espectrofotômetro Biochrom, modelo Libra S22. Para isto, as células contidas nos hidrolisados fermentados foram separadas como descrito no item 4.8 e quantificadas com a curva de padrão construída para determinar a quantidade de crescimento da levedura (4.10.5). Os testes foram realizados em triplicata.

4.10.3 Determinação da presença de biossurfactante

Após cada tempo de fermentação (2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12h), os caldos fermentados foram centrifugados (centrífuga – Jouan, modelo GR2022) a 7000g por 20 minutos a 4°C para separação de células do sobrenadante. Neste foi realizada a determinação de biossurfactante pelas seguintes análises: índice de emulsificação, atividade emulsificante, tensão superficial, concentração micelar crítica (CMC).

O índice de emulsificação foi determinado por meio da adição de 2 ml de óleo de soja em tubos de ensaio 100 X 15 mm contendo 3,5 ml do caldo fermentado livre de células obtido após a centrifugação. Os tubos foram submetidos a agitação por meio de vortex durante 2 minutos. Posteriormente foi realizada a leitura nos tempos de 10 minutos (t_0), 24, 48, 72 e 96 horas (t_1 , t_2 , t_3 e t_4). O índice de emulsificação foi calculado segundo Iqbal e colaboradores (1995):

$IE = (\text{altura da camada de emulsão (mm)} / \text{altura total da coluna (mm)}) \times 100$.

A atividade emulsificante foi determinada pela mistura de 2 ml de óleo de soja com 3,5 ml do caldo de fermentação livre de células, submetidos a agitação máxima em agitador de tubos por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22), no comprimento de onda de 620 nm. O branco era o caldo de fermentação livre de células. A atividade emulsificante foi calculada pela equação:

$AE = (\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco}) \times \text{diluição}$

A determinação da tensão superficial foi realizada em um tensiômetro Leconde Du Nouy, na temperatura de 25°C, utilizando um volume de 10 ml do caldo de fermentação livre de células.

Para a determinação da concentração micelar crítica, foram realizadas diluições do caldo de fermentação livre de células em água destilada até alcançar a concentração micelar crítica (CMC), na qual o biossurfactante começa a se agregar e não é mais observada a redução significativa da tensão superficial.

A determinação da CMC foi representada por um gráfico da tensão superficial versus concentração do biossurfactante no ponto de inflexão da curva.

4.10.4 Separação do biossurfactante

O sobrenadante livre de células foi colocado em frascos previamente pesados, e o biossurfactante foi separado por precipitação com etanol absoluto (1:3 v/v), em seguida foi mantido em repouso por um dia em uma temperatura de 4 °C. Após esse procedimento, ele foi seco em estufa a 45°C até peso constante. O biossurfactante obtido foi expresso em g/L.

4.10.5 Construção da curva padrão para determinação da massa celular seca

Um volume de 400 ml obtido após o processo de pré-fermentação foi centrifugado conforme o item 4.8 e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, as células foram lavadas com a mesma quantidade de água destilada e novamente foi realizada a centrifugação nas mesmas condições. O

sobrenadante foi descartado novamente e a massa celular úmida foi suspensa em 200 mL de água destilada e em seguida foram realizadas diferentes diluições, para medição da densidade ótica destas em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22) no comprimento de onda de 600nm.

Os cadinhos de porcelana foram previamente secos em mufla a 550°C por 2 horas e pesados em balança analítica. Posteriormente foram adicionados 50 mL das diluições preparadas anteriormente e colocadas para secagem em estufa a 55°C até peso constante.

A massa celular seca foi determinada por meio da subtração do peso dos cadinhos com células e do peso destes limpos e secos, dividido pelo volume adicionado (50 mL). A massa celular seca foi expressa em g/L. Foi construída uma curva padrão relacionando a absorbância com a massa celular em g/L.

4.10.6 Potencial para estabilizar emulsões de molho estilo Francês

Foram realizados ensaios para determinar o potencial de aplicação do biossurfactante produzido para estabilizar emulsões de molhos para salada estilo francês. As leituras do índice de emulsificação (E_{24}) foram realizadas em misturas de vinagre (4mL), Ketchup industrial (2 mL), óleo de soja (4mL) e sal (1gr) com a concentração do biossurfactante variando de 0 a 10 mL; estas foram homogeneizadas e posteriormente realizadas leituras em 10 minutos e 24 horas. O índice de emulsificação foi calculado com a porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total do líquido (cm).

As análises foram realizadas em períodos pré-determinados de 15 em 15 dias durante o tempo de 4 meses, imitando a vida de prateleira do produto. Todas as análises foram realizados em triplicata. O molho francês usado como exemplo é mostrado na Figura 9.

Figura 9: Molho tipo francês comercializado e lista de ingredientes.



Ingredientes: água, óleo vegetal de soja, açúcar líquido invertido, ketchup, vinagre, sal, condimento preparado de especiarias, amido modificado, gema de ovo em pó, acidulante ácido láctico, corante oleoresina de paprica, espessante goma xantana, conservador ácido sorbico e sequestrante EDTA cálcio dissódico.
Não contm gluten.

Fonte: www.junior.com.br

4.10.7 Determinação de aares totais

Os aares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 490 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose em diferentes concentrações.

4.10.8 Determinação de aares redutores

Os aares redutores foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Nelson (1944) e Somogyi (1952). Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 540 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose utilizando diferentes concentrações.

4.10.9 Determinação do teor de compostos fenólicos

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu modificado por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Uma amostra de 0,5 mL de hidrolisado foi misturada com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min,  temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20%). As amostras foram colocadas em banho Maria por 20 min, E posteriormente realizaram-se as leituras de absorvância no comprimento de onda de 755 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

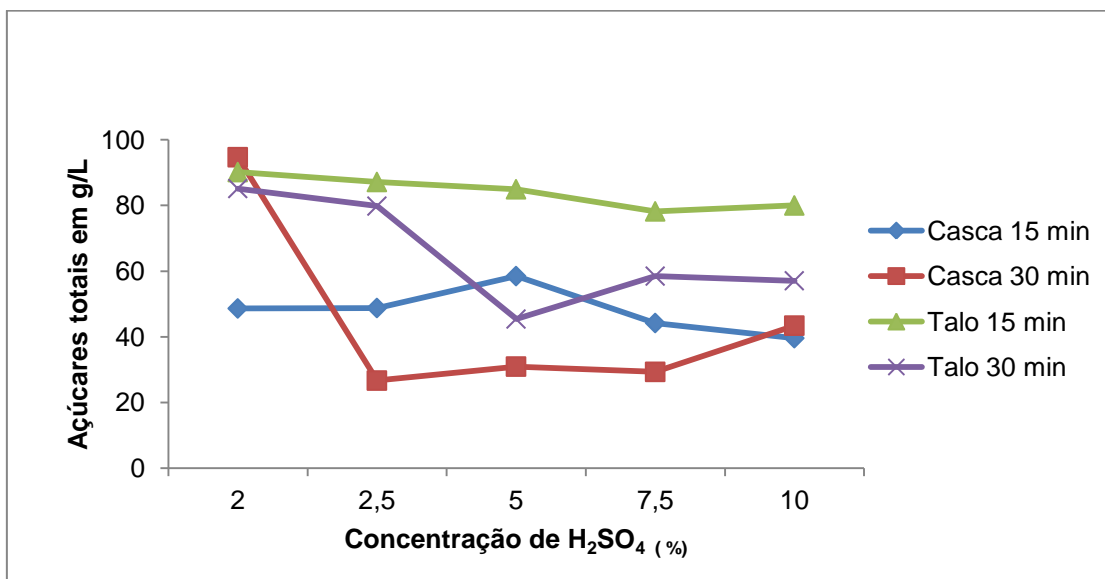
5.1 Padronização da hidrólise da casca e do talo do abacaxi

Testes foram realizados a fim de se comparar o desempenho da utilização de diferentes concentrações de ácido sulfúrico para a hidrólise da casca e do talo do abacaxi em diferentes tempos de aquecimento com a finalidade de selecionar as melhores condições de produção. Portanto a hidrólise foi realizada nas concentrações de H_2SO_4 (2; 2,5; 5,0; 7,5 e 10) e nos tempos de aquecimento em autoclave de 15 e 30 minutos.

Essas análises foram realizadas para determinar qual concentração de ácido libera mais açúcares fermentescíveis que serão utilizados pela levedura para consequente fermentação. O uso de ácido mais concentrado rompe com mais facilidade de lignina e hemicelulose contida na casca e no talo do abacaxi, porém resulta na formação de grande quantidade de compostos tóxicos que podem prejudicar a fermentação, portanto o uso da hidrólise ácida deve ser feita levando em consideração todos esses aspectos (PEREIRA, MENDES, SEOLATTO, 2013).

A hidrólise foi padronizada com ácido sulfúrico na concentração de 2,5% (v/v), com aquecimento de 15 minutos na autoclave. Esta escolha foi feita de acordo com os resultados de açúcares (totais e redutores) e compostos fenólicos. Os resultados das análises de açúcar total para a casca e o talo de abacaxi nos tempos de aquecimento 15 e 30 minutos podem ser observado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Concentrações de açúcares totais em g/L liberados por hidrólise ácida com 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de H_2SO_4 , com aquecimento 15 e 30 min em autoclave.



No Gráfico 2 observa-se que em relação à casca houve uma queda muito acentuada no valor de açúcares totais na concentração de 2,5% no tempo de 30 minutos, portanto a escolha foi no tempo de 15 minutos. Em relação à concentração a melhor neste caso seria a de 5 %, pois ela apresentou o melhor resultado no tempo 15 minutos, porém se pensar em uma indústria fica muito mais viável se utilizar concentrações menores por isso à concentração de 2,5% foi escolhida, já que a diferença dos valores não compensaria o gasto com o ácido.

Em relação ao talo do abacaxi houve também uma diferença nas quantidades de açúcares totais, sendo que no tempo de 15 minutos e na concentração de 2,5% se obteve a maior concentração de açúcares totais, logo se escolheu esses valores para a padronização da hidrólise.

Os resultados obtidos para açúcares redutores e compostos fenólicos podem ser observados nos Gráficos 3 e 4 respectivamente.

Gráfico 3- Concentrações de açúcares redutores em g/L liberados por hidrólise ácida com 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de H_2SO_4 , com aquecimento 15 e 30 min em autoclave.

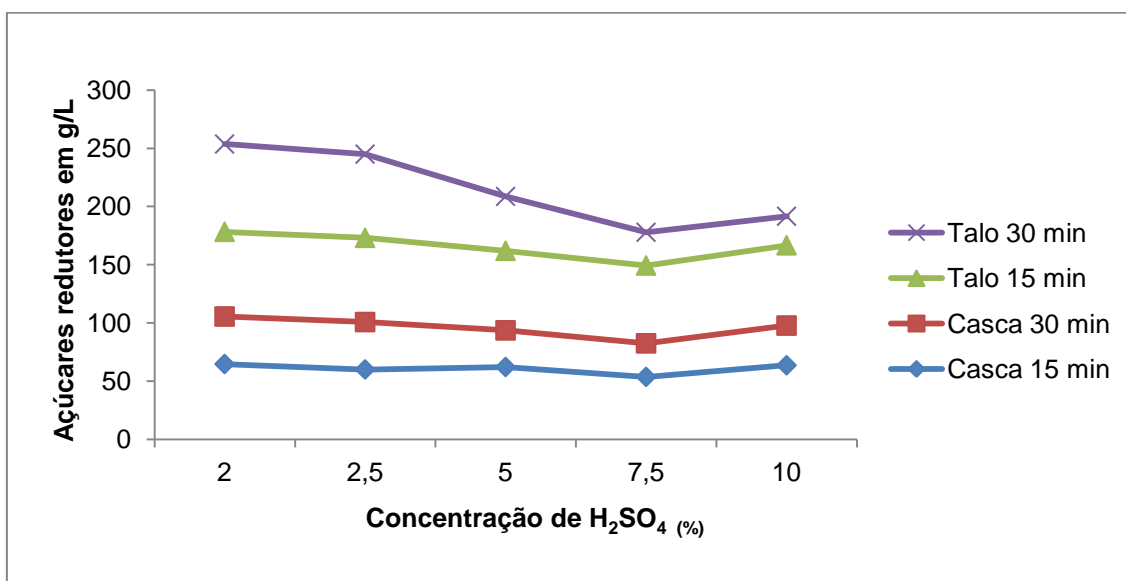
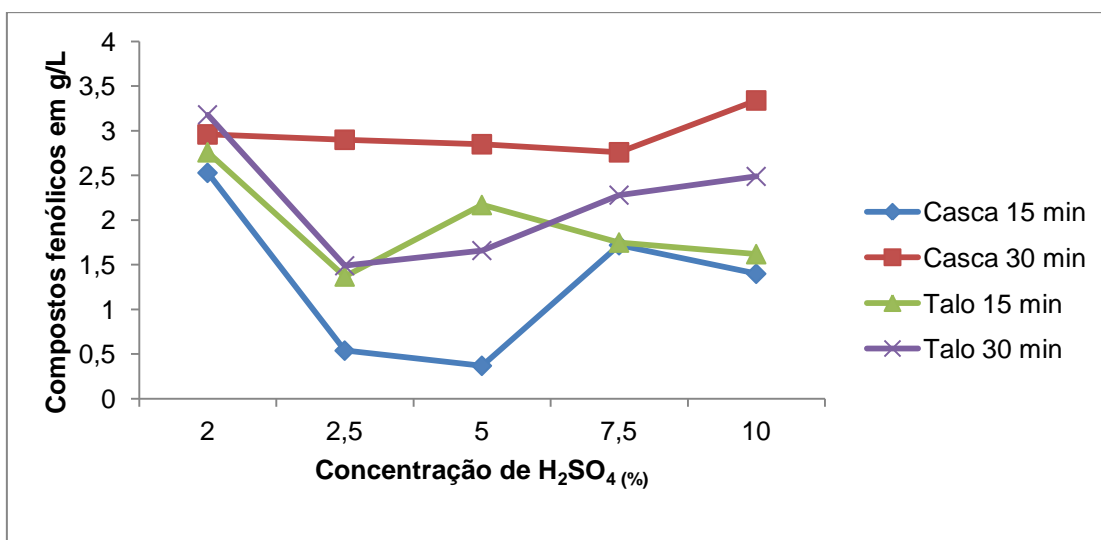


Gráfico 4 - Concentrações de compostos fenólicos em g/L liberados por hidrólise ácida com 2,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0% de H_2SO_4 , com aquecimento 15 e 30 min em autoclave.



