



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS – CCT
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

JAQUELINE PEREIRA SALGADO

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *SERRATIA MARCESCENS*
UCP 1549 UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS E SUBSTRATOS
DE BAIXO CUSTO

CAMPINA GRANDE – PB

2013

Jaqueline Pereira Salgado

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *SERRATIA MARCESCENS*
UCP 1549 UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS E SUBSTRATOS
DE BAIXO CUSTO**

Trabalho de Conclusão de Curso, submetida ao Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba UEPB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo

CAMPINA GRANDE – PB

2013

S164p Salgado, Jaqueline Pereira.

Produção de biossurfactante por *Serratia Marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo [manuscrito] / Jaqueline Pereira Salgado. – 2013.

45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologias, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo, Departamento de Química Industrial”.

1. Biossurfactantes. 2. Potencial biotecnológico. 3. Resíduos oleosos. I. Título.

21. ed. CDD 579.3

Jaqueline Pereira Salgado

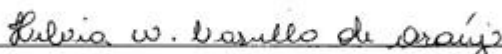
**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *SERRATIA*
MARCESCENS UCP 1549 UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS
E SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO**

Trabalho de Conclusão de Curso, submetido ao Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito do cumprimento às exigências para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

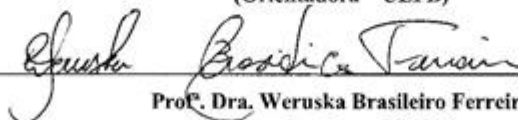
Julgado em: 29/08/2013

Nota: 10,00 (dez)

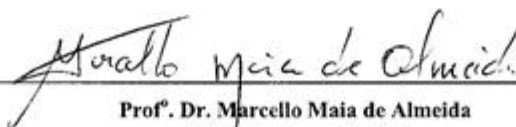
Examinadores



Prof.^a Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo
(Orientadora – UEPB)



Prof.^a Dra. Weruska Brasileiro Ferreira
(Examinadora – UEPB)



Prof.^o Dr. Marcello Maia de Almeida
(Examinador – UEPB)

Dedico este trabalho a minha irmã/mãe Stelamar pelo investimento, compreensão, carinho e dedicação em mais uma etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho, e me concedeu força e coragem durante esta caminhada.

A minha família pelo investimento, apoio, compreensão e carinho.

Ao meu amado esposo, Almir Alves, que de forma especial e amorosa me apoiou nos momentos difíceis, pelo seu companheirismo e amor.

As minhas amigas muito especiais Isaura e Tamires, pelos momentos de alegria, pelos conselhos, pela compreensão, enfim por tudo que compartilhamos nesses anos. E a todos os amigos da turma (Hélio, Kenny, Ítalo, Gigliolly).

Ao meu amigo de laboratório Thiago, pelas distrações, auxílio nas análises e amizade.

A todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial a Profa. Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo responsável pela realização deste trabalho. Pela sua atenção, paciência, amizade e incentivo.

A minha querida Profa. Dra. Weruska Brasileiro pelo exemplo de profissionalismo, brincadeiras, motivação e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maia e a Rosileide pela ajuda no planejamento estatístico.

Enfim, obrigada a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indiretamente nessa etapa importante da minha vida.

SALGADO, Jaqueline Pereira. **Produção de biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo.** Campina Grande, UEPB, 2013, 40 p. (Monografia para Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental).

RESUMO

Com o crescimento industrial, há uma tendência em aumentar a poluição devido aos efluentes gerados por esta, aos quais incluem o petróleo e seus derivados, favorecendo o aumento dos resíduos oleosos emitidos. Assim, os estudos dos microrganismos capazes de remediar estes impactos estão crescentes, pois estes são biodegradáveis e não são tóxicos. Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais produzidos por microrganismos, classificados de acordo com sua composição química ou origem microbiológica. No presente trabalho, analisou-se a capacidade de emulsificação e de redução de tensão superficial do biossurfactante produzido pela bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549 em meio contendo, manípueira, glicose e óleo vegetal. A bactéria foi obtida junto ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco. De acordo com o planejamento fatorial proposto, os meios foram formulados e utilizados para a produção do biossurfactante e incubados à 28°C a 155rpm, durante 72h. O biossurfactante produzido foi avaliado pelas medidas de tensão superficial, índice e atividade de emulsificação utilizando substratos hidrofóbicos (óleo pós-fritura, de coco e dendê). Os melhores resultados de tensão superficial, índice e atividade de emulsificação foram observados na utilização do óleo pós-fritura. Os valores foram de 87,5 a 100% e variação entre 1,7 a 5,0 UEA para índice e atividade de emulsificação respectivamente e redução da tensão superficial de 61,83% observado no ponto central do planejamento experimental. Os resultados apresentados mostram que a bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549 foi capaz de produzir um biossurfactante com capacidades emulsificantes e tensioativas nas condições estudadas com aplicação em processos industriais e ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: *Serratia marcescens*. Biossurfactante. Tensão Superficial.

SALGADO, Jaqueline Pereira. **Biosurfactant production by *Serratia marcescens* 1549 UCP using industrial waste and low-cost substrates.** Campina Grande, UEPB, 2013, 40 p. (Monograph for Graduate Environmental and Sanitary Engineering).

ABSTRACT

With the growth of the industry, there is a trend of increasing pollution due to effects generated by this one, which include oil and derivatives, favoring to increase of oily waste issued. Thus, studies of microorganisms capable of remedying these impacts are increasing because they are not toxic and biodegradable. The biosurfactants are a major class of natural surfactants produced by microorganisms classified according to their chemical or microbiological origin. In this paper, we analyze the emulsifying capacity and reduction of surface tension of the biosurfactant produced by bacterium *Serratia marcescens* CUP 1549 in culture medium containing cassava, glucose and vegetable oil. The bacterium was obtained from the Stock of Cultures Center Research in Environmental Sciences of the Catholic University of Pernambuco. According to the proposed factorial design, the culture medium was developed and used for the production of biosurfactants and incubated at 28° C to 155 rpm for 72h. The biosurfactant produced was assessed by measures of surface tension, emulsification index and emulsification activity using hydrophobic substrates (soybean oil after frying, coconut and palm oil). The best results of surface tension, emulsification index, and emulsification activity were observed in the use of post-frying soybean oil. The values were 87,5 to 100% and variation between 1,7 to 5,0 UEA for index and emulsification activity respectively and surface tension reduction of 61.83% observed in the central point of the experimental design. The results show that the bacterium *Serratia marcescens* was able to produce biosurfactants with capabilities emulsifying and surfactants under the conditions studied with application in industrial and environmental processes.

Keywords: *Serratia marcescens*. Biosurfactant. Surface tension.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - Cultivo de <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 em ágar Luria Bertani (LB)..... | 20 |
| FIGURA 2 - Gráfico do índice de emulsificação % (72 horas, a 28°C e 155rpm)..... | 28 |
| FIGURA 3 - Gráfico de atividade de emulsificação (U.A.E.) (72 horas, a 28°C e 155rpm)..... | 29 |
| FIGURA 4 - Diagrama de Pareto para avaliação do efeito das variáveis: A - Índice de emulsificação (%) ; B - Atividade de Emulsificação (U.A.E.); C - Tensão Superficial (mN/m) (óleo de coco, 72 h a 28 °C e 155 rpm)..... | 31 |
| FIGURA 5 - Diagrama de Pareto para avaliação do efeito das variáveis: A - Índice de emulsificação (%) ; B - Atividade de Emulsificação (U.A.E.); C - Tensão Superficial (mN/m) (substrato óleo de dendê, 72 h a 28 °C e 155 rpm)..... | 32 |
| FIGURA 6 - Valores preditos em função dos valores observados para a Atividade emulsificação (U.A.E.) utilizando óleo de coco como substrato..... | 32 |
| FIGURA 7 - Valores preditos em função dos valores observados para a Índice Emulsificação (%) utilizando óleo de coco como substrato..... | 33 |
| FIGURA 8 - Diagrama de Pareto para avaliação do efeito da variável Tensão Superficial (mN/m) (óleo de pós-fritura , 72 h a 28 °C e 155 rpm)..... | 34 |
| FIGURA 9 - Diagrama de Pareto para avaliação do efeito da variável Índice de Emulsificação (substrato óleo de pós-fritura, 72 h a 28 °C e 155 rpm)..... | 35 |
| FIGURA 10 - Diagrama de Pareto para avaliação do efeito da variável Atividade de Emulsificação (U.A.E.) (óleo de pós-fritura, 72 h a 28 °C e 155 rpm)..... | 36 |
| FIGURA 11 - Superfície de resposta da redução da tensão superficial (mN/m) em função da glicose e manipueira (A), e em função do óleo pós-fritura e manipueira (B) (óleo pós-fritura, 72 h a 28 °C e 155 rpm)..... | 37 |
| FIGURA 12 - Gráfico da Redução da Tensão Superficial..... | 38 |
| FIGURA 13 - Teste de estabilidade do biossurfactante pela redução da tensão superficial (mN/m) em função das variações de pH (A), concentração de NaCl (%) (B) e temperatura (°C) (C) com o líquido metabolito do experimento com óleo pós-fritura..... | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos | 5 |
| TABELA 2 - Composição química da manipueira..... | 24 |
| TABELA 3 - Valores codificados das variáveis independentes do planejamento DCCR..... | 24 |
| TABELA 4 - Matriz codificada do planejamento experimental do tipo DCCR..... | 25 |
| TABELA 5 - Resultado do processo de fermentação da <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 (72 horas a 28 °C e 155 rpm) com óleo pós- fritura..... | 25 |
| TABELA 6 - Resultado do processo de fermentação da <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 (72 horas a 28 °C e 155 rpm) com óleo de coco..... | 26 |
| TABELA 7 - Resultado do processo de fermentação da <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 (72 horas a 28 °C e 155 rpm) com óleo de dendê..... | 27 |
| TABELA 8: Valores da tensão superficial decorrente do teste de estabilidade do biossurfactante pela redução da tensão superficial (mN/m)..... | 39 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 3.1 TENSÃO SUPERFICIAL | 14 |
| 3.2 SURFACTANTES E BIOSURFACTANTES | 14 |
| 3.3 SUBSTRATOS RENOVÁVEIS | 17 |
| 3.3.1 Manipueira | 17 |
| 3.3.2 Óleo Pós-Fritura | 18 |
| 3.3.3 Óleo de Dendê | 19 |
| 3.3.4 Óleo de Coco | 19 |
| 3.4 <i>SERRATIA MARCESCENS</i> | 20 |
| 4 METODOLOGIA | 22 |
| 4.1 MATERIAIS | 22 |
| 4.1.1 Micro-Organismo | 22 |
| 4.1.2 Meio de Cultura e Condições de Cultivo | 22 |
| 4.1.3 Substratos | 22 |
| 4.1.4 Produção do Biosurfactante | 22 |
| 4.2 Métodos Analíticos | 23 |
| 4.2.1 pH | 23 |
| 4.2.2 Tensão Superficial | 23 |
| 4.2.3 Índice de Emulsificação | 23 |
| 4.2.4 Atividade de Emulsificação | 24 |
| 4.3 MÉTODOS ESTATÍSTICOS | 24 |
| 4.3.1 Planejamento Experimental do Tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) | 24 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 26 |
| 6 CONCLUSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A evolução da indústria trouxe a sociedade uma série de equipamentos para facilitar o transporte, alimentação, moradias mais confortáveis, entre outros benefícios, mas o outro lado do desenvolvimento da indústria está à degradação ambiental desenfreada. Um dos principais causadores desta poluição é o petróleo, que segundo o Atlas de Energia Elétrica do Brasil, seus derivados como gasolina e óleo diesel passaram a ser usados como combustível para os meios de transporte, fazendo com que a substância rapidamente se transformasse na principal fonte da matriz energética mundial. Outros derivados, como a nafta, passaram a ser aplicados como insumo industrial na fabricação de produtos bastante diversificados como materiais de construção, embalagens, tintas, fertilizantes, farmacêuticos, plásticos, tecidos sintéticos, gomas de mascar e batons, estando presente em todo setor industrial.