No Gráfico 3 observa-se que na concentração de 2% e 30 minutos de aquecimento para o talo do abacaxi obteve-se o melhor resultado para açúcares redutores, porém a diferença para 15 minutos de aquecimento é muito pequena e sabendo-se que quanto menor o aquecimento menor é a liberação de compostos fenólicos escolheu-se 15 minutos de aquecimento,

quanto a concentração percebe-se que para 2% de ácido houve uma liberação maior dos açúcares redutores, mas para obter uma padronização exata para todas as análises foi escolhida a concentração 2,5% assim como nas outras análises realizadas.

O aquecimento escolhido para a casca foi o de 15 minutos, uma vez que não houve muita diferença no conteúdo de açúcares redutores assim a opção foi escolher a mesma concentração de ácido sulfúrico 2,5% e o mesmo tempo de 15 minutos, respectivamente o qual foi escolhido para a casca nos outros experimentos.

Seolatto et al (2014) compararam o rendimento de açúcares fermentescíveis com o pré tratamento de hidrólise ácida em bagaço de abacaxi para a produção de biocombustível e nesse estudo observaram que a maior produção de açúcares redutores ocorreu nas menores temperaturas utilizadas.

Em um estudo realizado por Pattana et al (2010), onde realizou-se a hidrólise ácida dos substratos do abacaxi, obteve-se 5,47g/L de glicose, mostrando assim que o abacaxi apresenta bons rendimentos de açúcares fermentescíveis.

Silva (2011), em seu estudo utilizando planejamento fatorial para determinar o melhor rendimento de açúcares redutores em bagaço de abacaxi, este, encontrou na concentração de 1,5 % de ácido sulfúrico, temperatura de 140° C e tempo de 30 minutos a melhor liberação de açúcares redutores sendo 11 g/L de xilose e 4g/L de frutose.

O Gráfico 4 mostra a determinação dos compostos fenólicos. É importante saber que quanto menor a concentração destes compostos melhor será o crescimento celular e menor a interferência na produção de biossurfactante. Estes compostos reagem com as moléculas biológicas da célula (proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) e provocam danos à membrana celular, gerando perda da integridade da membrana e sua seletividade, afetando dessa maneira sua capacidade como matriz enzimática e barreira seletiva, diminuindo o crescimento celular e a suplementação de açúcares (CAMPOS et al., 2009). Portanto, baseado nos dados relatados, a casca e o talo do abacaxi no tempo de 15 minutos de aquecimento e 2,5% de concentração de ácido sulfúrico, foram as que apresentaram os menores valores. Sendo assim foi possível observar que quanto maior o aquecimento

maior é a liberação desses compostos. No Gráfico 4 observa-se ainda que para o tempo de aquecimento 30 minutos os valores de compostos fenólicos tanto para a casca quanto para o talo do abacaxi foram altos.

5.2 Desintoxicação e concentração dos hidrolisados do talo e da casca do abacaxi

A hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos possibilita a liberação de açúcares polimerizados que podem ser fermentados e podem produzir biossurfactantes por micro-organismos, como por exemplo, a *Candida tropicalis*, porém além desses açúcares, há também a liberação de compostos inibidores que limitam a produção de biossurfactante e, por isso, são desenvolvidos métodos específicos de desintoxicação do material hidrolisado, para realizar o processo de fermentação (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Essa etapa serve para diminuir os compostos inibidores e outros fatores que possam interferir no desenvolvimento dos micro-organismos. Para monitorar antes e depois da desintoxicação foram realizadas análises de açúcares redutores e compostos fenólicos e também depois de concentrar o sobrenadante foram realizadas novas análises de açúcares redutores e compostos fenólicos. Os resultados podem ser observados nos Gráficos 5 e 6, respectivamente.

Gráfico 5 - Açúcares redutores em g/L sem desintoxicar, desintoxicado e após concentração

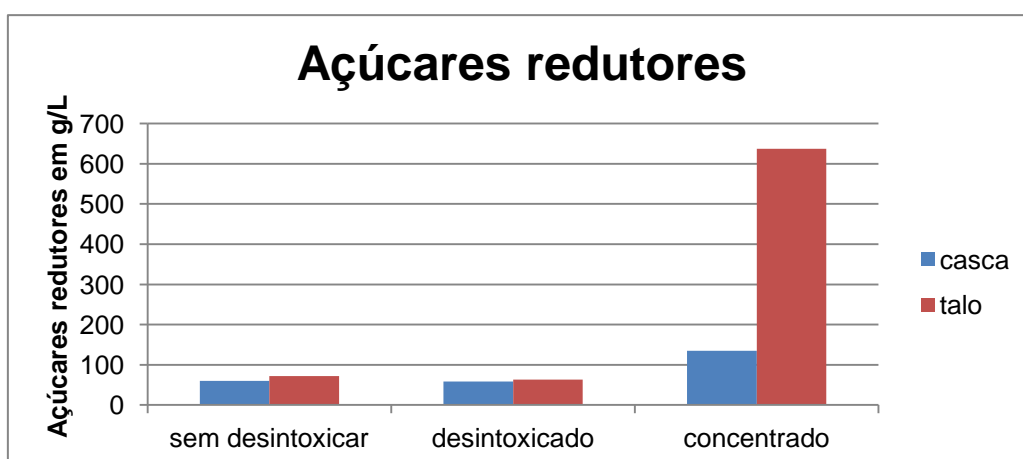
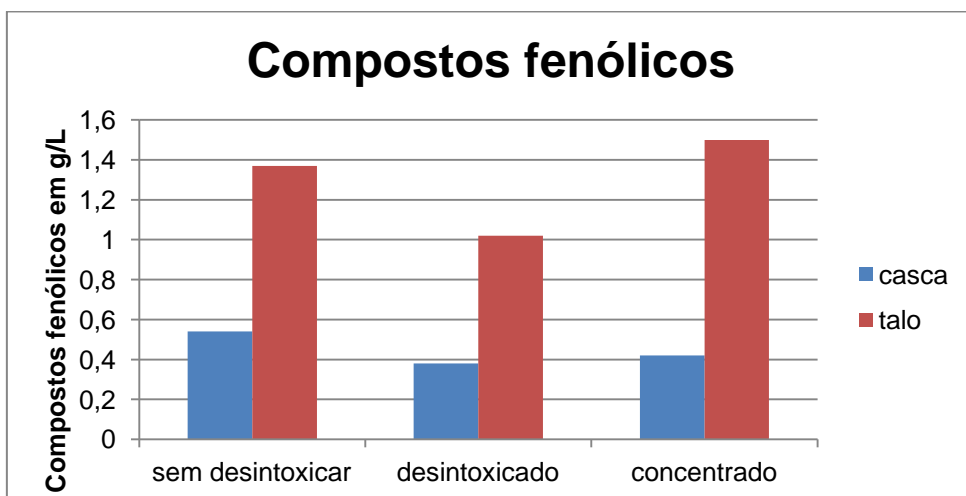


Gráfico 6 - Compostos fenólicos em g/L sem desintoxicar, desintoxicado e após concentração.



No Gráfico 5 observa-se que no hidrolisado sem desintoxicar e desintoxicado o conteúdo de açúcares redutores não teve muita mudança, porém ao concentrar o desintoxicado os valores tanto para a casca como para o talo de abacaxi subiram, sendo que para o talo o aumento de açúcares redutores foi o maior.

Já para os compostos fenólicos, o Gráfico 6 nos mostra que após desintoxicar o hidrolisado os valores diminuíram tanto para a casca quanto para o talo do abacaxi, porém ao concentrar esse hidrolisado os valores voltaram a aumentar.

5.3 Determinação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi avaliado para concentrações de glicose (1 a 5%) e para concentrações de diferentes substratos casca e talo do abacaxi (1 a 5%). Os resultados estão demonstrados nos Gráficos (7, 8 e 9), respectivamente.

Gráfico 7: Crescimento microbiano para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200rpm.

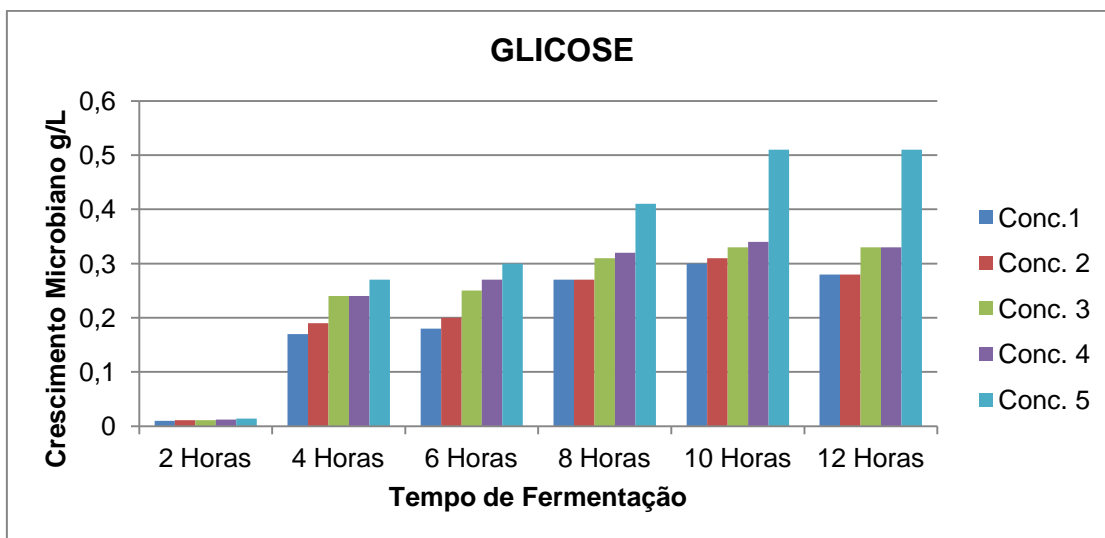


Gráfico 8: Crescimento microbiano para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca), utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200rpm.

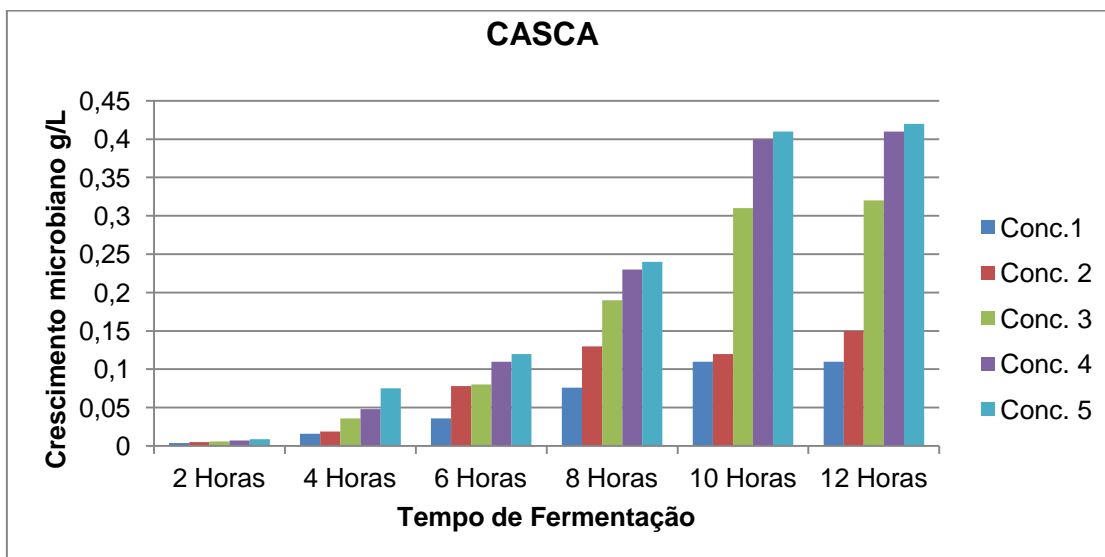
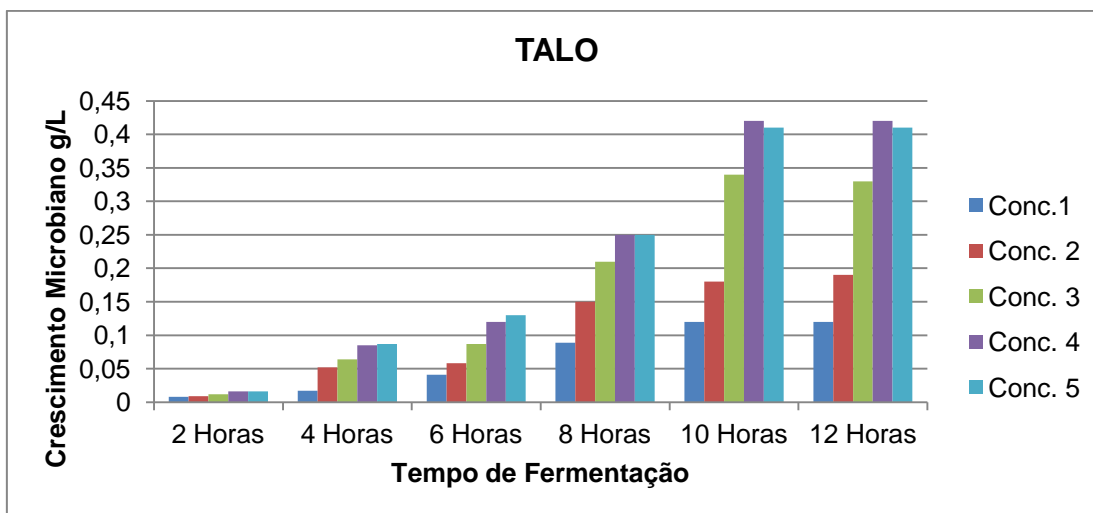


Gráfico 9: Crescimento microbiano para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200rpm.



5.4 Variação do pH

Foram realizadas fermentações em períodos de 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 12 horas para cada concentração de glicose (1 a 5%) e também para cada concentração dos substratos (1 a 5%) sendo eles a casca e o talo do abacaxi e analisada a variação do pH para cada fermentação.

Os resultados demonstraram que houve variação do pH ao longo da fermentação em relação ao pH inicial de 6,5. Observa-se também que estas mudanças são diferentes em relação ao substrato e a concentração utilizada (Gráficos 10, 11 e 12). Os valores de pH baixo em algumas concentrações de substrato está relacionada ao fato do carboidrato ter sido catabolizado resultando na produção de ácidos e conseqüentemente ao aumento do crescimento celular (FERREIRA, 2007).

Gráfico 10: Variação do pH para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200rpm.