Devido à poluição ambiental resultar em danos a saúde humana e, reduzir os recursos naturais responsáveis pela manutenção da vida, houve uma evolução no pensamento sobre este fato, e assim há uma maior valorização da biotecnologia para prevenir e reparar os efeitos da poluição industrial, e ainda a pressão das leis ambientais faz com que segundo afirma Cortez e Roberto (2008) “O interesse industrial por tecnologias alternativas aos processos químicos convencionais vem aumentando gradativamente em diversas áreas, com vistas à obtenção de alternativas limpas para o desenvolvimento de produtos e processos”.

Um dos métodos bastante utilizados na remediação em casos de derrames de petróleo é a aplicação de surfactantes químicos, que de acordo com Mulligan (2005), são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface diminuindo, assim, a tensão superficial e interfacial dos líquidos; estes são constituídos por uma porção hidrofóbica e um grupo hidrofílico, sendo conhecidos também por substâncias anfifílicas. Como a maioria dos surfactantes utilizados são fabricados a partir de derivados do petróleo, e causam danos ao meio ambiente, há uma ascensão na produção de biosurfactantes, os quais possuem as mesmas aplicações, e são produzidos por micro-organismos durante a metabolização de substâncias surfactantes. O que torna os biosurfactantes uma boa alternativa são suas características de biodegradabilidade, baixa toxicidade e aceitabilidade ecológica e habilidade de serem produzidas a partir de fontes renováveis e de baixo custo.

A conversão de resíduos para insumos representa um novo fluxo de produtos para o âmbito industrial, com o diferencial de serem produtos descartados em certas atividades e

transformados em matéria-prima (LUNA *et al.*,2009). Existem vários resíduos que podem ser utilizados para a obtenção do biossurfactante, como manipueira, milhocina, parafina, soro de leite, óleo pós-fritura, entre outros, estes são opções de substratos baratos e de fácil acessibilidade.

Muitas espécies de bactérias produzem biossurfactantes, além de fungos e leveduras. Neste estudo foi investigado o potencial biotecnológico da bactéria *Serratia marcescens* UCP1549 na produção de biossurfactante utilizando rejeitos industriais como meio de baixo custo e também analisar a capacidade do metabólito secundário sintetizado em reduzir a tensão superficial e de formar emulsões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o potencial biotecnológico da *Serratia marcescens* UCP1549 na produção de biossurfactante utilizando meio de cultivo de baixo custo constituído por rejeitos industriais e óleos vegetais *in-natura*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando os resíduos industriais e óleos vegetais *in-natura*, através do planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Avaliar a eficiência do biossurfactante através de análises de redução de tensão superficial, índice e atividade de emulsificação;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido utilizando diferentes níveis de pH, salinidade e temperatura.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TENSÃO SUPERFICIAL

As moléculas na superfície de um líquido estão sujeitas a fortes forças de atração das moléculas interiores. A resultante dessas forças, - cuja direção é a mesma de plano tangente à superfície (em qualquer ponto desta) - atua de maneira a que a superfície líquida seja a menor possível. A grandeza desta força, atuando perpendicularmente (por unidade de comprimento) ao plano na superfície é dita tensão superficial. A superfície ou interface onde a tensão existe está situada entre o líquido e seu vapor saturado no ar, normalmente a pressão atmosférica. “A tensão pode também existir entre dois líquidos imiscíveis, sendo então chamada de tensão interfacial”. (SHAW, 1975).

Os tensoativos quando em solução, devido à presença do grupo lipofílico, ocupam preferencialmente a superfície do líquido, diminuindo a força de coesão entre as moléculas do solvente e, conseqüentemente, diminuindo a tensão superficial. (BEHRING, 2004). Com a redução da tensão superficial, têm-se os efeitos molhante, espalhante e penetrante e maior velocidade de absorção e/ou translocação (IOST e RAETANO, 2010).

A eficácia dos surfactantes é definida através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para superfície. (MULLIGAN, 2005).

3.2 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfipáticas que constituem em duas porções: uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica em uma mesma molécula (BEZERRA, 2012), onde o domínio hidrofóbico incide em um hidrocarboneto, enquanto que a parte hidrofílica pode ser não iônica, iônica (catiônica ou aniônica) ou anfotérica. (BEZERRA *et al.*, 2012). Esta característica permite que ocorra a redução da tensão superficial (água/ar) e interfacial (água/óleo) em fluídos, e faz com que os surfactantes sejam adequados para um grande número de aplicações industriais, como, por exemplo: detergentes, emulsificantes, lubrificantes, agentes espumantes e agentes umidificadores na solubilização e na dispersão de fases. (BUGAY, 2009).

Biossurfactantes são compostos derivados do metabolismo de alguns microorganismos, que possuem propriedades surfactantes. Estes compostos possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis. Outra vantagem sobre a utilização dos biossurfactantes reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo (SANTOS *et al.*, 2010), e ainda possuem estabilidade em extremos de pH, temperatura e salinidade.

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem os processos de biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, a remoção e mobilização de resíduos de óleo de tanques de armazenamento e a recuperação melhorada de petróleo. (MORAIS e ABUD, 2012).

Os biossurfactantes são classificados em dois principais grupos: aqueles que reduzem a tensão superficial da interface ar/água, conhecidos como biossurfactantes e aqueles que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, ou ainda atuam em interfaces sólido/líquido, os bioemulsificantes. Geralmente os biossurfactantes exibem a capacidade de emulsificar, mas nem sempre os bioemulsificantes reduzem a tensão superficial. (FREITAS *et al.*, 2009).

Uma grande variedade de grupamentos químicos ou componentes faz com que se tenha um grande número de tipos de biossurfactantes estruturalmente diferentes. Entre os grupos mais importantes temos: lipopeptídeos e lipoproteínas, glicolipídios (ramnolipídios, trealopídios e sorfolipídios), fosfolipídios, ácidos graxos neutros, materiais particulados e polímeros (Tabela 1) (MUTHUSAMY *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos.

| Tipo De Biossurfactante | Micro-organismo |
|---|---|
| Glicolipídeos | |
| -ramnolipídeos | <i>Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas sp</i> |
| -soforolipídeos | <i>Torulopsis, T. apícola</i> |
| -treololipídeos | <i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp, Nocardiaerythropolis</i> |
| Lipopeptídeos e lipoproteínas | |
| -Peptídio-lipídeo | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| -Viscosina | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| -Serravetina | <i>Serratia marcescens</i> |
| - Subtilisina | <i>Bacillus subtilis</i> |
| -Surfactina | <i>Bacillus subtilis</i> |
| -Gramicidina | <i>Bacillus Brevis</i> |
| -Polimixina | <i>Bacillus polymyxa</i> |
| Ácidos Graxos, lipídeos neutros e fosfolipídicos | |
| -Ácidos graxos | <i>Coryne bacteriumlepus</i> |
| - Lipídeos neutros | <i>Nocardia erythropolis</i> |
| -Fosfolipídeos | <i>Thiobacillus thiooxidans</i> |
| Biossurfactantes poliméricos | |
| -Emulsan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| -Biodispersan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| -Liposan | <i>Candida lipolytica</i> |
| -Carboidrato-lipídeo-proteína | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| -Manana-lipídeo-proteína | <i>Candida tropicalis</i> |
| Surfactantes particulados | |
| -Vesículas | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| -Células | Várias bactérias |

Fonte: Muthusamy, *et al.*, 2008.

Os lipopeptídeos produzidos por diferentes espécies do gênero *Bacillus* são particularmente interessantes devido a sua alta eficiência como agentes tensioativos, alguns também apresentando atividade antimicrobiana. (LIMA, 2007).

3.3 SUBSTRATOS RENOVÁVEIS

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Estes substratos podem ser obtidos em rejeitos industriais.

Os resíduos líquidos gerados pelas indústrias químicas e de alimentos apresentam grande complexidade física e química, o que dificulta seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados (CERQUEIRA e COSTA, 2009). Logo, a reutilização desses rejeitos traz benefícios tanto para a redução do valor de produção do biossurfactante, quanto para as indústrias que diminui gastos com o tratamento do resíduo para destinação ambientalmente correta, como exige as legislações ambientais. Outro fator importante é a utilização dos óleos vegetais, pois são substratos renováveis, de fácil cultivo no Brasil, e ecologicamente corretos.

3.3.1 Manipueira

A manipueira é o líquido extraído da mandioca quando ela é prensada no processo de fabricação da farinha. Tanto a mandioca quanto esse líquido contém ácido cianídrico, venenoso e nocivo à alimentação humana e animal. Devido a isso, muitos produtores de farinha despejavam a manipueira de forma concentrada e em grande quantidade em céu aberto, curso d'água, agredindo o meio ambiente com elevada carga de matérias orgânicas e ácido cianídrico. O produtor agindo assim está poluindo e também desperdiçando um líquido precioso. (EMBRAPA, 2013)

De acordo com Bezerra (2012), a manipueira é constituída por carboidratos, nitrogênio e diversos sais minerais que tornam este resíduo passível de ser aproveitado para o cultivo de micro-organismos. Além de favorecer na produção do biossurfactante, pode ser utilizado na fabricação de sabão, vinagre, e também pode desempenhar papel de adubo orgânico. A Tabela 2 apresenta a composição química da manipueira segundo Ponte (1992).

Tabela 2: Composição química da manipueira

| Componente | Quantidade (ppm) |
|--------------------|------------------|
| Nitrogênio (N) | 425,5 |
| Fósforo (P) | 259,5 |
| Potássio (K) | 1.863,5 |
| Cálcio (Ca) | 227,5 |
| Magnésio (Mg) | 405,0 |
| Enxofre (S) | 195,0 |
| Ferro (Fe) | 15,3 |
| Zinco (Zn) | 4,2 |
| Cobre (Cu) | 11,5 |
| Manganês(Mn) | 3,7 |
| Boro (B) | 5,0 |
| Cianeto (CN) | 42,5 |
| Cianeto total (CN) | 604,0** |

Fonte: Ponte , 1992, Valores médios de várias determinações **55,0 mg/l (em média)

3.3.2 Óleo Pós-Fritura

Os óleos e gorduras são, por definição, substâncias hidrofóbicas e podem ser de origem animal ou vegetal. O óleo vegetal, que é o que dá origem aos óleos de cozinha, pode ser obtido de várias plantas, ou sementes, como o buriti, mamona, soja, canola, girassol, milho, etc. Sua constituição química é composta por triglicerídeos, que são formados da condensação entre glicerol e ácidos graxos. A diferença entre gordura e óleo é tão somente seu estado físico, em que a gordura é sólida e o óleo é líquido, ambos a uma temperatura de até 20°C. (DABDOUB *et al*, 2006).

Os óleos vegetais são largamente e universalmente consumidos para a preparação de alimentos nos domicílios, estabelecimentos industriais e comerciais de produção de alimentos (MORÁS e SILVA, 2009). Esses óleos, após serem degradados termicamente, se descartados de maneira imprópria podem seguir alguns caminhos danosos ao meio ambiente, por exemplo: quando em contato com a água de rios e lagos, o óleo se concentra na superfície, criando uma barreira sobrenadante que dificulta a entrada de luz e oxigênio na água, sendo comprometida a base da cadeia alimentar aquática; quando em contato com o solo impermeabiliza-o impedindo que a água se infiltre, agravando o problema das enchentes, e inclusive pode atingir lençóis freáticos, poluindo a água; além de gerar graves problemas de higiene, mau cheiro e entupimentos nas redes de esgoto (GHESTI *et al.*, 2012), e ainda uma pequena quantidade de óleo polui uma grande quantidade de água, como por exemplo um litro de óleo de cozinha pode poluir cerca de 10.000 litros de água (DABDOUB *et al.* 2006).

Logo, o óleo usado pode ser reaproveitado na fabricação de sabão em pedra, detergente, tintas, biodiesel, na produção de biossurfactantes, entre outros, o transformando assim em produtos com maior valor agregado e reduzindo os impactos que este resíduo pode causar quando lançado no meio ambiente. Dessa forma, o ciclo reverso do produto pode trazer vantagens competitivas e evitar a degradação ambiental e os problemas que surgem no sistema de tratamento de água e esgotos. (GAIO *et al.*, 2010).

3.3.3 Óleo de Dendê

O dendezeiro, conhecido internacionalmente como palma-africana, palma-aceitera (nos países de língua espanhola) e palmier a huile (nos países de língua francesa) é uma espécie perene, tropical, de origem africana que expressa melhor seu potencial de produção em condições de temperatura média entre 24°C e 28°C, máxima 33°C e mínima não inferior a 18°C (CORDEIRO *et al.*, 2010).

O óleo de dendê possui também grande valor para a indústria química e de cosméticos, em virtude da existência de carotenoides (betacaroteno) em sua composição e por ter quantidades significativas de antioxidantes, podendo ser empregado na produção de sabão, sabonetes, detergentes, como componente de lubrificantes, óleos, glicerina e vários tipos de ácidos. Mais recentemente tornou-se excelente alternativa para a produção de biodiesel. (HOMMA *et al.*, 2001).

O dendê destaca-se por alcançar maior produção de óleo/ha (4 a 6 t de óleo); menor quantidade de área para plantio; adaptação a áreas já alteradas/degradadas de floresta, evitando novos desmatamentos; uso intensivo de mão-de-obra por ser perene (ciclo de 25 anos em média) e produzir o ano todo; ampla capacidade de armazenar carbono e assim elegível no âmbito do mecanismo do desenvolvimento limpo (Protocolo de Kyoto,1997) e ainda a oportunidade de incorporação ao processo produtivo de centenas de famílias de agricultores familiares. (ROCHA, 2007; VEIGA 2000; CORDEIRO *et al.*, 2010).

3.3.4 Óleo de Coco

O coco é o fruto da palmeira *Cocos nucifera* a qual se desenvolve em quase todas as regiões tropicais do globo. (CALLADO e DE PAULA JR, 1999).

Segundo FREMOND *et al* (1969), quando o coco é maduro, o albúmen contém cerca de 40% de óleo, 43% de água, 17% de substâncias secas (hidrato de carbono, proteínas, etc.) e pode ser consumido verde ou maduro. Quando se desidrata o albúmen este passa a se chamar de copa e o teor de óleo aumenta para cerca 63%, no Brasil chega a atingir 71%.

O ponto de fusão do óleo de coco oscila entre 23 e 26° C, e a densidade é de 0,925 a 15° C. Mas, sua característica marcante é o elevado índice de saponificação, de 250 a 260. Estas características se devem a composição de seus ácidos graxos, que em sua maioria são ácidos graxos saturados (91%) de baixo peso molecular. Assim, devido ao grande conteúdo de ácido láurico, o óleo de coco é também de grande interesse para indústria de sabão, pois possui boas propriedades espumantes. (CALLADO e DE PAULA JR, 1999).

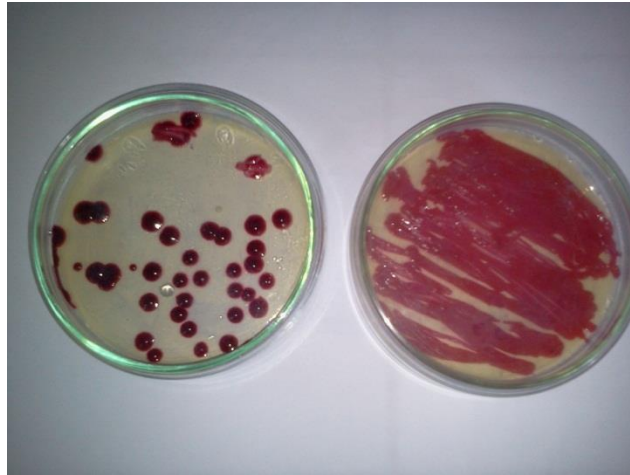
3.4 SERRATIA MARCESCENS

Serratia sp, um bacilo gram-negativo classificado como um membro da família Enterobacteriaceae (HEJAZI, 1997), distribuído amplamente na natureza, este gênero de micro-organismo, são encontrados no solo, água, plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de seres humanos e animais. (KONEMAN *et al*, 2001). E distingue-se pela produção de três enzimas: DNase, lipase e gelatinase. (ARAUJO, 2009).

S. marcescens é o membro mais importante desse gênero e é geralmente associado a uma variedade de infecção humana, em particular, pneumonia e septicemia, em pacientes com câncer reticulo endotelial que recebem quimioterapia. Às vezes, esse micro-organismo também provoca infecções do trato urinário e infecções em ferimentos. (KONEMAN *et al*, 2001). A Figura 1 apresenta o cultivo da bactéria *S. marcescens* UCP 1549 em meio de cultivo de ágar Luria Bertani (LB).

A *Serratia marcescens* é uma bactéria gram-negativa em forma de bastonete, com diâmetro que varia de 0,5-0,8 µm e 0,9-2,0 µm de comprimento, anaeróbio facultativo, de crescimento quimioautotrófico e geralmente, móveis devido ao flagelo peritriquio. (ARAUJO, 2009).

Figura 1: Cultivo de *Serratia marcescens* UCP 1549 em ágar Luria Bertani (LB)



FONTE: autora (2013)

O nome *Serratia* foi atribuído em memória ao físico Serafino Serrati, inventor da máquina a vapor em 1877, e *marcescens* vem do latim significando “macerado” devido ao aspecto mucoso que adquire as colônias velhas da bactéria (BENNET, 2000; LEDERMAN, 2003 *apud* ARAUJO 2009), a qual é produtora de numerosas substâncias, como enzimas, proteína e biossurfactante, entre outros produtos.

Neste sentido, dentre os vários insumos de interesse biotecnológico, os estudos com a produção de biossurfactantes foi selecionado, considerando o grande potencial de aplicação dessas biomoléculas. (ARAUJO, 2009).

4 METOLOGIA

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Micro-Organismo

Utilizou-se o micro-organismo *Serratia marcescens* UCP 1549, isolado do solo de bananeiras em Recife - PE. Esta linhagem encontra-se depositada no banco de Culturas do Núcleo em Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, mantida em tubos de ágar nutriente inclinado (AN) a 4°C.

4.1.2 Meio de Cultura e Condições de Cultivo

O micro-organismo foi cultivado em frascos de Erlenmeyers de 250 ml de capacidade com 50 ml de meio Luria Bertani (LB), constituído por triptona (10g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (10 g/L), suplementado com glicose (5 mg/ml) segundo KONISHI *et al.*(2000).

4.1.3 Substratos

Resíduos industriais como manipueira (cedida pela fábrica de processamento de mandioca localizado no sítio Abelhas no município de Carnaíba-PE) e óleo pós-fritura (cedido pelo Restaurante Brasília, situado em Campina Grande-PB), e como substratos dendê e coco (adquiridos na feira central de Campina Grande-PB) como meio de produção.