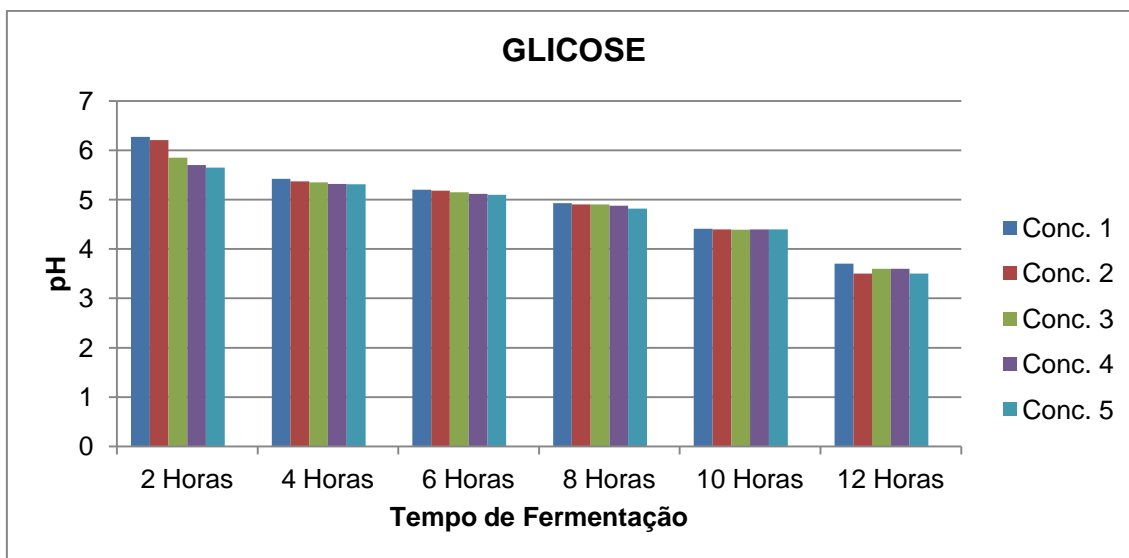


Gráfico 11: Variação do pH para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo), utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200rpm.

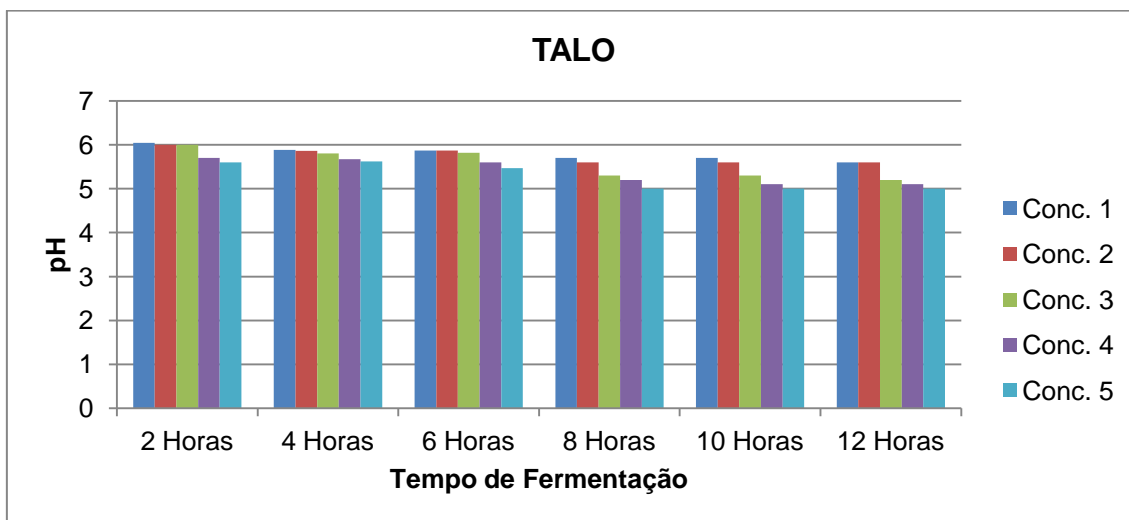
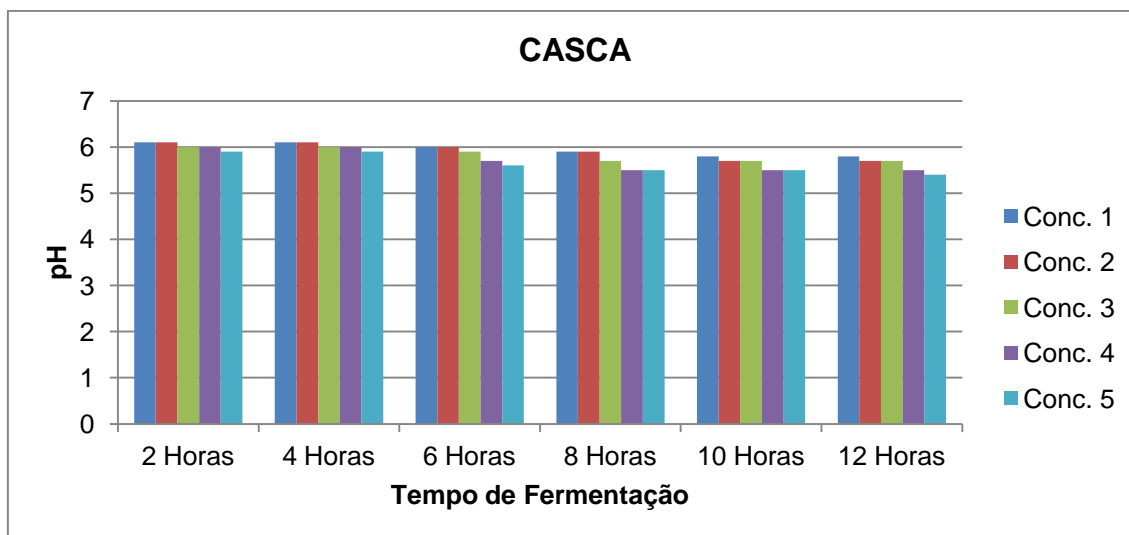


Gráfico 12: Variação do pH para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



5.5 Índice de emulsificação

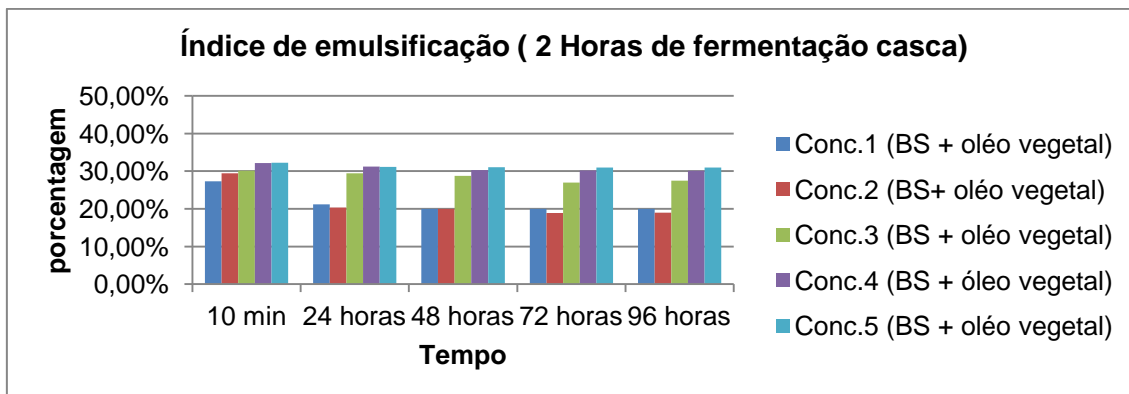
A determinação do índice de emulsificação está diretamente relacionado com a presença de biossurfactantes no caldo fermentado livre de células, tendo assim altos índices de emulsificação que indicam maior quantidade de biossurfactantes (OLIVEIRA, 2014).

Um bom biossurfactante possui a capacidade de emulsificação e estabilização da emulsificação em torno de 50% do volume da emulsão original 24 horas depois da sua formação (ANTUNES, 2010).

Os biossurfactantes produzidos nos períodos de 2 h, 4h, 6h e 8h para os três substratos, (casca, talo de abacaxi e glicose respectivamente) obtiveram resultados abaixo de 50% indicando que a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* nesses intervalos de fermentação ficaram abaixo de 50% conforme mostram os Gráficos 13, 14, 15 e 16 para casca, 17, 18, 19 e 20 para talo e 21, 22, 23 e 24 para glicose.

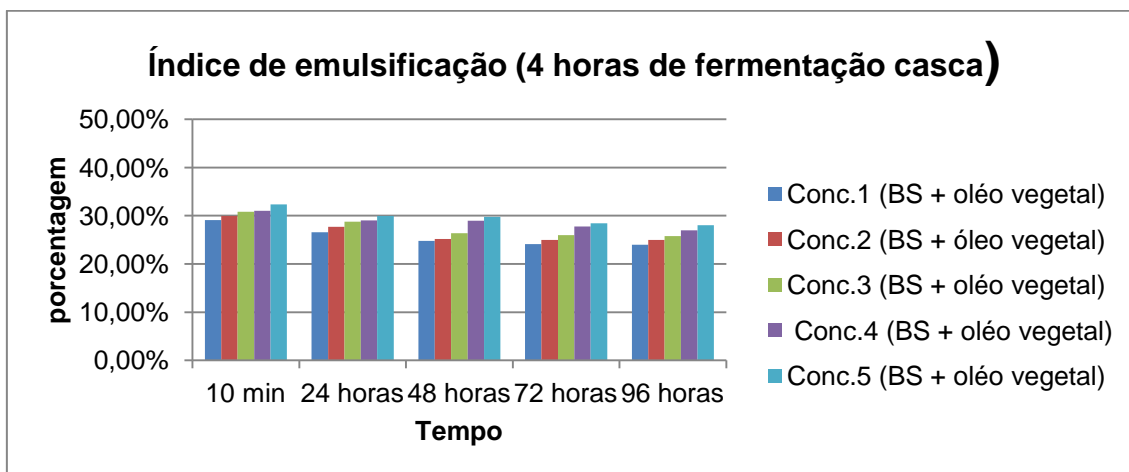
Isso pode ser explicado pela pouca produção de biossurfactante, uma vez que, existe a relação entre a concentração do biossurfactante produzido e o valor de índice de emulsificação (CALVO, et al., 2009).

Gráfico 13: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 2 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



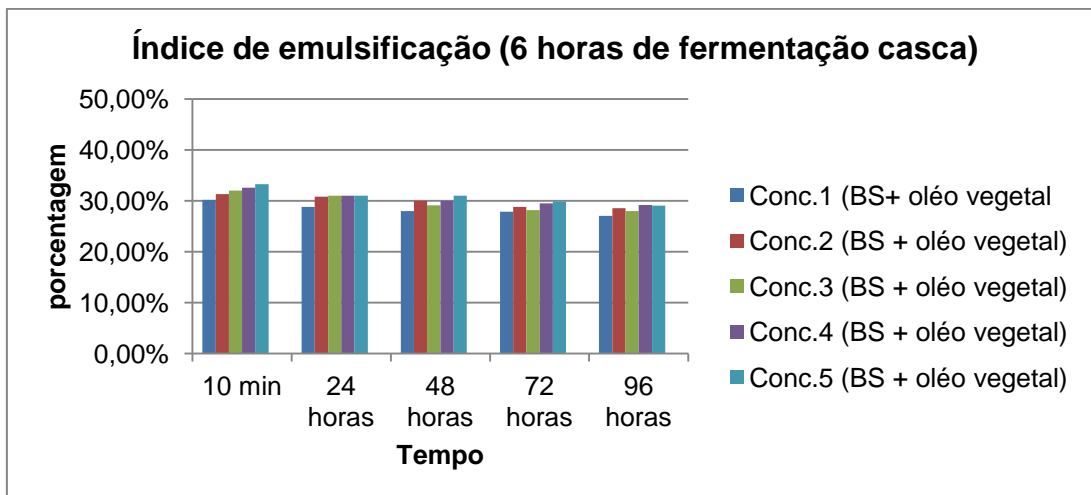
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 14: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 4 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



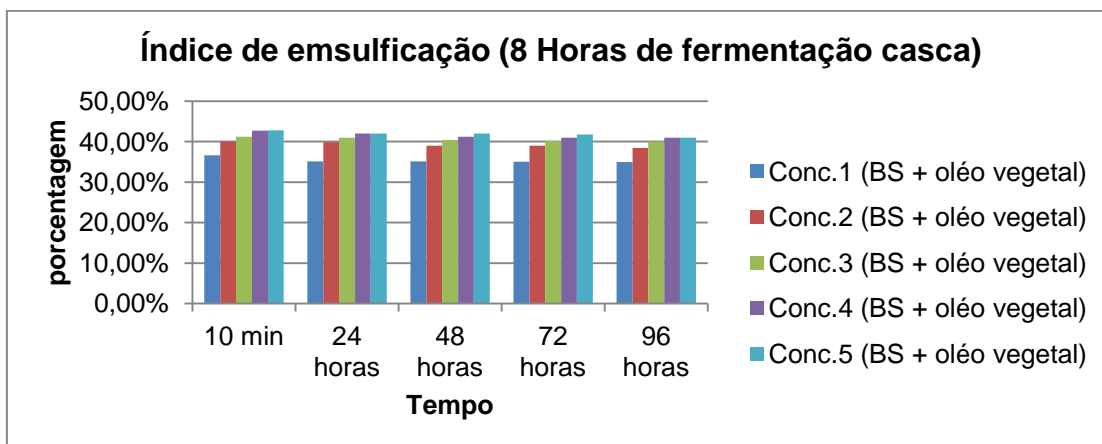
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 15: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 6 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



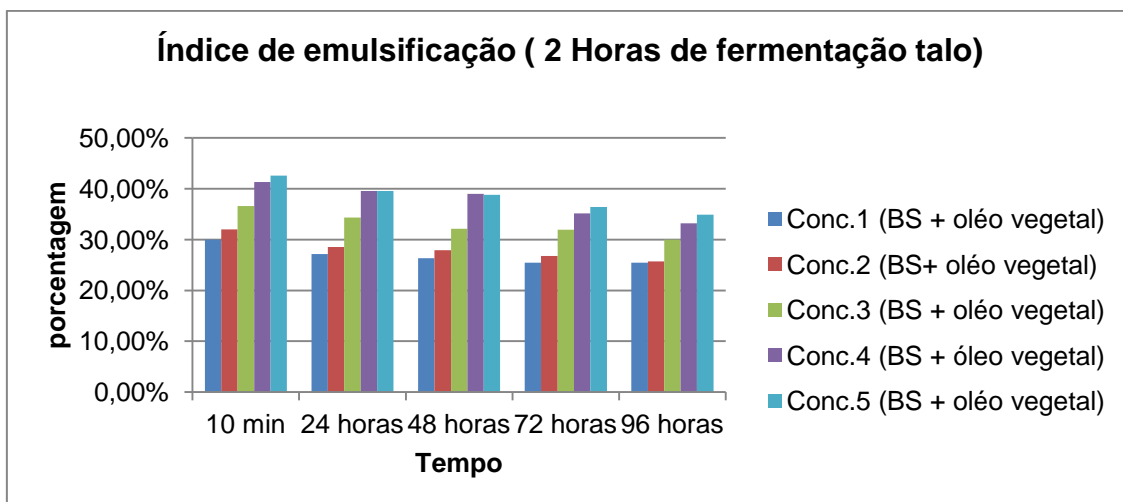
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 16: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 8 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



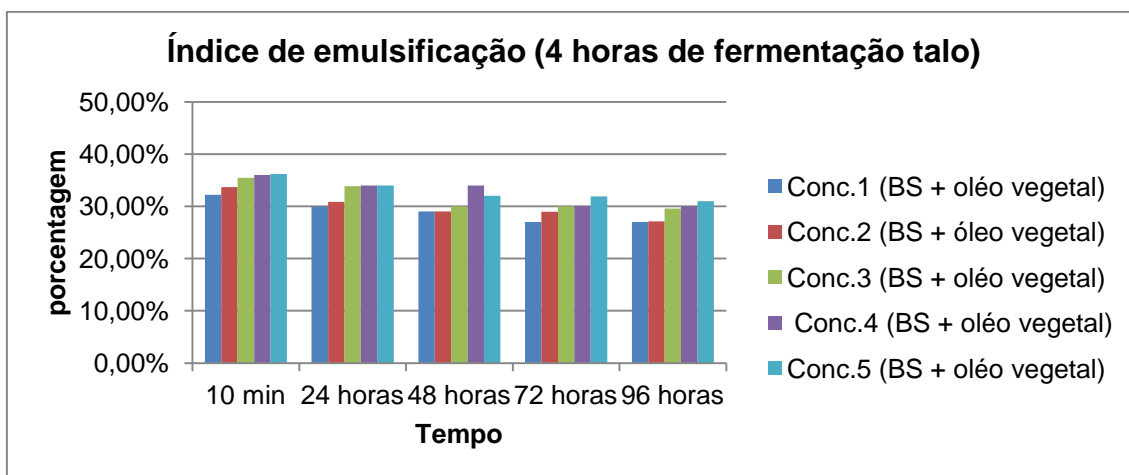
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 17: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 2 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



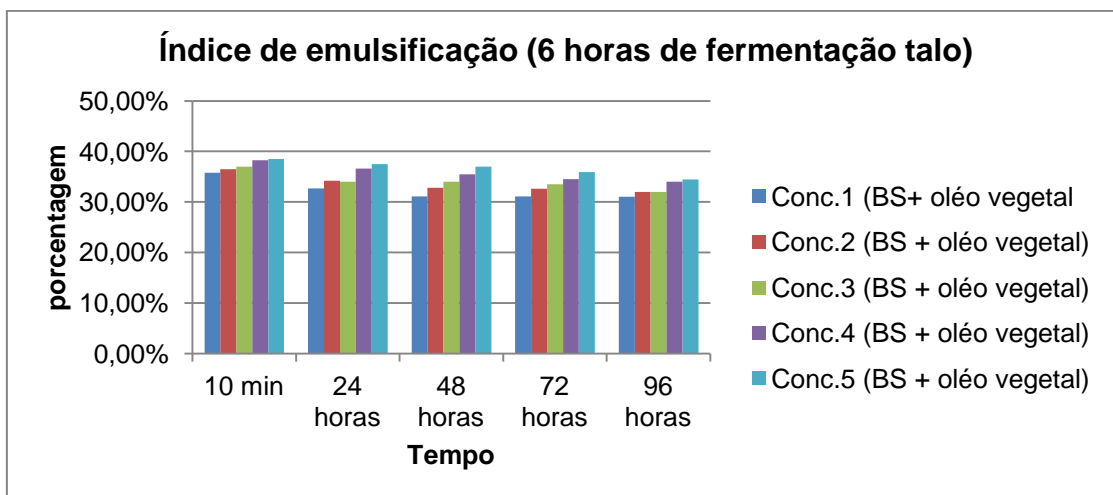
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 18: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 4 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



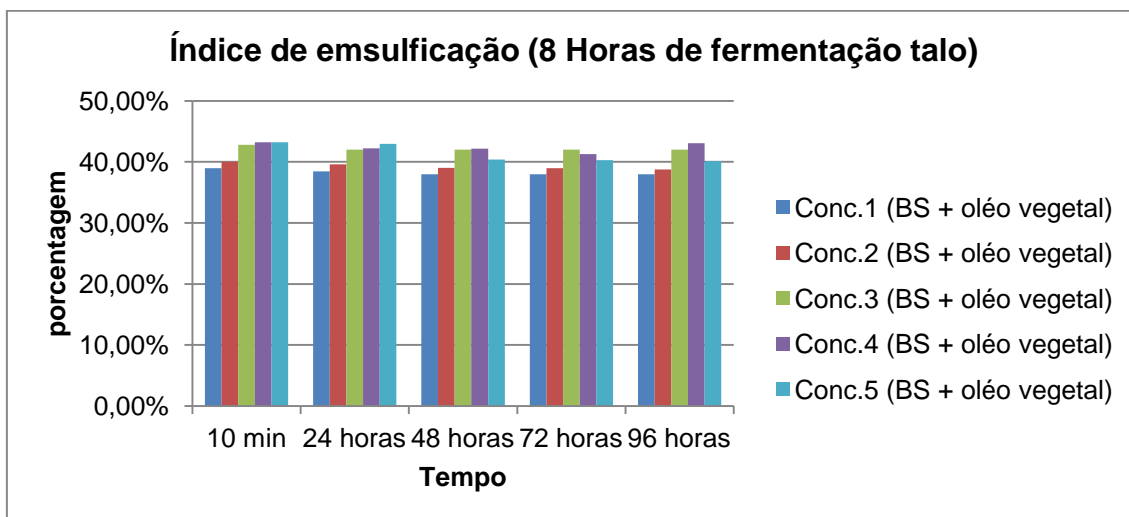
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 19: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 6 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



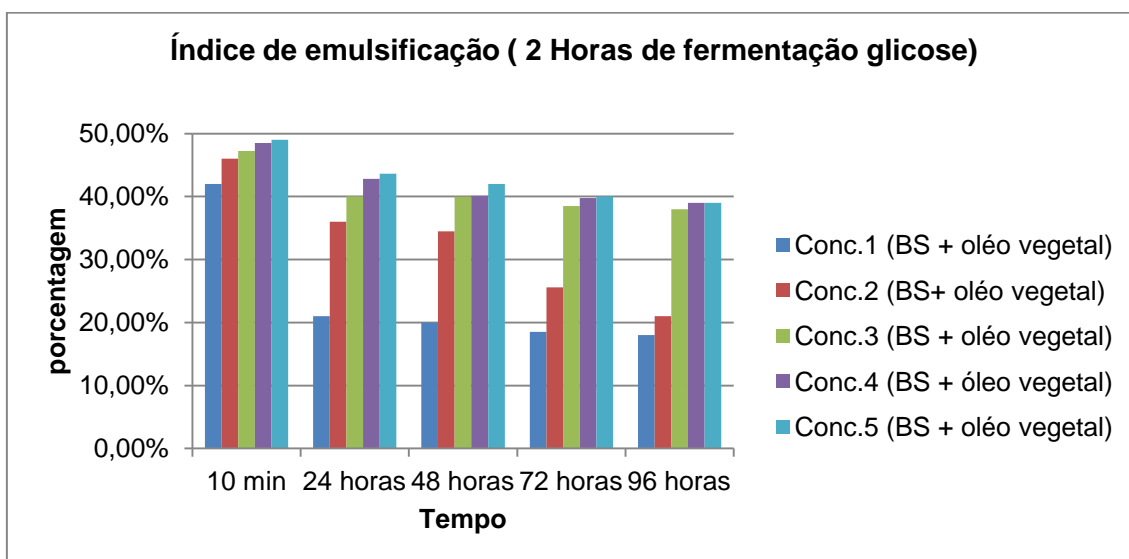
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 20: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 8 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



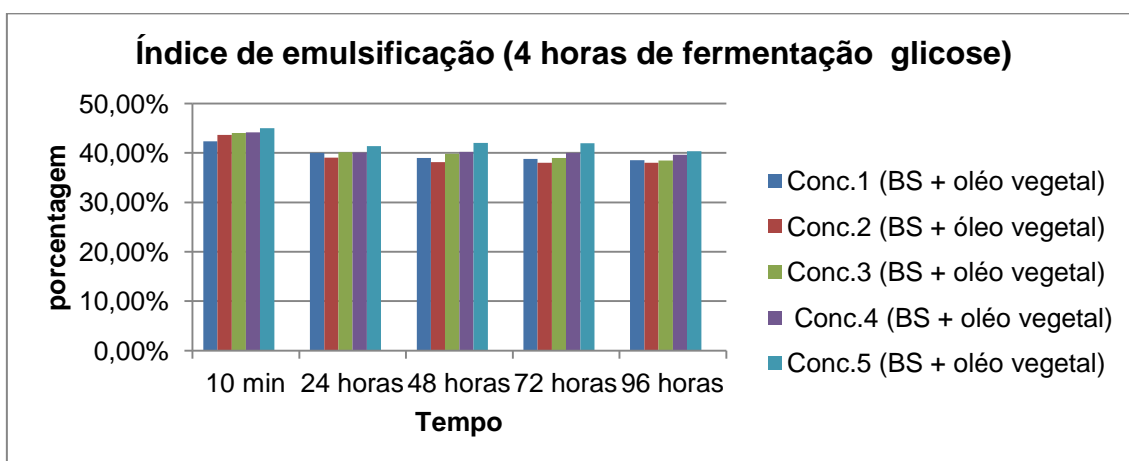
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 21: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 2 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



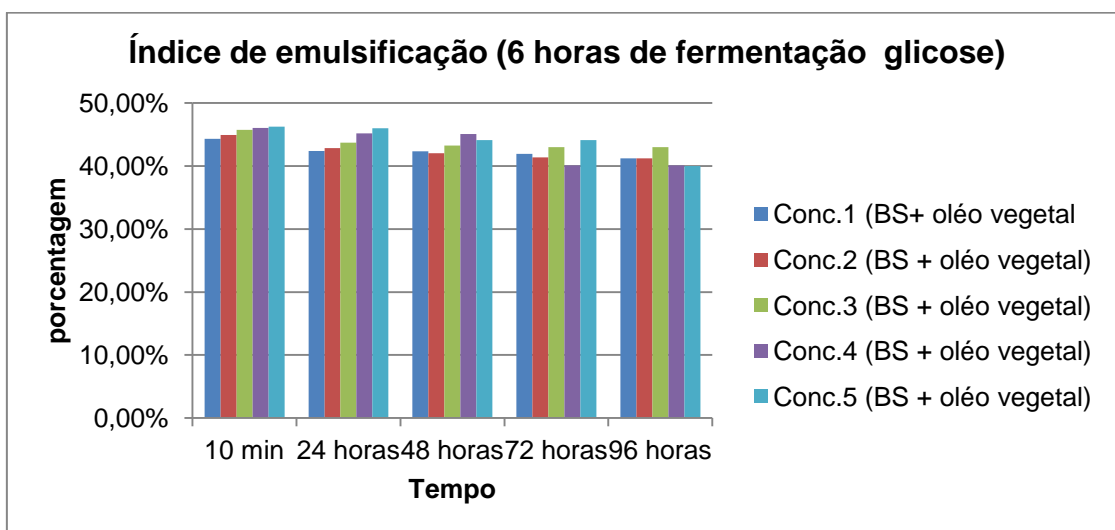
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 22: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 4 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



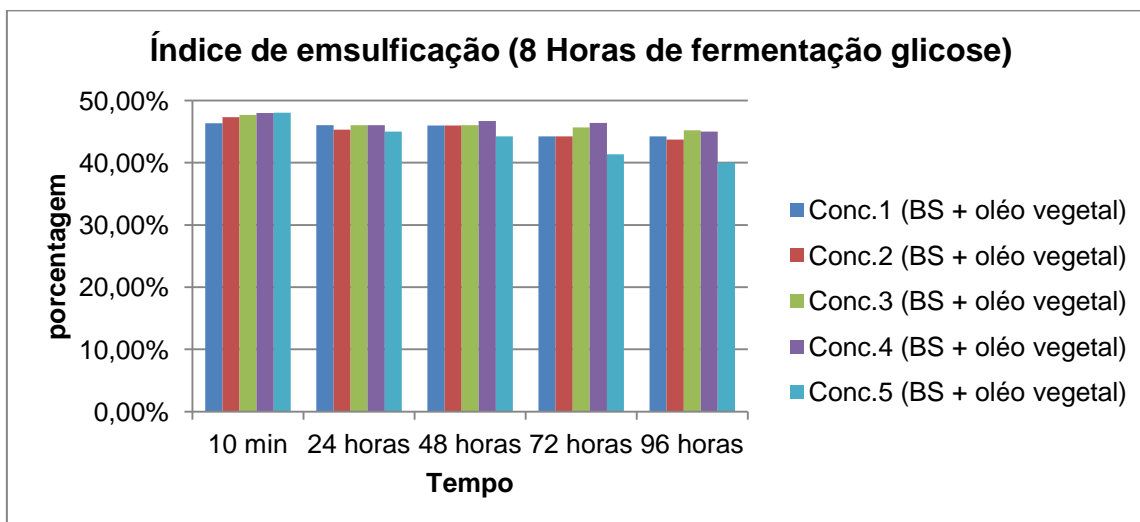
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 23: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 6 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

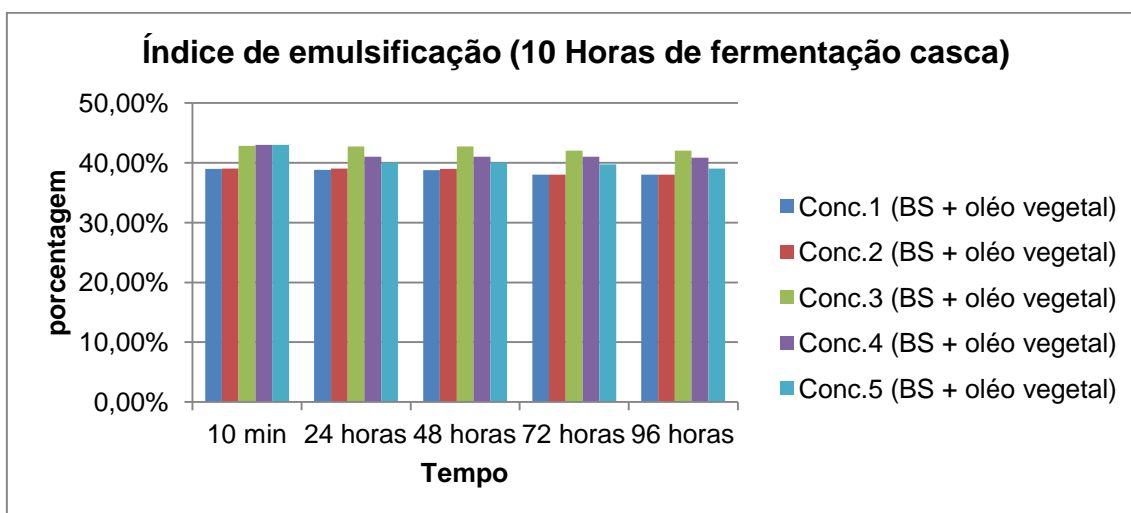
Gráfico 24: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 8 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

O biossurfactante produzido após 10 horas de fermentação para os três substratos analisados obtiveram valores mais altos em relação a todos os outros períodos de fermentação, sendo que para o substrato casca o maior valor e a melhor estabilidade após 24 horas foi a concentração 3 obtendo um valor de 43% e diminuindo apenas 2% após as 24 horas da sua formação original, conforme mostrado no Gráfico 25.