4.1.4 Produção do Biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada por fermentação usando frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de acordo com o planejamento fatorial Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital por um período 72 h. As células foram separadas do líquido metabólico por centrifugação a 10.000g por 15 min a 10°C, com posterior filtração em Millipore de 0,45 µm para separação total das células. O líquido metabólico secundário livre

de células foi utilizado para as seguintes determinações: tensão superficial, atividade e índice de emulsificação.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 pH

O pH da fermentação foi acompanhado por determinação em pHmetro, modelo TECNOPON mPA 210.

4.2.2 Tensão Superficial

A tensão superficial foi medida pelo método do peso da gota. Foi empregado uma bureta comum para a obtenção das gotas, equipamento acessível, segundo a metodologia proposta por BEHRING *et al* (2004).

4.2.3 Índice de Emulsificação

Foram colocados 2,0ml do líquido metabólico livre de células e 2,0ml do óleo vegetal escolhido, para a determinação do índice, em tubos de ensaio. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 2,0 minutos e a leitura feita após 24h, calculadas através da equação:

$$\text{Índice da emulsão} = \frac{H_e \times 100}{H_t},$$

onde H_e = altura de emulsão

H_t = altura total do líquido

obtendo o resultado expresso em percentual. Metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987).

4.2.4 Atividade de Emulsificação

Analisada segundo a metodologia proposta por Cirigliano e Carman (1984). Este consiste em colocar 2,0 ml do líquido metabólico livre de células, com 2,0 ml do tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3) e 2,0 ml do óleo vegetal escolhido para esta análise, a mistura foi agitada em vórtex por dois minutos e após 10 minutos de repouso, as emulsões formadas foram retiradas com o auxílio da pipeta de Pasteur, colocadas em uma cubeta e posteriormente lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda a 540nm.

4.2.5 Estabilidade do Biosurfactante

Foi avaliada de acordo com a melhor condição do planejamento fatorial dos experimentos analisados de acordo com a menor tensão superficial obtida nos experimentos. Com o líquido metabólico livre de células foram medidas as tensões superficiais com pH variando de (2, 4, 6, 8, 10 e 12), diferentes concentrações de NaCl (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e diferentes temperaturas (0°C, 5°C, 70°C, 100°C e 120°C).

4.3 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

4.3.1 Planejamento Experimental do Tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR, de acordo com condições estabelecidas pelas tabelas 3 e 4, com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes manípueira, glicose e óleos vegetais (pós – fritura, dendê e coco), derivando três planejamentos, sobre a variável resposta índice de emulsificação, atividade de emulsificação e tensão superficial.

Foram realizados três experimentos, onde a manípueira e a glicose mantiveram fixas, e variaram-se os óleos: pós-fritura, coco e dendê.

Tabela 3- Valores codificados das variáveis independentes do planejamento DCCR.

| Variáveis | -1,68 | -1 | 0 | 1 | 1,68 |
|---|--------------|-----------|----------|----------|-------------|
| Manipueira (%) | 4,32 | 5 | 6 | 7 | 7,68 |
| Glicose (%) | 0,64 | 2 | 4 | 6 | 7,36 |
| Óleos vegetais (pós-fritura, coco e dendê). | 1,64 | 3 | 5 | 7 | 8,36 |

Tabela 4- Matriz codificada do planejamento experimental do tipo DCCR

| Condições | Manipueira | Glicose | Óleo vegetal |
|------------------|-------------------|----------------|---------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 0 |

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A grande vantagem na produção de biossurfactantes está na possibilidade de reduzir os custos de fabricação, utilizando substratos de baixo custo como óleos vegetais (dendê e coco) e até mesmos rejeitos industriais, como óleo pós-fritura e manipueira. Logo, foi utilizada a biotecnologia para produzir um biossurfactante que não cause impactos ao meio ambiente e seja economicamente viável.

As Tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores das variáveis respostas: atividade de emulsificação, índice de emulsificação e tensão superficial nos três experimentos realizados segundo o planejamento experimental do tipo DCCR.

Tabela 5: Resultado do processo de fermentação da *Serratia marcescens* UCP 1549 (72 horas a 28 °C e 155 rpm) com óleo pós- fritura.

| Condições | Manipueira | Glicose | Óleo Pós-Fritura | Índice de emulsificação (%) | Atividade de emulsificação (U.A.E.) | Tensão Superficial (mN/m) |
|-----------|------------|---------|------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 88,6 | 2,700 | 36,90 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 90,0 | 2,864 | 34,20 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 86,2 | 5,000 | 34,10 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 100,0 | 4,800 | 36,90 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 90,0 | 4,950 | 35,20 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 100,0 | 4,602 | 38,80 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 87,5 | 5,000 | 36,30 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 88,2 | 4,192 | 37,40 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 90,6 | 5,000 | 38,90 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 87,5 | 2,870 | 34,20 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 96,8 | 1,742 | 36,68 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 89,7 | 2,540 | 36,60 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 87,5 | 3,440 | 34,10 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 86,7 | 3,776 | 34,80 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 87,1 | 2,460 | 28,10 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 88,9 | 3,712 | 27,69 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 94,3 | 3,000 | 27,48 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 92,6 | 3,724 | 28,16 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 86,2 | 4,894 | 27,77 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 90,0 | 3,018 | 27,77 |

Tabela 6: Resultado do processo de fermentação da *Serratia marcescens* UCP 1549 (72 horas a 28 °C e 155 rpm) com óleo de coco.

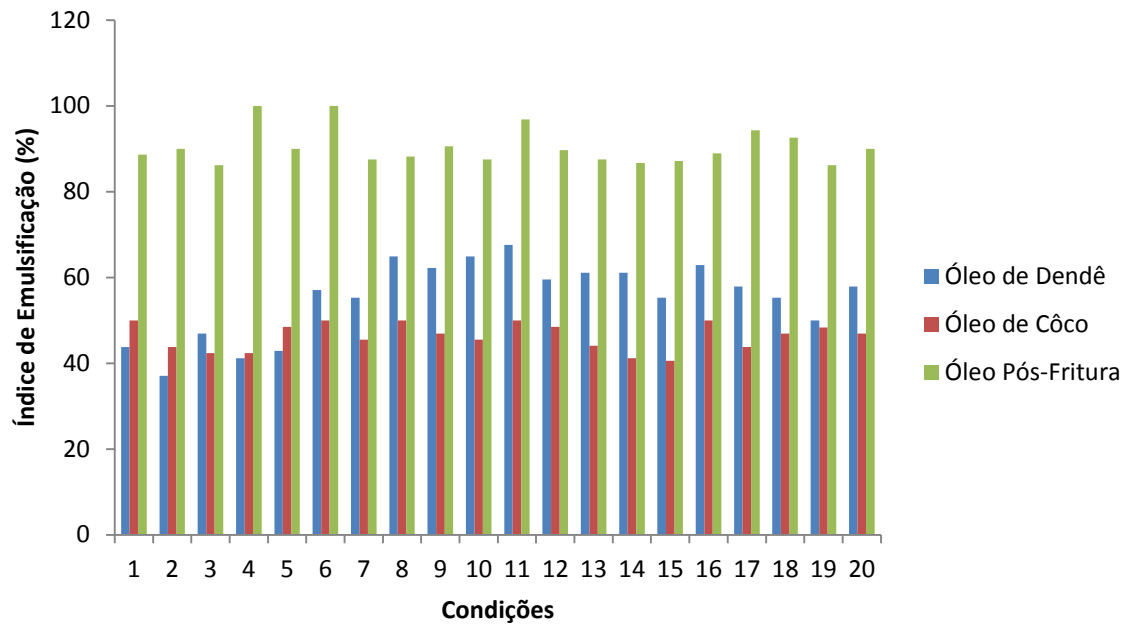
| Condições | Manipueira | Glicose | Óleo vegetal de Coco | Índice de emulsificação (%) | Atividade de emulsificação (U.A.E.) | Tensão Superficial (mN/m) |
|-----------|------------|---------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 50,0 | 2,920 | 37,11 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 43,8 | 2,706 | 36,00 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 42,4 | 0,520 | 40,38 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 42,4 | 3,710 | 33,42 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 48,5 | 2,584 | 38,87 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 50,0 | 2,456 | 35,63 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 45,5 | 2,164 | 35,74 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 50,0 | 3,636 | 37,75 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 46,9 | 0,240 | 39,97 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 45,5 | 2,186 | 37,42 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 50,0 | 3,210 | 37,11 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 48,5 | 1,350 | 40,02 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 44,1 | 0,310 | 39,67 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 41,2 | 2,516 | 38,55 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 40,6 | 3,198 | 37,39 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 50,0 | 3,004 | 40,97 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 43,8 | 2,580 | 32,63 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 46,9 | 2,186 | 36,64 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 48,3 | 3,312 | 39,22 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 46,9 | 3,404 | 37,82 |

Tabela 7: Resultado do processo de fermentação da *Serratia marcescens* UCP 1549 (72 horas a 28 °C e 155 rpm) com óleo de dendê.

| Condições | Manipueira | Glicose | Óleo vegetal de Dendê | Índice de Emulsificação (%) | Atividade de Emulsificação (U.A.E.) | Tensão (mN/m) |
|-----------|------------|---------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 43,8 | 2,940 | 35,57 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 37,1 | 5,000 | 34,45 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 46,9 | 5,000 | 37,78 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 41,2 | 5,000 | 38,76 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 42,9 | 3,520 | 39,07 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 57,1 | 5,000 | 39,22 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 55,3 | 5,000 | 38,47 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 64,9 | 5,000 | 39,00 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 62,2 | 4,602 | 37,94 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 64,9 | 5,000 | 36,41 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 67,6 | 3,890 | 36,63 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 59,5 | 3,994 | 36,59 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 61,1 | 5,000 | 37,25 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 61,1 | 4,904 | 36,57 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 55,3 | 5,000 | 38,29 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 62,9 | 2,458 | 37,78 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 57,9 | 1,766 | 36,74 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 55,3 | 3,100 | 35,98 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 50,0 | 2,916 | 36,34 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 57,9 | 2,602 | 38,71 |

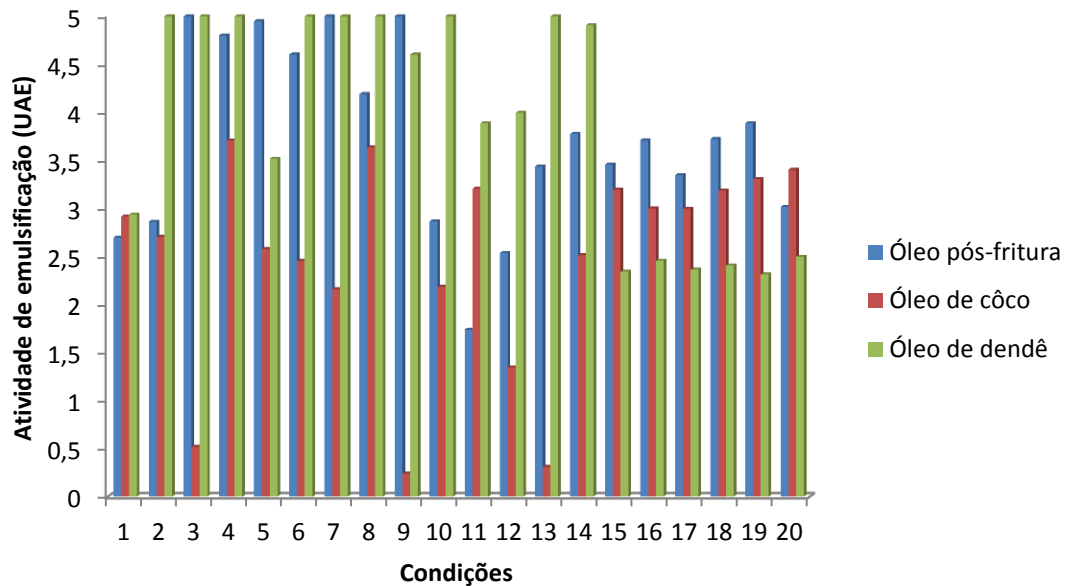
O processo de emulsificação é baseado na extensão de um líquido sobre outro, logo os emulsificantes são dispersões coloidais ou suspensões de um líquido imiscível sobre outros. A Figura 2 compara os resultados de índice de emulsificação obtidos nos três planejamentos realizados, mostrando que os melhores foram observadas nas condições com óleo pós-fritura, todos acima de 85%, assim o biossurfactante produzido nessas condições é um bom emulsificante, pois quanto maior a emulsão maior será a dispersão, Bezerra *et al.* (2012) utilizando *Pseudomonas aeruginosa* obteve resultados variando de 50 a 68%, e Santos *et al.* (2010) utilizando *Pseudomonas fluorescens* produziu índices de emulsificação de 61,54% e 50%, os quais foram considerados bons bioemulsificantes.

Figura 2- Gráfico do índice de emulsificação % (72 horas, a 28°C e 155rpm).



A atividade de emulsificação (U.A.E) avalia qualitativamente a emulsão produzida pelo biossurfactante presente no líquido metabólico, e quanto maiores esses valores mais estável será a emulsão formada, na Figura 3 observar-se que os melhores resultados são nos planejamentos com óleo pós-fritura e óleo de dendê, chegando a 5,000 U.A.E., os valores são satisfatórios, pois Andrade *et al* 2009 produzindo biossurfactante com *Candida lipolytica* e utilizando manipueira como substrato obteve um valor máximo de 2,055 U.A.E.

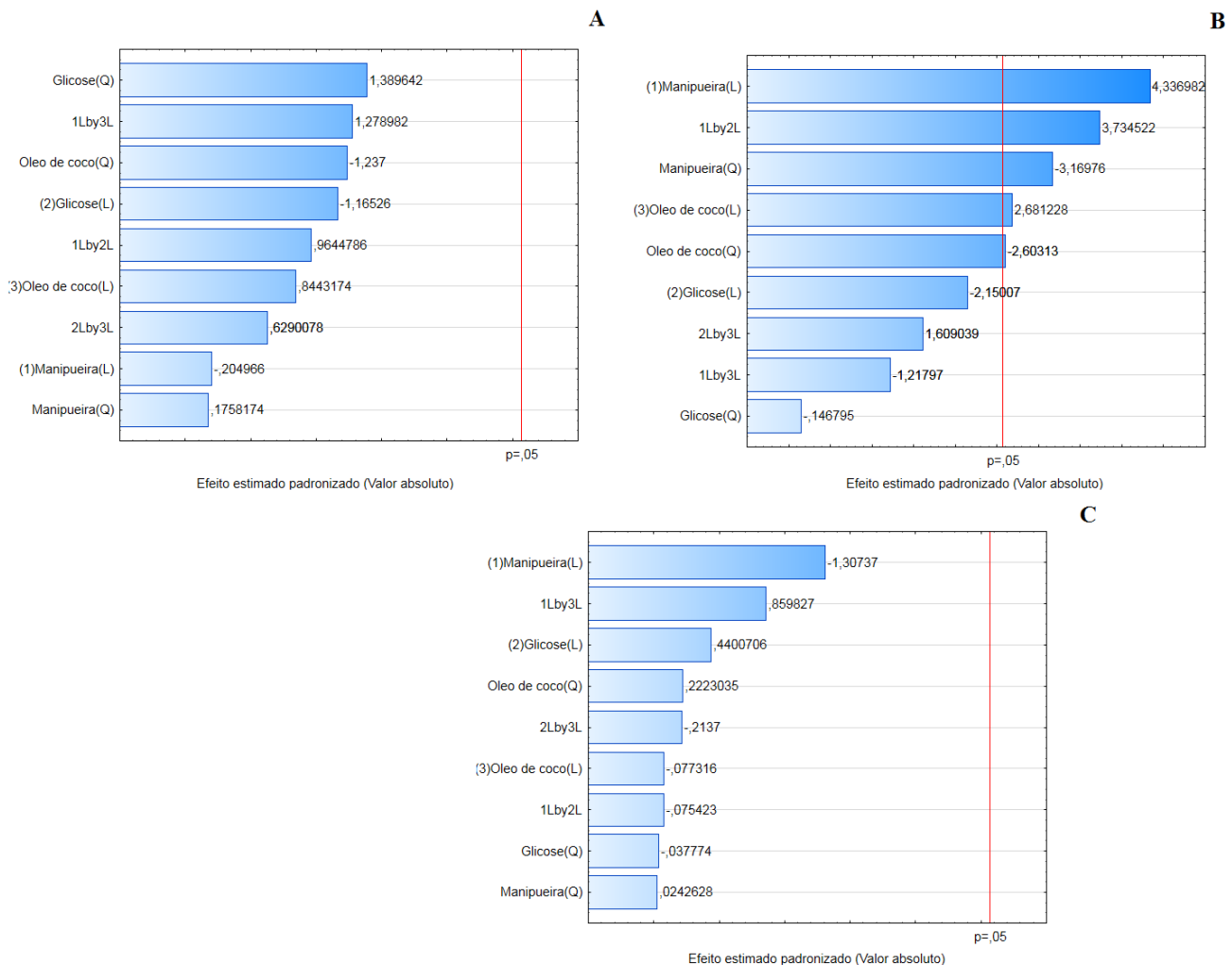
Figura 3- Gráfico de atividade de emulsificação (U.A.E.) (72 horas, a 28°C e 155rpm).



A análise do planejamento experimental foi realizada através do pacote computacional “STATISTC for Windows”, versão 7,0. As análises de importância estatística das variáveis de entrada e das suas interações na variável de resposta foram feitas mediante a avaliação dos resultados dos efeitos e de interação.

No diagrama de Pareto com nível de confiança de 95% (Figura 4) foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (Manipueira, Glicose e óleo de coco) e as interações entre elas sobre as variáveis dependentes Índice de emulsificação (%) (4A), Atividade de emulsificação (U.A.E) (4B) e Tensão Superficial (mN/m) (4C). As Figuras 4A e 4C ilustram que todas as variáveis testadas, assim como suas interações não foram significativas estatisticamente. Entretanto, a Figura 4B que avalia a atividade de emulsificação, as interações manipueira/glicose, e as variáveis independentes manipueira e óleo de coco nas condições lineares apresentaram valores estatisticamente significativos, e contribuíram positivamente para a atividade de emulsificação.

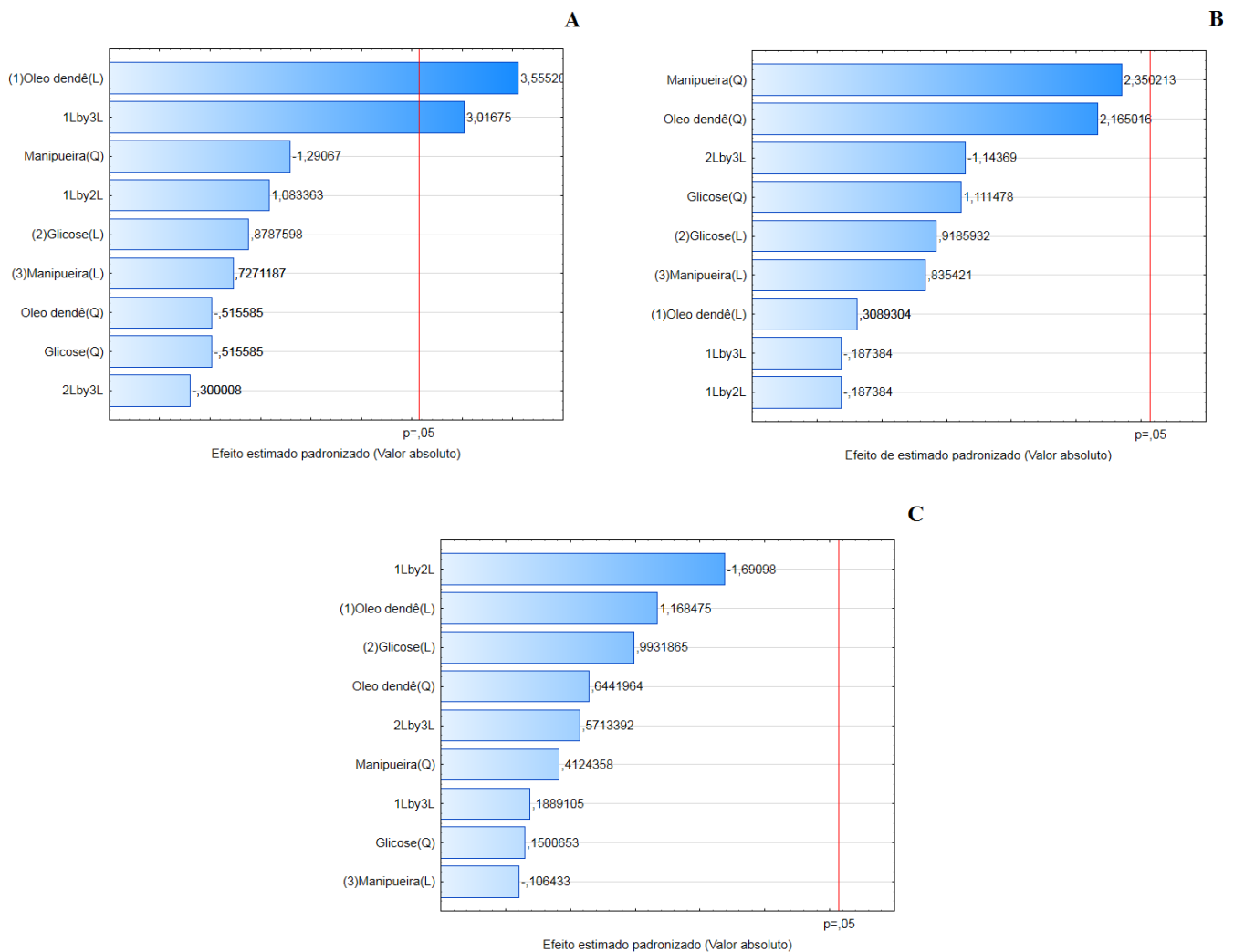
Figura 4: Diagrama de Pareto para avaliação do efeito das variáveis: **A-** Índice de emulsificação (%); **B-** Atividade de Emulsificação (U.A.E.); **C-** Tensão Superficial (mN/m) (óleo de coco, 72 h a 28 °C e 155 rpm).