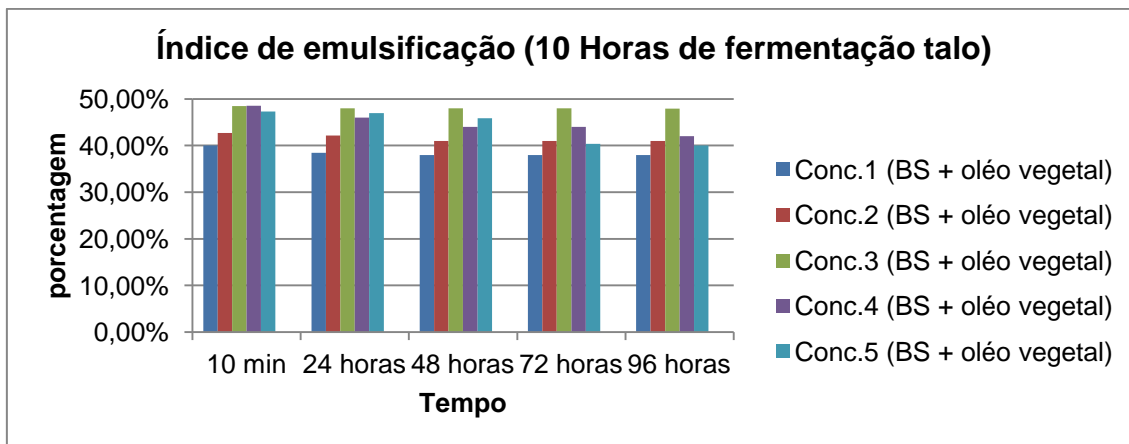
Gráfico 25: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 10 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

Para o substrato talo a melhor concentração foi a concentração 3, em relação ao índice de emulsificação 48,50% mantendo a sua estabilidade após 24 horas a 48%, portanto esta concentração foi a que teve o resultado mais aceitável o que pode ser observado no Gráfico 26.

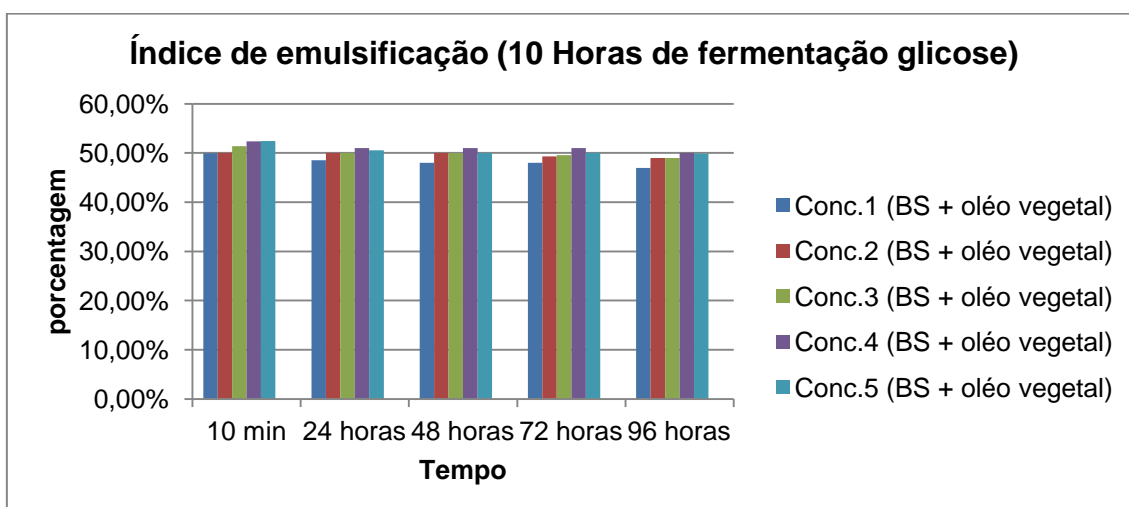
Gráfico 26: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 10 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

Em relação à glicose, a qual foi o substrato que obteve o maior índice de emulsificação em todas as concentrações, o melhor resultado obtido foi para a concentração 4 tendo 52,39% de índice de emulsificação e mantendo-se estável até 51% após 24 horas conforme mostra o Gráfico 27.

Gráfico 27: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 10 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

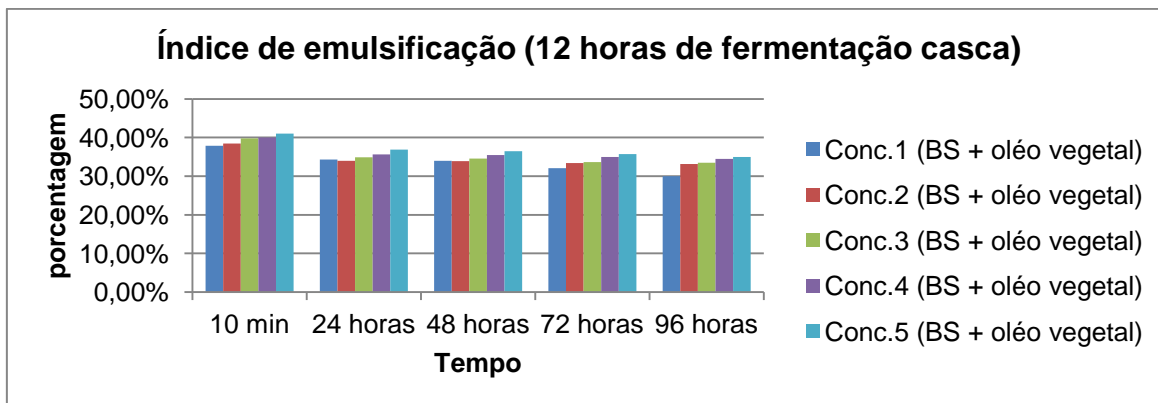
Em um estudo realizado por Ehrhardt (2015), onde se analisou o índice de emulsificação do biossurfactante produzido com o substrato de abacaxi utilizando o óleo de motor e também o óleo de soja com 1% de glicose e após 24 horas, observou-se que em todas as análises realizadas obteve-se emulsão assim como nesse estudo, porém o melhor resultado foi com 5 horas de fermentação obtendo 60% de índice de emulsificação com o óleo de soja, nesse mesmo estudo com 5% de glicose obteve-se 52,9% de índice de emulsificação para o óleo de soja em 24 horas de fermentação.

Em outro estudo realizado por Rocha (2017), onde se produziu surfactina utilizando melão de cana, todas as amostras apresentaram índice de emulsificação superior a 50% em querosene após 24 horas.

Santos et al (2018), em seu estudo de produção de biossurfactantes com diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*, analisou que o substrato que teve os melhores resultados para índice de emulsificação foi o suco de abacaxi, tendo bons resultados tanto para o óleo de motor quanto para o óleo de soja sendo os valores 72,04 e 67,54, respectivamente.

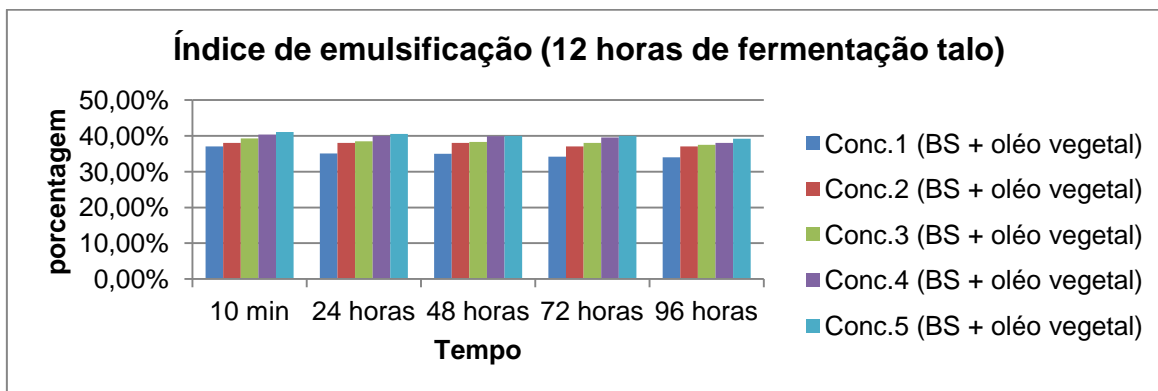
Os resultados de índice de emulsificação com 12 horas de fermentação diminuíram, portanto o melhor tempo de fermentação nessa análise seria 10 horas de fermentação, isso pode ser relacionado ao fato de que após 12 horas a produção de biossurfactante tenha diminuído, assim como houve a diminuição da produção de *Candida tropicalis*. Os resultados podem ser analisados nos Gráficos 28, 29 e 30.

Gráfico 28: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



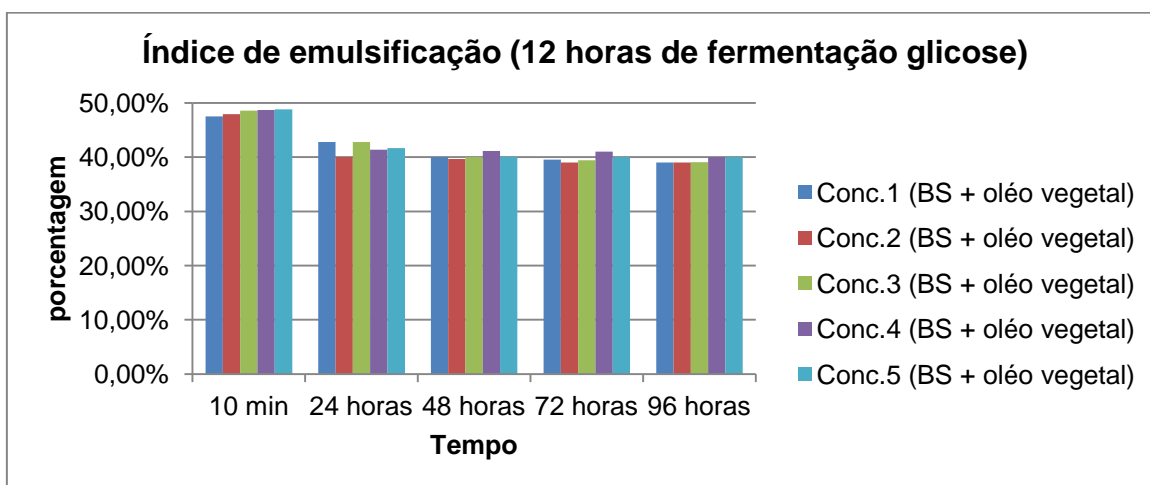
*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 29: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

Gráfico 30: Índice de emulsificação para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela levedura *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C e 200 rpm.



*BS: Biossurfactante produzido.

5.6 Atividade emulsificante

A atividade de emulsificação foi determinada pela mistura de 2 ml de óleo de soja com 3,5 ml da solução de biossurfactante, submetidos a agitação máxima em agitador de tubos por 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 620 nm. A atividade emulsificante foi calculada pela equação:

AE: (absorbância da amostra – absorbância do branco) X diluição.

Nas tabelas 7, 8 e 9 podem-se observar os resultados para os substratos casca, talo de abacaxi e glicose respectivamente.

Tabela 7- Atividade emulsificante para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) utilizadas pela *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C a 200rpm.

Concentração	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas	10 Horas	12Horas
Conc.1 (BS+óleo)	0,41	0,46	0,58	1,21	1,25	1,28
Conc.2 (BS+óleo)	0,45	0,46	0,59	1,25	1,3	1,32
Conc.3 (BS+óleo)	0,46	0,48	0,65	1,35	1,42	1,46
Conc.4 (BS+óleo)	0,48	0,48	0,67	1,36	1,59	1,61
Conc.5 (BS+óleo)	0,5	0,51	0,78	1,38	1,6	1,67

*BS: Biossurfactante produzido.

Tabela 8- Atividade emulsificante para as diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) utilizadas pela *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C a 200rpm.

Concentração	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas	10 Horas	12Horas
Conc.1 (BS+óleo)	0,45	0,48	0,67	1,65	2,01	2,06
Conc.2 (BS+óleo)	0,46	0,5	0,78	1,67	2,13	2,15
Conc.3 (BS+óleo)	0,47	0,52	0,84	1,69	2,57	2,58
Conc.4 (BS+óleo)	0,5	0,57	0,86	1,75	2,65	2,78
Conc.5 (BS+óleo)	0,51	0,61	0,91	1,8	2,7	2,86

*BS: Biossurfactante produzido.

Tabela 9- Atividade emulsificante para as diferentes concentrações de glicose utilizadas pela *Candida tropicalis* durante a produção de biossurfactantes no período de 12 horas de fermentação a 30°C a 200rpm.

Concentração	2 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas	10 Horas	12Horas
Conc.1 (BS+óleo)	0,68	0,79	0,84	1,78	2,16	2,19
Conc.2 (BS+óleo)	0,7	0,79	0,87	1,81	2,19	2,24
Conc.3 (BS+óleo)	0,75	0,81	0,94	1,95	2,68	2,74
Conc.4 (BS+óleo)	0,76	0,85	0,97	2,05	2,75	2,79
Conc.5 (BS+óleo)	0,8	0,87	0,99	2,1	2,84	2,97

*BS: Biossurfactante produzido.