A Figura 5 representa o diagrama de Pareto com nível de confiança de 95% , onde foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (Manipueira, Glicose e óleo de dendê) e as interações entre elas sobre as variáveis dependentes Índice de emulsificação (%) (5A), Atividade de emulsificação (U.A.E) (5B) e Tensão Superficial (mN/m) (5C). As Figuras 5B e 5C ilustram que todas as variáveis testadas, assim como suas interações não foram significativos estatisticamente. Entretanto, a Figura 5A que avalia o índice de emulsificação, a interação óleo de dendê/manipueira e a variável óleo de dendê nas condições lineares

apresentaram valores estatisticamente significativos, e contribuíram positivamente para o aumento do índice de emulsificação.

Figura 5: Diagrama de Pareto para avaliação do efeito das variáveis: **A-** Índice de emulsificação (%); **B-** Atividade de Emulsificação (U.A.E.); **C-** Tensão Superficial (mN/m) (substrato óleo de dendê, 72 h a 28 °C e 155 rpm).



Observa-se nas análises estatísticas dos resultados para os óleos de coco e dendê, que as variáveis representativas para a atividade de emulsificação e índice de emulsificação, respectivamente, possuem uma substância hidrofóbica (óleo) e uma hidrofílica (glicose ou manipueira), os quais são necessários para a produção do tensoativo, e assim reduzir a tensão interfacial permitindo a formação de emulsões.

Como o objetivo de evidenciar melhor os dados, foram construídos os gráficos de dispersão a partir dos desvios obtidos entre os valores observados e preditos, em função dos resultados experimentais. Constata-se nas Figuras 6 e 7 que os valores experimentais não aproximam-se satisfatoriamente dos valores preditos, mesmo algumas variáveis sendo representativas estatisticamente.

Figura 6: Valores preditos em função dos valores observados para a Atividade emulsificação (U.A.E.) utilizando óleo de coco como substrato.

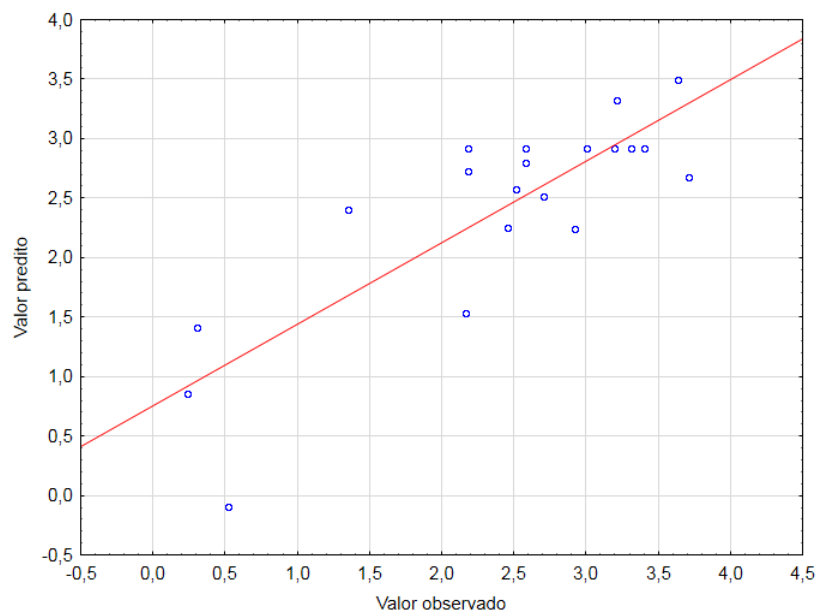
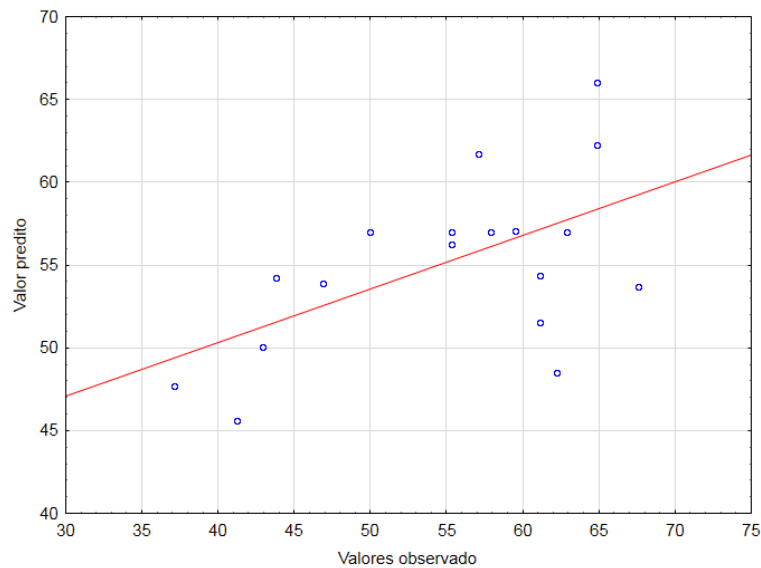


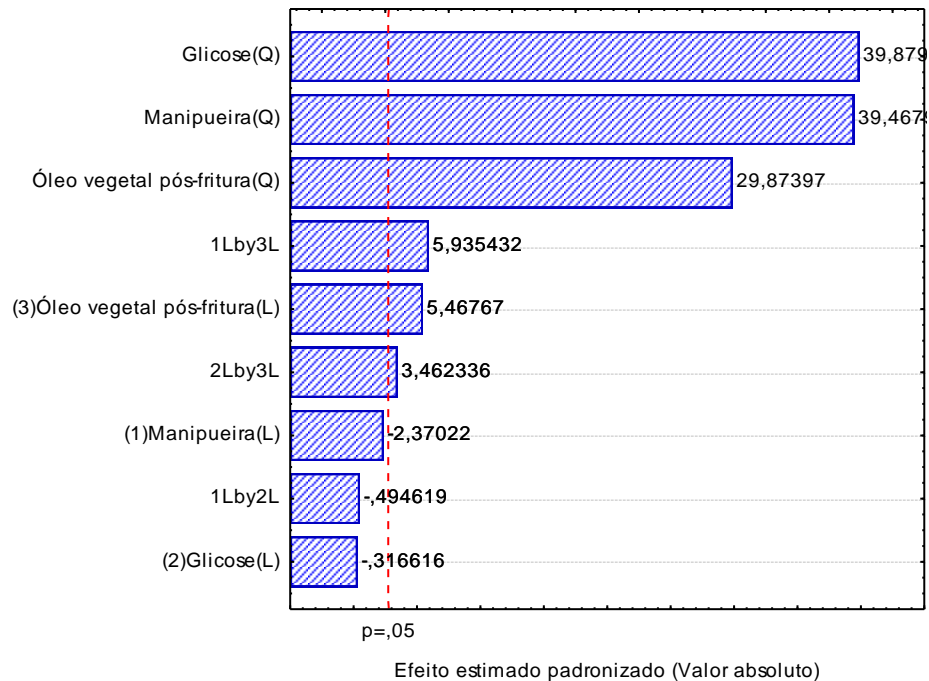
Figura 7: Valores preditos em função dos valores observados para a Índice Emulsificação (%) utilizando óleo de coco como substrato.



Diante das análises experimentais e estatísticas para os experimentos com os óleos de coco e dendê é necessário refazer o planejamento otimizando as quantidades das variáveis independentes, para a obtenção de um bom biossurfactante.

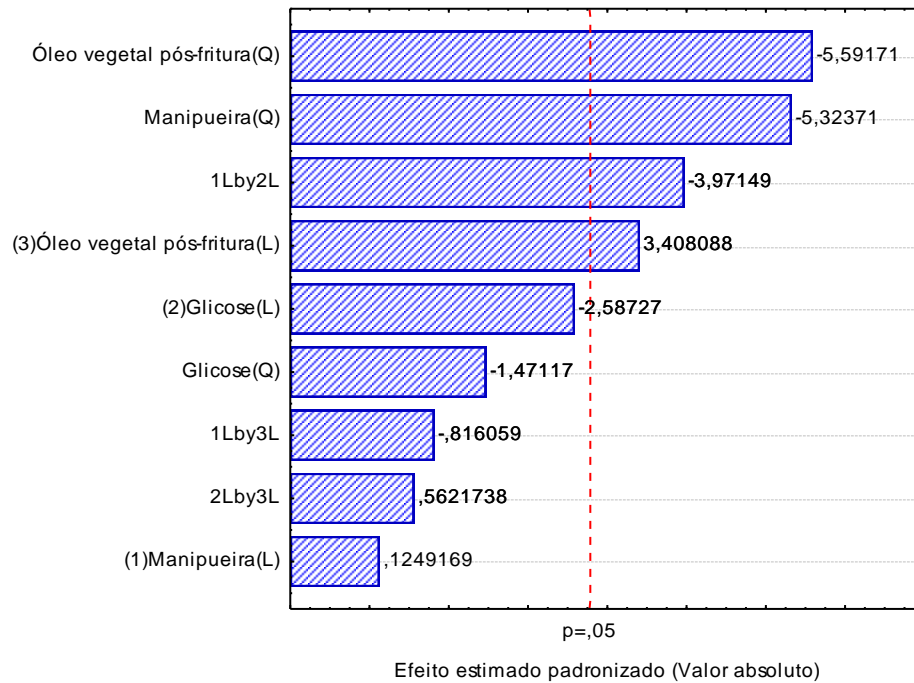
Para o experimento com óleo pós-fritura na Figura 8 o diagrama de Pareto com 95% de confiança mostra os efeitos das variáveis independentes (Manipueira, Glicose e óleo pós-fritura) e as interações entre elas sobre a variável resposta Tensão Superficial (mN/m). As variáveis glicose, manipueira e óleo pós-fritura quadráticos, as interações manipueira/óleo pós-fritura e glicose/óleo pós-fritura apresentam valores significativos estatisticamente e contribuíram negativamente para a redução da tensão superficial, pois os valores de tensão superficial devem ser reduzidos. Os demais não foram significativos estatisticamente.