Conforme demonstrado nas Tabelas 7, 8 e 9 a partir das 6 horas de fermentação houve um aumento considerável em todos os tipos de substratos, pode ser analisado também que quanto maior for a concentração dos substratos maior será a atividade emulsificante como pode ser visto nas tabelas. Portanto, as atividades emulsificantes da casca e talo de abacaxi e glicose na concentração 5 e com 12 horas de fermentação, foram os valores mais altos para essa análise. Porém os valores com 4% de concentração não houve uma diferença significativa, sendo assim seria mais viável a nível industrial utilizar a concentração 4. De acordo com Lang (2002), em seu estudo ele produziu um biossurfactante que atingiu 2,44 a 600nm de atividade emulsificante, neste trabalho encontrou-se um resultado superior atingindo 2,86 para o substrato talo e 2,97 para o substrato glicose a 600nm de atividade emulsificante, o que indica que o biossurfactante produzido tem uma boa atividade emulsificante.

5.7 Tensão superficial

A eficácia do biossurfactante produzido pela levedura *Candida tropicalis* nos meios de produção, foi determinada pelas medidas de tensão superficial. Essa determinação foi realizada nos caldos fermentados após serem centrifugados para separação das células do sobrenadante. Esta análise é a de maior importância para os agentes tensoativos, sendo que quanto maior

for à concentração do tensoativo produzido maior será a redução da tensão superficial (OLIVEIRA, 2014).

Os resultados obtidos para tensão superficial para os substratos glicose, talo e casca de abacaxi estão mostrados nos Gráficos 31, 32 e 33, respectivamente, pode-se observar que estes resultados diferem quanto ao tipo de substrato, concentração e tempo de fermentação.

No Gráfico 31 foram obtidos os melhores resultados o qual foi utilizado glicose como substrato para a produção de biossurfactante a partir de 10 horas de fermentação em relação a concentração tanto a 4% e 5% não variam muito o resultado. Sendo que na concentração 4 e 10 horas de fermentação a tensão superficial da água foi reduzida de 72 mNm^{-1} para 28 mNm^{-1} .

Em um estudo realizado por Ehrhardt (2015), obteve-se uma redução da tensão superficial em 25,1% após nove horas de fermentação da bactéria *Bacillus subtilis* utilizando como substrato os resíduos do abacaxi e 3% de concentração de glicose. Neste mesmo estudo com 5% de glicose obteve-se uma redução de 25,3% após 24 horas de fermentação.

Nesse estudo quando utilizado o hidrolisado do abacaxi (talo) foi reduzida a tensão superficial da água de 72 mNm^{-1} até 30 mNm^{-1} na concentração 4% e 10 horas de fermentação (Gráfico 32), este resultado encontrado com a levedura *Candida tropicalis* e o substrato glicose, talo e casca do abacaxi indica que esta levedura produz um biossurfactante com grande poder de redução da tensão superficial.

Em um estudo realizado por Almeida (2014), onde se utilizou a levedura *Candida tropicalis* e resíduos agroindustriais como a milhocina obteve-se uma redução da tensão superficial do meio para $29,52 \text{ mNm}^{-1}$ em uma fermentação de 120 horas.

Quando se utilizou a casca de abacaxi (Gráfico 33) como substrato para a produção de biossurfactante a tensão superficial da água foi de 72 mNm^{-1} para 37 mNm^{-1} , na concentração 4% e 10 horas de fermentação. O resultado para a casca de abacaxi foi inferior aos obtidos pela glicose e talo de abacaxi pelo fato da casca de abacaxi não ter tantos açúcares fermentescíveis, sendo assim a produção de biossurfactante foi afetada e o resultado baixo em relação a tensão superficial. De acordo com Rocha (2016), o biossurfactante produzido por *Candida tropicalis* em um biorreator utilizando óleo de fritura de canola,

melaço de cana e milhocina em uma fermentação de 144 horas reduziu a tensão superficial para 31 mNm^{-1} .

Gráfico 31: Tensão superficial do sobrenadante livre de células obtido em diferentes concentrações de glicose durante 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação utilizando a levedura *Candida tropicalis* a 30°C e 200 rpm (mudar o gráfico).

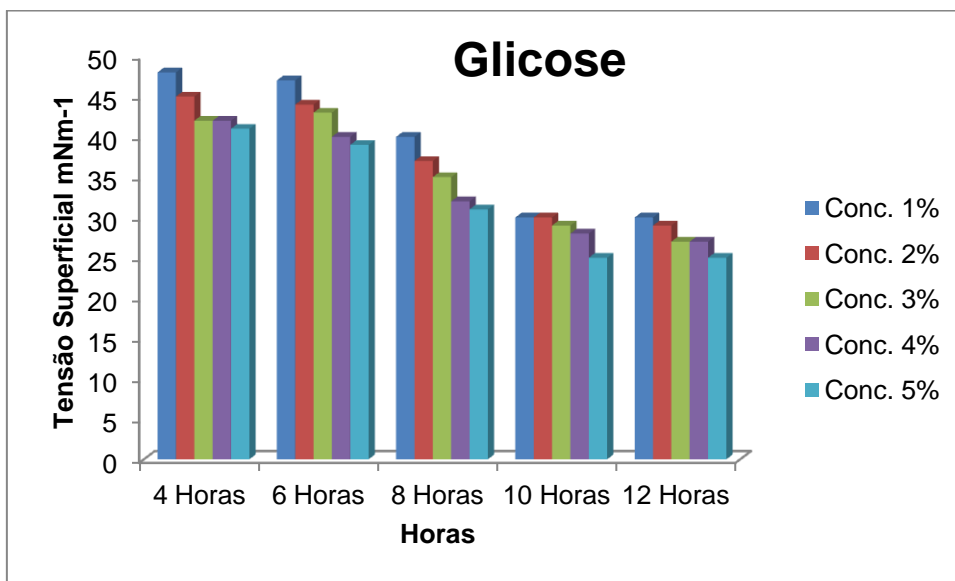


Gráfico 32: Tensão superficial do sobrenadante livre de células obtido em diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (talo) durante 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação utilizando a levedura *Candida tropicalis* a 30°C e 200 rpm.

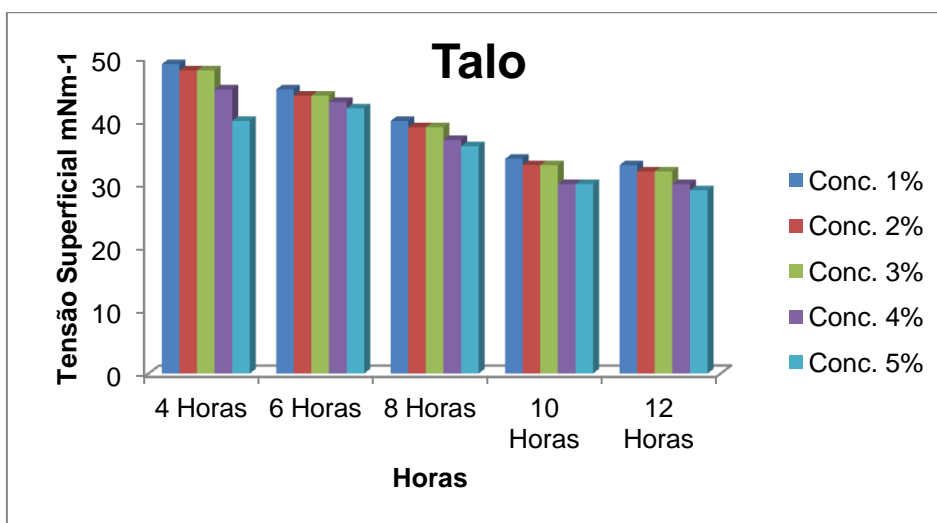
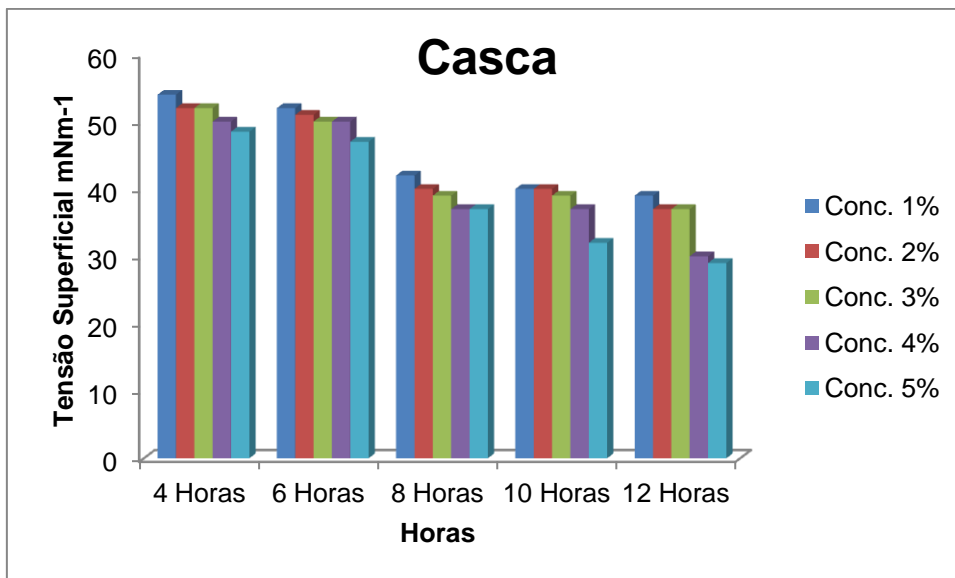


Gráfico 33: Tensão superficial do sobrenadante livre de células obtido em diferentes concentrações de hidrolisado de abacaxi (casca) durante 4, 6, 8, 10 e 12 horas de fermentação utilizando a levedura *Candida tropicalis* a 30°C e 200 rpm.



5.8 Concentração micelar crítica (cmc)

A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada pela diluição do caldo fermentado livre de células com base na medição da tensão superficial em função da concentração do biossurfactante. Para esta análise foram utilizadas apenas as amostras com 10 horas de fermentação na concentração 4%, já que, neste período foi onde se obteve os melhores resultados de tensão superficial e produtividade.

A determinação da concentração micelar crítica é um dos parâmetros mais importantes para a determinação da eficiência de um biossurfactante, e este valor varia entre 0,01 a 2 g/L (MULLIGAN, et al. 2001), sendo assim os resultados obtidos nesse estudo, conforme mostra os Gráficos 34, 35 e 36 para os três substratos utilizados, demonstraram resultados inferior a 2 g/L para CMC revelando ser um biossurfactante eficiente.

Nos Gráficos 34, 35 e 36 estão os valores de CMC dos biossurfactantes produzidos por glicose, talo e casca de abacaxi, respectivamente.

Gráfico 34: Concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células quando foi utilizado glicose como substrato pela levedura *Candida tropicalis* no tempo de fermentação de 10 horas a 30°C e 200 rpm.

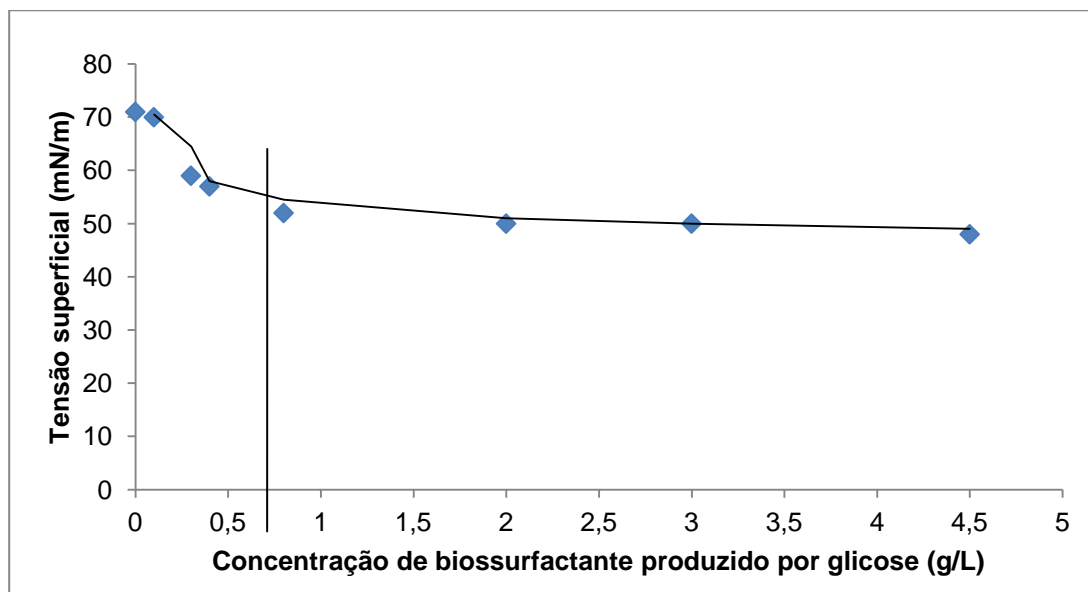


Gráfico 35: Concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células quando foi utilizado hidrolisado de abacaxi (talo) como substrato pela levedura *Candida tropicalis* no tempo de fermentação de 10 horas a 30°C e 200 rpm.

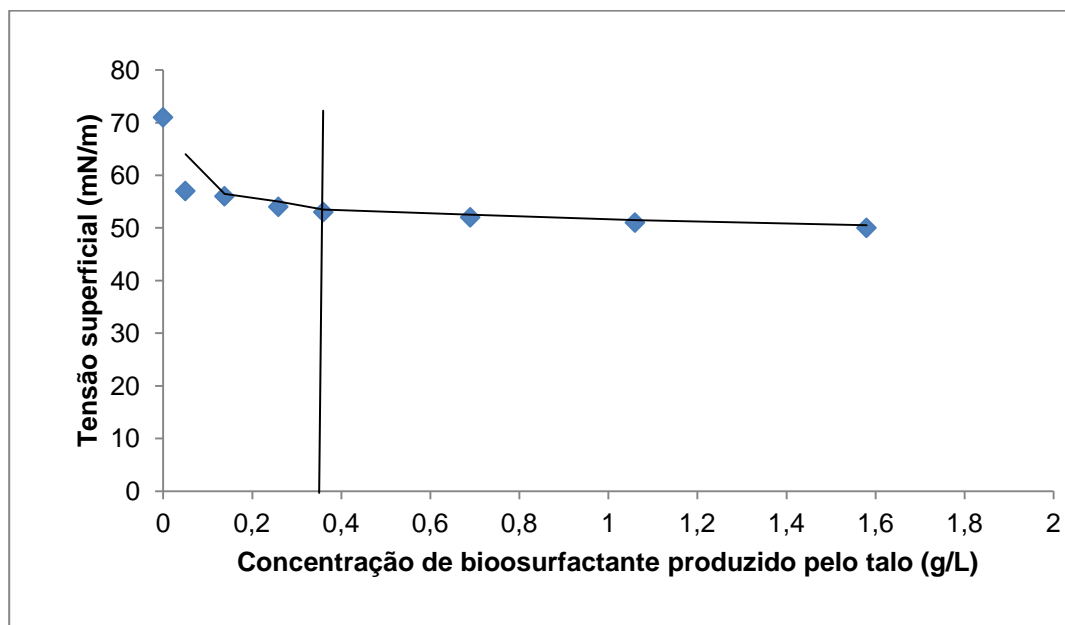
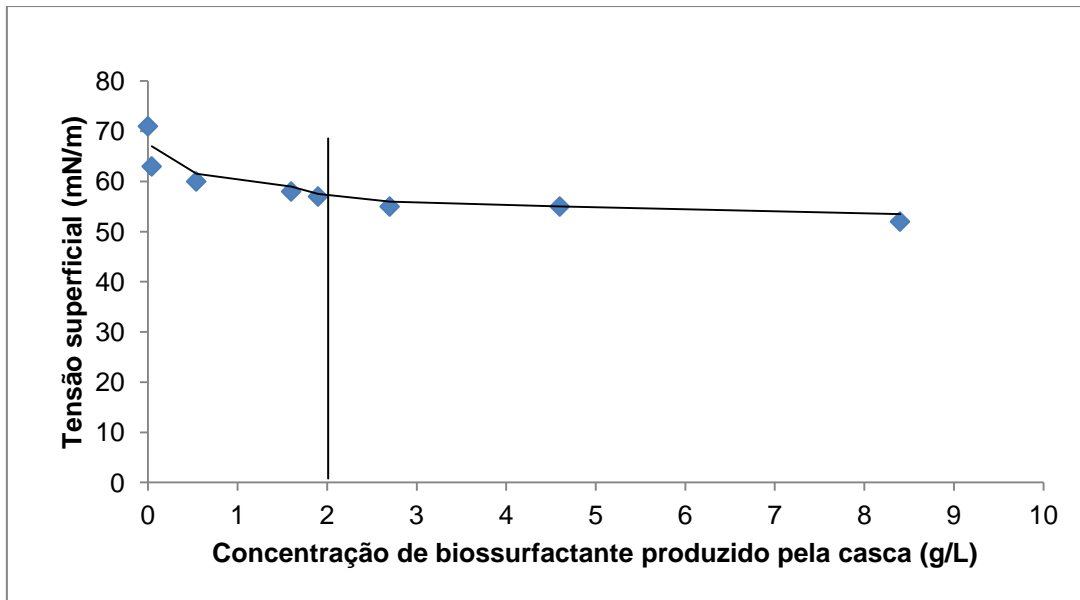


Gráfico 36: Concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células quando foi utilizado hidrolisado de abacaxi (casca) como substrato pela levedura *Candida tropicalis* no tempo de fermentação de 10 horas a 30°C e 200 rpm.



Conforme mostra o Gráfico 34 para o substrato glicose o valor de CMC fica ou entre 0,7 e 1 g/L. Oliveira (2014) obteve resultados semelhantes utilizando glicose como substrato e a bactéria *Bacillus pumilus* tendo um resultado que varia ou entre 0,5 e 1 g/L.

De acordo com o estudo realizado por Bueno (2008) onde utilizou como substrato sacarose e caldo de cana com a bactéria *Bacillus sp* obteve-se um valor de 27-37 mg/L de CMC.

No Gráfico 35 observa-se que o valor de CMC foi o mais baixo e de acordo com Christofi & Ivshina (2002), quanto mais baixo for o valor de CMC mais eficiente é o biossurfactante produzido, portanto para o substrato talo de abacaxi obteve-se o menor resultado de CMC com o valor variando entre 0,2 e 0,4 g/L.

Para o substrato casca de abacaxi (Gráfico 36) o valor da CMC foi o mais alto e provavelmente se deve ao fato deste substrato ter apresentado valores inferiores de tensão superficial e produtividade quando se comparado com o substrato talo.

5.9 Determinação do efeito do biossurfactante para estabilização de um molho tipo francês

Foi determinado o efeito da adição do biossurfactante produzido por *Candida tropicalis*, sendo que o biossurfactante era uma proporção de 50 mL de biossurfactante produzido pela casca de abacaxi, 50 mL de biossurfactante produzido pelo talo de abacaxi e 50 mL de biossurfactante produzido pela glicose, em um sistema simulando um molho tipo francês, durante quatro meses. As formulações utilizadas se encontram na Tabela 10. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 10- Formulação do sistema utilizado para análise de índice de emulsificação, simulando um molho francês.

Ensaio	Ketchup(mL)	Vinagre(mL)	Óleo(mL)	Sal (gr)	Biossurfactante(mL)
1	2	4	4	1	0
2	2	4	4	1	2
3	2	4	4	1	4
4	2	4	4	1	6
5	2	4	4	1	8
6	2	4	4	1	10

Os resultados do índice de emulsificação no período de 10 minutos e 24 horas podem ser observados na Tabela 11

Tabela 11 – Índice de emulsificação dos ensaios realizados.

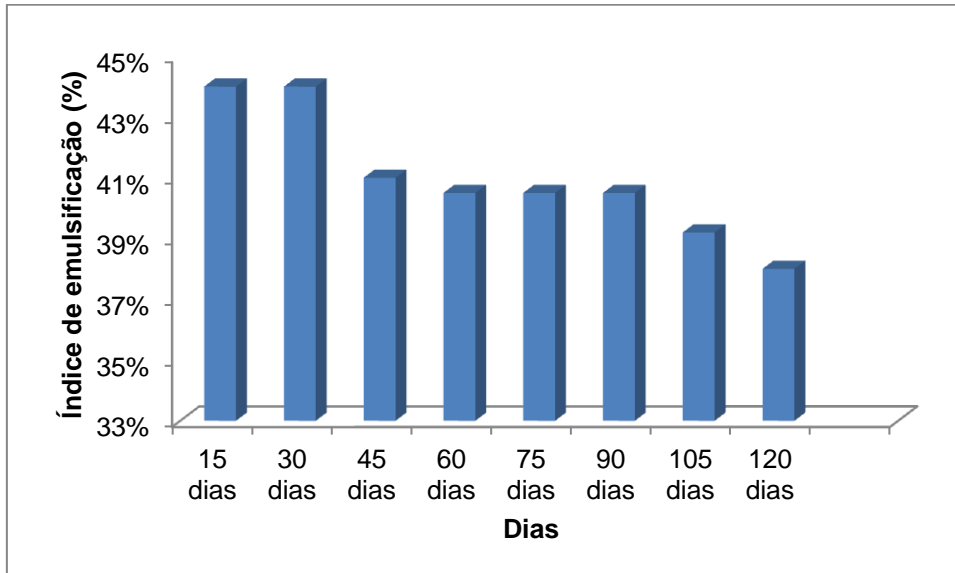
Ensaio	Índice de Emulsificação%	
	10 minutos	24 horas
1	não houve emulsificação	
2	não houve emulsificação	
3	20%	não houve emulsificação
4	45%	44,5%
5	25%	29%
6	16%	19%

As condições das análises realizadas foram temperatura ambiente (29 a 30°C), o pH dos ensaios eram próximos de 5,8.

Conforme mostrado na Tabela 11 nos ensaios 1 e 2 não apresentaram índice de emulsificação, tendo em vista que no primeiro não foi adicionado biossurfactante e no segundo foram adicionados apenas 2 mL, o que nos mostra que a quantidade de biossurfactante na mistura era pouca. No ensaio três houve emulsificação, mas apenas nos primeiros minutos e depois de 24 horas já não havia mais emulsificação. O quarto ensaio foi o que teve melhor desempenho tendo um índice de emulsificação de 45% e mantendo-se estável após 24 horas. Os ensaios 5 e 6 apresentaram resultados abaixo do esperado havendo variação dos primeiros minutos para 24 horas.

As análises de 15 em 15 dias durante 4 meses foram realizadas apenas com o ensaio 4, já que este mostrou melhor resultado quanto ao índice de emulsificação. O resultado para essa análise está mostrado no Gráfico 37.

Gráfico 37- Determinação da estabilidade da emulsão do molho tipo francês por 120 dias



De acordo com o Gráfico 37 pode-se observar que depois dos 45 dias houve uma redução de 44% para 41%, e a partir daí o índice de emulsificação começou a cair a cada leitura, porém muito pouco, considerando assim que essa mistura mostrou-se eficaz em estabilizar a emulsão.

Em um estudo realizado por Silva (2016), foi possível observar a formação de uma emulsão alimentícia do tipo óleo/água utilizando o biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica*, em uma proporção 1:1, porém não manteve a estabilidade do sistema após 24 Horas, sendo que a maior estabilidade nesse estudo foi de 7 dias usando o biossurfactante produzido, goma xantana e maltodextrina.

5.10 Separação do biossurfactante

Para separação do biossurfactante, foram utilizadas apenas as fermentações obtidas com concentração 4% e 10 horas de incubação, já que, essas foram as condições para a melhor produção do biossurfactante. Para isso, o sobrenadante livre de células foi precipitado com etanol na concentração 1:2 a 4°C. O biossurfactante foi seco em estufa à vácuo a 45°C. Os resultados mostraram que para o substrato talo a produção foi de 7,56 g/L em 10 horas de fermentação, já para a casca a produção foi de 5,23 g/L o que indica que a quantidade de açúcares fermentescíveis usada para produzir biossurfactante foi inferior ao talo.

Em um estudo realizado por Silva et al (2016), onde se analisou a produção de biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* foi utilizado para precipitação do biossurfactante o etanol em uma proporção de 5:1 obtendo-se a maior extração de biossurfactante no valor de 7,04 g/L.

Santos et al (2018), em seu estudo de produção de biossurfactantes utilizando diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*, observou que com o substrato suco de caju como fonte de carbono a produtividade máxima foi de 0,178g/L em uma hora de produção. O que mostra que nossos resultados estão dentro dos parâmetros de outros estudos, mostrando-se eficaz a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis*.

6. CONCLUSÕES

- A casca e o talo do abacaxi se mostraram bons substratos para a produção de biossurfactantes pela levedura *Candida tropicalis*.
- A hidrólise com 2,5% e 15 minutos de autoclave foi a mais eficiente para a fermentação.
- A desintoxicação realizada para eliminar inibidores da fermentação foi eficaz, tendo em vista que, após a desintoxicação, a quantidade de compostos fenólicos diminuiu.
- A análise de índice de emulsificação mostrou que o substrato talo de abacaxi foi o mais eficiente, mantendo-se estável após 24 horas.
- As atividades emulsificantes da casca e talo de abacaxi e glicose na concentração 4 e 5 % obtiveram resultados semelhantes com 10 horas de fermentação, portanto a escolha foi 4% tendo em vista o quesito industrial e econômico.
- A tensão superficial mostrou diferentes resultados, pois esta variou em relação ao substrato, a melhor redução foi para o substrato glicose reduzindo a tensão superficial da água de 72 mNm^{-1} para 28 mNm^{-1} na concentração 4 e 10 horas de fermentação.
- A CMC de todos os substratos se manteve abaixo de 2g/L, sendo que para o talo de abacaxi obteve-se o menor valor sendo ele (0,2 a 0,4 g/L).
- O biossurfactante produzido foi eficaz para manter a estabilidade do sistema semelhante a um molho francês no período de 120 dias analisados.
- A produção do talo foi de 7,56 g/L em 10 horas de fermentação e 4%, já para a casca foi de 5,23 g/L com os mesmos parâmetros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono.** Dissertação de Mestrado, 2010, 89 f. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de ciências agrárias e veterinárias câmpus de Jaboticabal, 2010.

AGEITEC- Agência Embrapa de Informação Tecnológica. *Árvore do Conhecimento: Frutas Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>>.*

Acesso em: 15 de ago. 2018.

ALMEIDA D. G; et al. **Utilização de planejamento experimental na Produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais.** Trabalho apresentado ao Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, 2014.

ANTUNES, A. A. **Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *Chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo.** Tese de Doutorado, 2010, 222 f. Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

AQUINO, P. L. M. **Produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus velezensis* utilizando resíduos agroindustriais como substrato.** Dissertação de Mestrado, 2011, 82 f. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2011.

ARAGÃO, V. O. et al. **Leveduras degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 57., 2007. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2007.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 53: 495-508, 2000.

BARROS, L. M. **Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases.** Tese de Doutorado, 2005, 133 f. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

BOGNOLO, G. **Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons.** Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 152, p. 41-52, 1999.

BORGES, M. R. **Síntese enzimática de ésteres de açúcar: surfactantes e polímeros como novos materiais ambientalmente seguros.** Tese de Doutorado, 2007, 185 f. Universidade federal do rio grande do norte centro de ciências exatas e da terra programa de pós-graduação em ciência e engenharia de materiais, 2007.

BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; DA SILVA, S. S. **Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America.** Industrial Biotechnology, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo.** Tese de Doutorado, 2008, 99 f. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, 2008.

CALVO, C. et al. Application of bioemulsifiers in soil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CAMPOS, F. M; FIGUEIREDO, A.R; HOGG, T. A; COUTO, J. A. Effect of phenolic acids on glucose and organic acid metabolism by lactic acid bacteria from wine. **Wine Microbiology**, v. 26, p. 409–14, 2009.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Journal Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, p. 67-72, 2004.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COMASSETO, J.V. A reunião da Química e da Biologia. In: MARSAIOLI, A. PORTO, A.L. (Org). **Biocatálise e Biotransformação Fundamentos e Aplicações**. Salto: Schoba, 2010, v. 1.

DAMIÃO, A. O. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos**. Dissertação de Mestrado, 2012, 74 f. Universidade Federal da Bahia, 2012.

DARVISHI, P. et al. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by efficient microbial consortium, ERCPP1-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.84, n.2, p. 292-300, 2011.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resourcesto microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, n.7, p. 641-646, 2004.

DESAI, J.D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47. 1997.

DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J.,REBERS P.,& SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, p. 350-356, 1956.

EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. Dissertação de Mestrado, 2015, 96 f. Universidade Estadual de Campinas, 2015.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.

Abacaxi: Produção e aspectos técnicos, 2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.com.br>>.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. Dissertação de Mestrado, 2012, 105f. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química e Sociedade**, São Paulo, vol. 39, nº 3, p. 228-236, 2016.

FELSE, P.A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 40: 316-323, 2007.

FERREIRA, L. C. **Aspectos microbiológicos da conservação de polpas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Qualidade, higiene, adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microrganismos com potencial para bioconservação**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, MG, 110 f, 2007.

FONTES, G. C.; AMARAL P. F. F. E COELHO, M, A, Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, p. 2091 -2099, 2008.

FOX, S.; BALA, G. A. **Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates**. *Bioresource Technology*, n. 75, p. 235-240, 2000.