Figura 8: Diagrama de Pareto para avaliação do efeito da variável Tensão Superficial (mN/m) (óleo de pós-fritura , 72 h a 28 °C e 155 rpm).



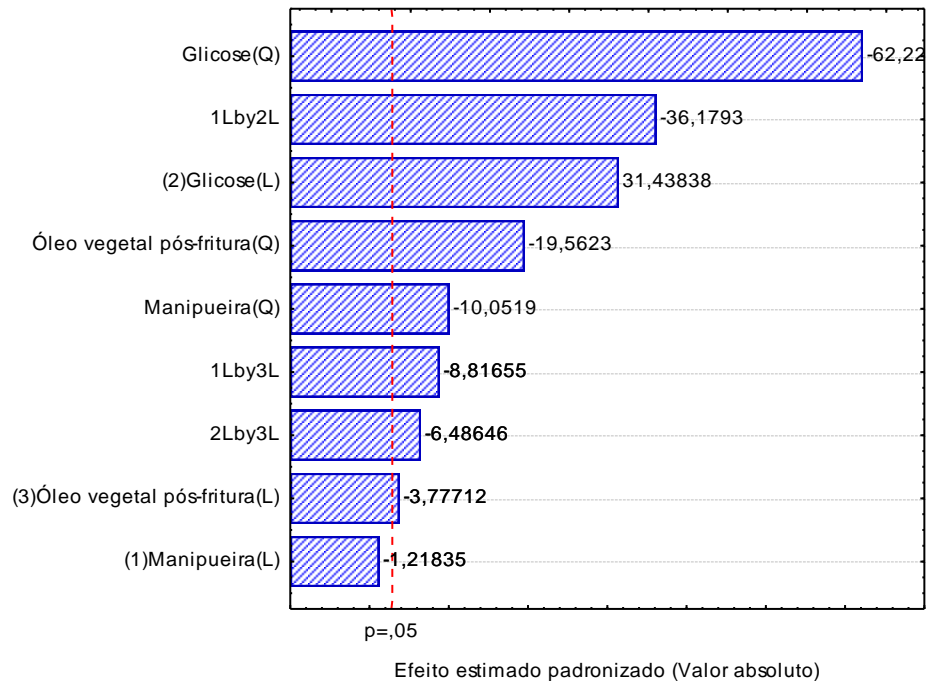
No diagrama de Pareto com 95% de confiabilidade (Figura 9) foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (Manipueira, Glicose e óleo pós-fritura) e as interações entre elas sobre a variável dependente Índice de emulsificação (%) onde foi utilizado como substrato óleo pós-fritura. A interação linear manipueira/glicose e as variáveis independentes manipueira e óleo pós-fritura nas condições quadráticas apresentaram valores estatisticamente significativos, porém negativos para a sintetização de emulsão do biotensoativo, já a concentração de óleo pós-fritura linear foi representativa estatisticamente e influenciou positivamente para a produção do índice de emulsificação.

Figura 9: Diagrama de Pareto para avaliação do efeito da variável Índice de Emulsificação (substrato óleo de pós-fritura, 72 h a 28 °C e 155 rpm).



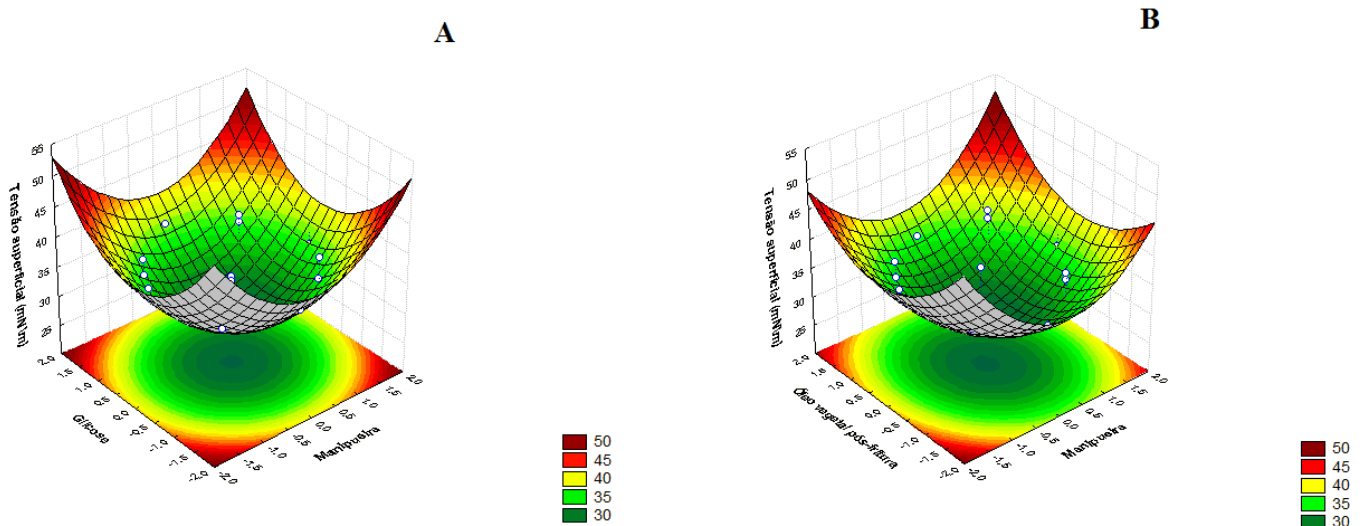
Na Figura 10 o diagrama de Pareto mostra os efeitos das variáveis independentes (Manipueira, Glicose e óleo vegetal) e as interações entre elas sobre a variável resposta Atividade de Emulsificação (U.A.E.) onde foi utilizado como substrato o óleo pós-fritura. Demonstra que todas as variáveis e suas interações (exceto a glicose na condição linear) possuem valores significativos estatisticamente, porém negativos para a atividade de emulsão do bioemulsificante, já a concentração de glicose linear foi representativa estatisticamente e influenciou positivamente para o aumento da atividade de emulsificação.

Figura 10: Diagrama de Pareto para avaliação do efeito da variável Atividade de Emulsificação (U.A.E.) (óleo de pós-fritura, 72 h a 28 °C e 155 rpm).



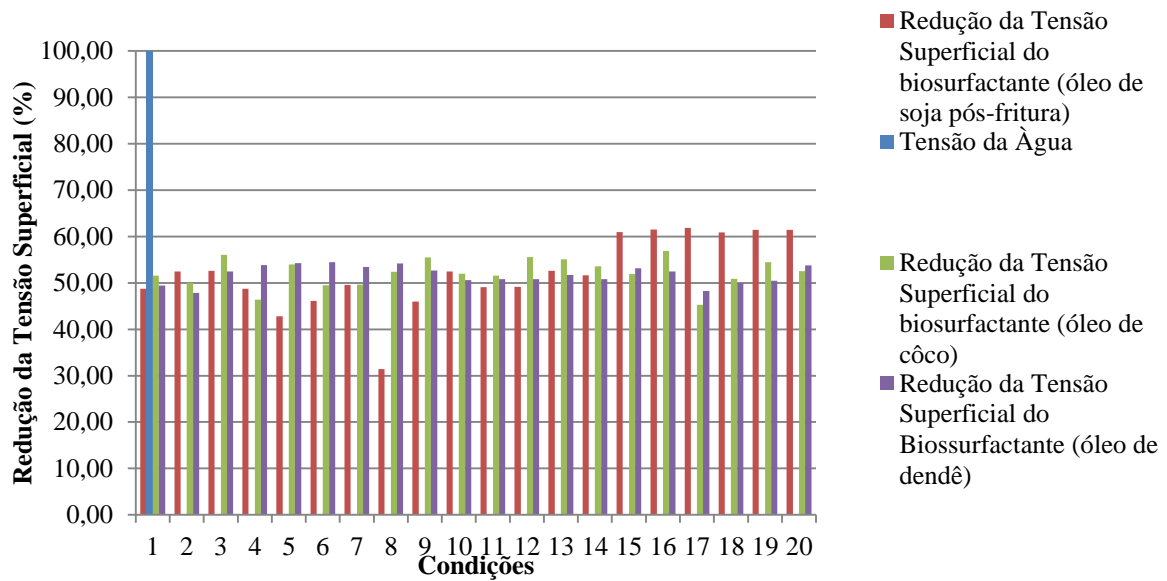
A Figura 11A representa o gráfico de superfície resposta para a interação glicose e manipueira no experimento com óleo pós-fritura realizado por meio do planejamento experimental do tipo DCCR, observa-se que os menores valores de tensão superficial estão nos pontos centrais, com valores entre 27,77 e 28,16 mN/m. Bezerra (2012) utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e manipueira como substrato, obteve resultados mínimos de tensão superficial de 30,92 mN/m nas melhores condições. Araújo *et al* (2009) realizou teste com os surfactantes químicos Triton X – 100 e Span 20, e obtiveram uma tensão superficial de 31,10 mN/m e 29,30mN/m, respectivamente. A Figura 11B mostra o gráfico de superfície resposta com efeito entre os óleos pós-fritura e a manipueira, ratificando que os melhores valores de tensão superficial estão nas condições dos pontos centrais do planejamento experimental do tipo DCCR.