GOUVEIA, E. R. et al. Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento**, Pernambuco, n. 30, p. 39-45, Jun. 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio3>>. Acesso em: 02 out. 2016.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:
<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf> Acesso em: 29 de nov. 2017.

IJAH, U. J. J. **Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil.** Waste Management, n. 18, p. 293-299, 2000.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.

JAMAI, L. et al, Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 34, 2001.

JOSHI, S. et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 1, p. 195-199, 2007.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants). Current opinion in **Colloid & Interface Science**, v.7, p. 12-20, 2002.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D., **Microemulsion-based media as novel drug delivery systems**, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 45, 89-121, 2000.

LUNA, J.N.; RUFINO, D.R.; SARUBBO, L.A.; TAKAKI, G.M.C. **Produção de Biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar.** *Exacta*. 6: 209-215, 2008.

MARCELINO, P. R. F. **Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado, 2016, 157 f. Universidade de São Paulo, 2016.

MARQUES, N. S. A. **Produção, caracterização e aplicação de biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP/WFCC 0001.** Dissertação de Mestrado, 2017, 118 f. Universidade católica de Pernambuco, 2017.

MNIF, I.; et al. **Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*.** Environmental Science and Pollution Research, v. 23, p. 6690-6699, dez. 2015.

MONSALVE, J. F.; PEREZ, V. I. M.; COLORADO, A. A. R. **Producción de etanol a partir de La cáscara de banana y almidón de yuca, Dyna**, ano 73, n. 150, p. 21-27, 2006.

MORAES, R.K.S. **Produção de biossurfactantes a partir de substratos de baixo custo.** Dissertação de Mestrado, 2012, 132f. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

MOURA, C. L. **Estudo da solubilização da griseofulvina em micelas dos brijs 78, 98, 700.** Dissertação de Mestrado, 75 f. 2017. Universidade Federal do Ceará, 2017.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

NEILSON, J.W.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **J. Environ. Qual.** 32: 899-908, 2003.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 153, n. 2, p. 375–380, 1944.

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

OLIVEIRA, J. G. **Utilização de melão, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo.** Tese de Doutorado, 2014, 98f. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos.** Dissertação de Mestrado, 2008, 95f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. , p. 25-33, 2000.

PARKINSON, M. Bio-surfactants. **Biotechnology Advances**, New York, v. 3, n. 1, p. 65-83, 1985.

PATTANA, L.; THANI, A.; Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresou. Technol**, v. 101, p. 1036-1046, 2010.

PEREIRA, M.B; MENDES, T.P.P; SEOLATTO, A. A. **Produção de bioetanol a partir de resíduos da indústria de suco.** X congresso de engenharia química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.

PIRÔLLO, M. P. S. et al. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated. **Journal of applied microbiology**, v. 105, p. 1484-1490, 2008.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications, **Biodegradation - Life of Science**, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, 2013, v. 01, p. 1-370, 2013.

RIBEAUX, D. R. **Potencial biotecnológico da nova linhagem de *Candida tropicalis* isolada de sedimentos de mangue na produção de biossurfactante.** Dissertação de Mestrado, 78 f. 2016. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

ROCHA, P. M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato.** Dissertação de Mestrado, 116f. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas sp.* Isolated from sugarcane juice. **Biotechnonology Letters**, Dordrecht, v. 8, p. 745-748, 1986

ROGÉRIO, M.C.P.; et al. **Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus*) em dietas para ovinos: consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 3, p. 773-781, 2007.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 17, p. 73, 2014.

SANTOS, S.F.M.. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502p., João Pessoa, Paraíba.

SANTOS, F. K. G.; et al. **Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo.** IV PDPETRO, p. 21-24. Campinas, 2007.

SARUBBO, L. A.; FARIA. **Co-Utilization of Canola Oil and Glucose on the Production of a Surfactant by *Candida lipolytica*** Current Microbiology. 54, 68-73, 2007

SARUBBO, L. A., et al. **Scale up de produção de biossurfactante por *Candida tropicalis* e aplicação na remoção de metais pesados.** Trabalho apresentado ao Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 127-144, 2010.

SEOLATTO, A.; et al. **Comparação no rendimento de pré-tratamentos na hidrólise do bagaço de abacaxi para produção de biocombustíveis.** XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, 2014.

SILVA, R.C.F.S.; et al. **Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills.** Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 12523–12542, 2014.

SILVA, K. A.; FONTES, G.C, COELHO, M.A.Z. **Avaliação de diferentes métodos de extração do Biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica*.** Trabalho apresentado ao Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Universidade de Pernambuco, 2016.

SILVA, O.O. **Aproveitamento do bagaço de abacaxi (*Ananas comosus*) para produção biotecnológica de xilitol.** Tese de Doutorado, 2011, 121 f. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SINGH, A., VAN HAMME, J.D. And Ward, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-122, 2007.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19–23, 1952.

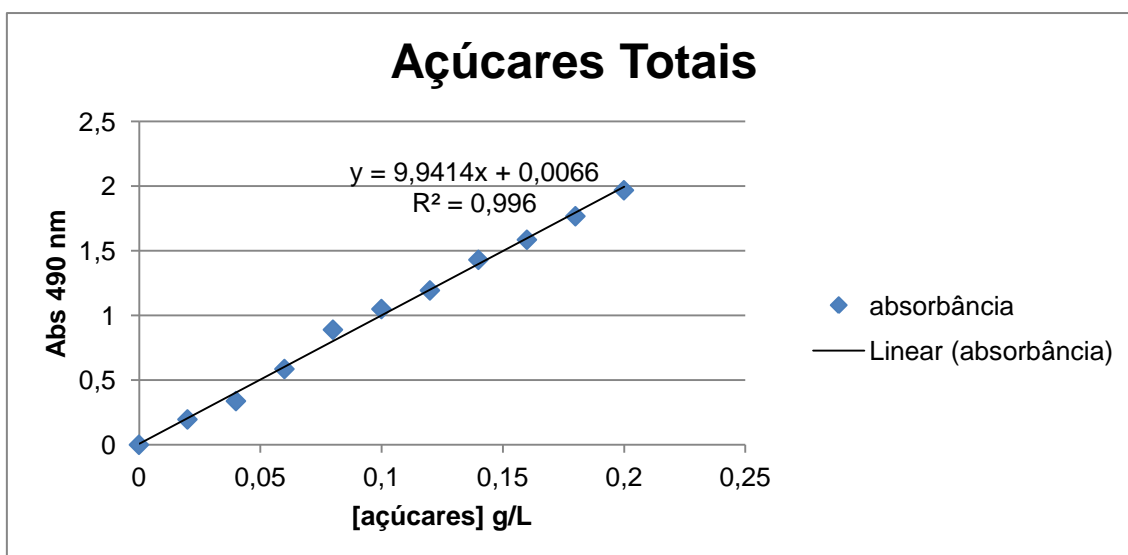
SOUSA, J. R.; et al. Cinética e caracterização de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 utilizando glicerol como fonte de carbono. **Química Nova**. São Carlos, v. 37, n. 3, p. 431-441, 2014.

VERA, E. C. S. **Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades.** Tese de doutorado, 2017, 132 f. Universidade de São Paulo, 2017.

APÊNDICE A - Concentração de glicose e absorvância (490 nm) para padronização da curva padrão de açúcares totais.

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorvância
0,02	0,196
0,04	0,338
0,06	0,586
0,08	0,89
0,1	1,05
0,12	1,194
0,14	1,431
0,16	1,586
0,18	1,768
0,2	1,969

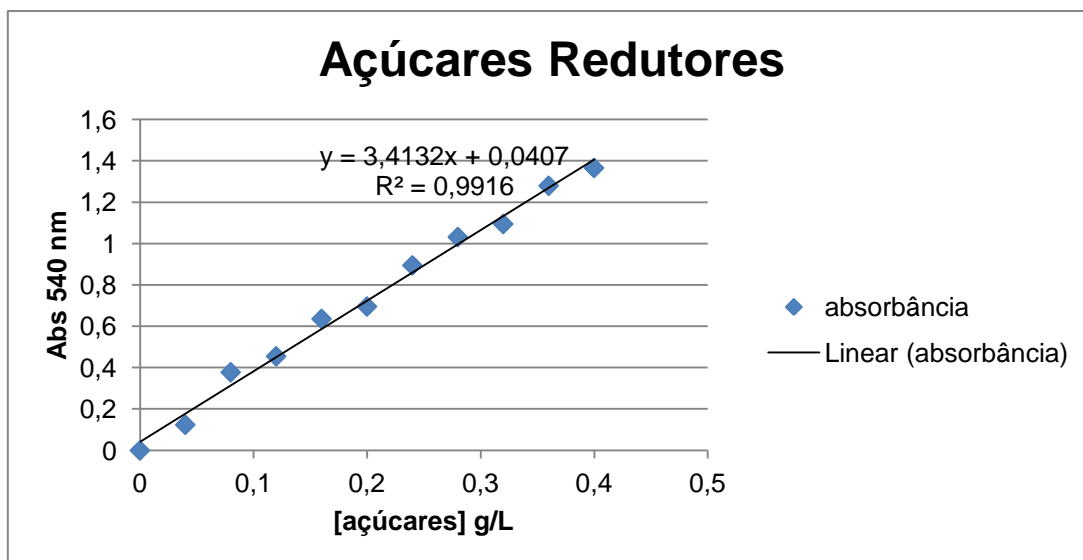
APÊNDICE B - Curva padrão para açúcares totais.



APÊNDICE C - Concentração de glicose e absorvância (540 nm) para padronização da curva padrão de açúcares redutores.

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorbância
0,04	0,124
0,08	0,378
0,12	0,455
0,16	0,636
0,20	0,696
0,24	0,895
0,28	1,032
0,32	1,095
0,36	1,28
0,4	1,366

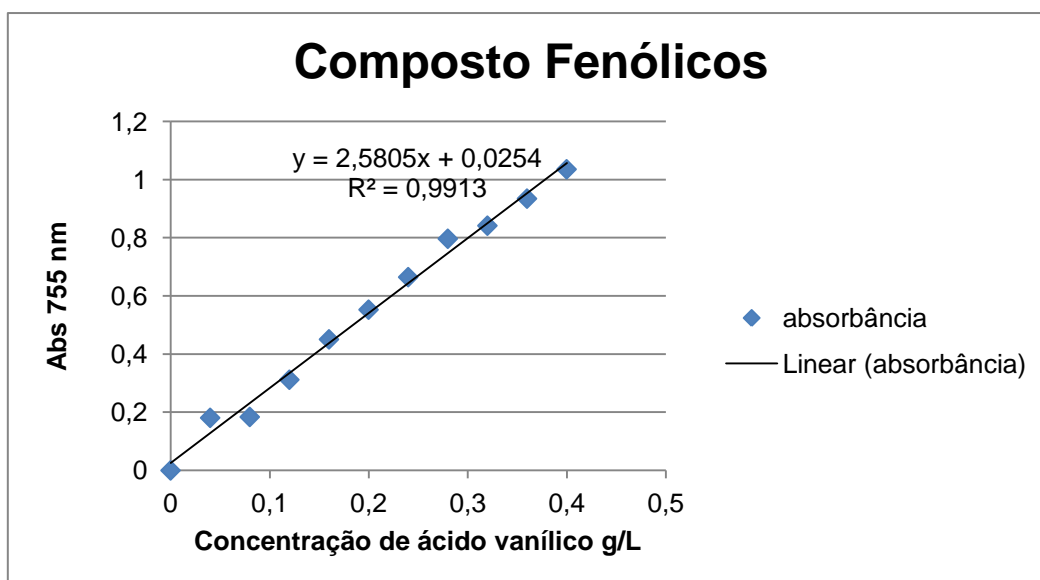
APÊNDICE D - Curva padrão para açúcares redutores.



APÊNDICE E - Concentração de ácido vanílico e absorvância (750 nm) para padronização da curva padrão de compostos fenólicos.

Concentração de glicose (mg/mL)	Absorbância
0,04	0,181
0,08	0,184
0,12	0,312
0,16	0,451
0,20	0,553
0,24	0,665
0,28	0,797
0,32	0,842
0,36	0,935
0,4	1,036

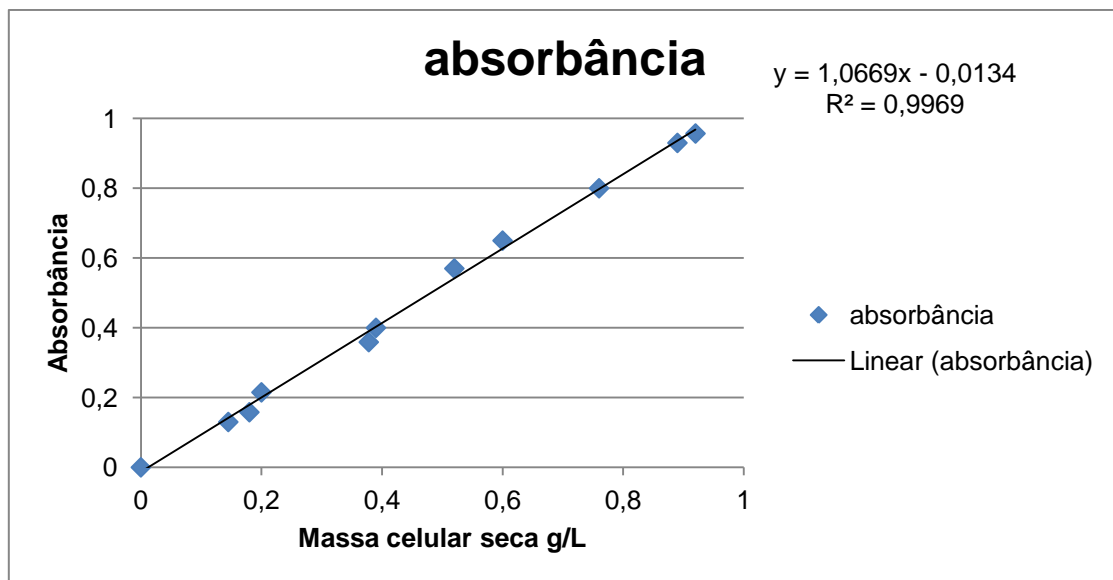
APÊNDICE F - Curva padrão compostos fenólicos.



APÊNDICE G - Peso celular da levedura (g/L) e absorvâncias determinadas na obtenção da curva do crescimento de *Candida tropicalis*.

Peso celular (g/L)	Absorbância (nm)
0	0
0,145	0,13
0,18	0,158
0,2	0,215
0,378	0,359
0,39	0,4
0,52	0,57
0,6	0,65
0,76	0,8
0,89	0,93
0,92	0,957

APÊNDICE H - Curva Padrão de glicose para crescimento da *Candida tropicalis*



TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/_____/____

Assinatura do autor