Figura 11: Superfície de resposta da redução da tensão superficial (mN/m) em função da glicose e manípueira (A), e em função do óleo pós-fritura e manípueira (B) (óleo pós-fritura, 72 h a 28 °C e 155 rpm).



Os resultados obtidos no experimento com óleo pós-fritura mostraram-se satisfatórios para obtenção do biossurfactante, tanto na representatividade estatística das variáveis independentes, quanto nos valores obtidos experimentalmente (Figura 12) nas variáveis resposta ou dependentes. E mostrou a influência da fonte de carbono e nitrogênio no meio de produção do biossurfactante, que é considerada um dos mais importantes parâmetros. A *S.marcescens* UCP 1549, foi capaz de usar como nutrientes a glicose e o óleo pós-fritura, como fontes de carbono por serem carboidrato e ácidos graxos respectivamente, provavelmente, a habilidade dos microrganismos utilizarem alguns ácidos graxos como fontes de carbono é induzido na produção dos metabolitos secundários (LENG et al., 2003; ABOUSEOUD et al., 2007) e a manípueira como fonte nitrogenada, provavelmente por ser um efluente rico em fontes de nitrogênio na sua composição ver Tabela 2 (FEIDEN, 2001; BOTELHO et al., 2009). Estudos mostram que a obtenção da alta produção do biopolímero, pode ser devido uma excelente relação entre as fontes de carbono e nitrogênio do meio (ABOUSEOUD et al., 2007).

Figura 12: Gráfico da Redução da Tensão Superficial.



Logo, os testes de estabilidade do biossurfactante produzido foram realizados com o melhor resultado de tensão superficial do experimento com óleo pós-fritura, verificada no ponto central do planejamento experimental do tipo DCCR.

A Figura 13 e a Tabela 7 mostram que o surfactante biológico variou pouco diante das variações de pH (12A) e NaCl (12B), para as varias temperatura (12C) os valores foram mais elevados no entanto não ultrapassaram 40 mN/m. Este teste demonstra a capacidade do biossurfactante ser aplicado em condições ambientais diversas.

Figura 13: Teste de estabilidade do biossurfactante pela redução da tensão superficial (mN/m) em função das variações de pH (A), concentração de NaCl (%) (B) e temperatura (°C) (C) com o líquido metabolito do experimento com óleo pós-fritura.

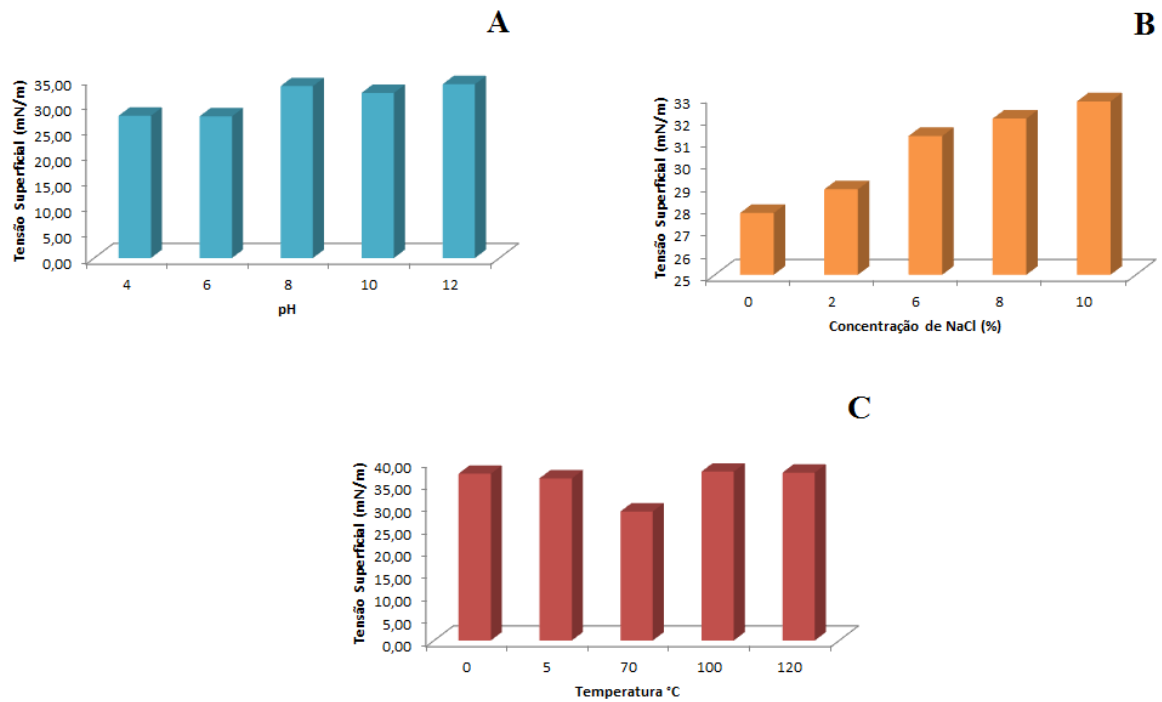


Tabela 8: Valores da tensão superficial decorrente do teste de estabilidade do biossurfactante pela redução da tensão superficial (mN/m).

| pH | TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m) | NaCl (%) | TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m) | TEMPERATURA (°C) | TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m) |
|----|---------------------------|----------|---------------------------|------------------|---------------------------|
| 4 | 27,77 | 0 | 27,77 | 0 | 37,21 |
| 6 | 27,66 | 2 | 28,83 | 5 | 36,17 |
| 8 | 33,57 | 6 | 31,22 | 70 | 28,79 |
| 10 | 32,25 | 8 | 32,00 | 100 | 37,68 |
| 12 | 33,93 | 10 | 32,77 | 120 | 37,46 |

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a *Serratia marcescens* UCP1549 possui potencial biotecnológico na produção de biossurfactante utilizando meio de baixo custo na combinação dos substratos manipueira e óleo pós-fritura (rejeitos industriais) e óleos vegetais *in-natura* (óleo de coco e de dendê), de modo que estes fatores reduzem consideravelmente seu custo de produção, e ainda transformam resíduos em produtos com maior valor agregado apresentando uma alternativa vantajosa minimizando o impacto ambiental.

Os experimentos com óleo de dendê e óleo de coco, deverão seguir uma otimização no planejamento para obtenção de melhores resultados nas variáveis respostas.

A produção do biossurfactante nas condições estudadas com óleo pós-fritura, apresentou boas perspectivas, com eficiência na redução da tensão superficial, e na produção de emulsões.

Os testes de estabilidade na melhor condição do planejamento utilizando como substrato o óleo pós-fritura mostraram pouca variação frente à tensão superficial nos diferentes níveis de pH e temperatura e nas diferentes concentrações de sal favorecendo sua utilização em condições ambientais extremas.

REFERÊNCIAS

- ABOUSEOUD, M.; MAACH, R. and AMRANE, A. **Biosurfactants production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens***. Trends in Appl Microbiol. 340-347, 2007.
- ANDRADE, R. F. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Surface active produced by *Candida lipolytica* using cassava flour wastewater as substrate**. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, v1: 701-705p. 2009.
- ARAUJO, H.W.C. **Caracterização morfológica e molecular de *Serratia marcescens* e potencial biotecnológico na produção de biossurfactante, prodigiosina e na utilização do bibenzotiofeno (DBT)**. Tese de doutorado, Renorbio. Recife-PE, 2009.
- ARAUJO, H. W. C.; ALMEIDA, F. C. G.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Isolamento, caracterização e aplicação do biossurfactante produzido por *Serratiamarcescens* UCP 1549 utilizando a manipueira como substrato**. Journal of industrial, microbiology and technology, 2009.
- Agência Nacional de Energia Elétrica (Aneel). **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3. ed., 236p. Brasília-DF, 2008.
- BEZERRA, M. S *et al.*. **Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonasaeruginosa* (P.A.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato**. HOLOS, 2012.
- BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonasaeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono**. Tese de Doutorado, Natal-RN, 2012
- BEHRING, J. L.. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da cmc de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004.
- BOTELHO, S.M.; POLTRONIERI, M.C.; RODRIGUES, J.E.L.F. **Manipueira: um adubo orgânico para a agricultura familiar** In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca. Botucatu –SP, 2009.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C.H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. São José do Rio Preto – SP, **Brasil Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.
- BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização**. Curitiba-RS, 2009.
- CALLADO, N. H.; DE PAULA JR., D. R. Gerenciamento de resíduos de uma indústria de processamento de coco - estudo de caso –. **20º Congresso Brasileiro De Engenharia Sanitária e Ambiental**, 1999.
- CARLILE, M.; WATKISON, S.C. **The fungi**. Academic press. p.460, 1997.

CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A. V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 394-400, Rio Grande – RS, 2009.

CIRIGLIANO M.C, CARMAN G.M **Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl Environ Microbiol**, 48: 747-750,1984.

COOPER, D. G. and GOLDENBERG, B. G. **Surface active agents from two *Bacillus* species Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p 224 –229, 1987.

CORDEIRO, A. C. C. *et al.* **Desenvolvimento vegetativo de cultivares de dendezeiro em Roraima no período de 2008 a 2010.** Boletim de Pesquisa 29 e Desenvolvimento ISSN 1981 - 609X Dezembro, 2010.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. **Avaliação da permeabilização de células de *Candida guilliermondii* empregando tensoativo catiônico CTAB.** In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, p. 17, 2008, Recife-PE. **Anais.** Recife: UFPE, 2008.

CORDEIRO, A. C. C. *et al.* **Desenvolvimento Vegetativo de Cultivares de Dendezeiro em Roraima no Período de 2008 a 2010.** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Roraima, 19p. Boa Vista-RR, 2010.

DABDOUB, M. J.; BORTOLETO, D. A.; SELLANI, V. D.; RAMPIN, M. A.; SILVA, C. P. da. Livreto - **Biodiesel em casa e nas escolas - do Laboratório de desenvolvimento de tecnologias limpas de Ribeirão Preto, SP** , 2006.

FEIDEN, A. **Tratamento de águas residuárias de indústrias de fécula de mandioca através de biodigestor anaeróbio com separação de fases em escala piloto.** Botucatu. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 80p. 2001.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. **Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol by product.** **Carbohydrate Polymers**, v.78, p. 549-556, 2009.

FREMOND, Y.; ZILLER, R. e LAMOTHE, M. N. **El cocotero.** 1 ed. Barcelona: Editorial Blume, 1969.

GAIO, L. M.; SILVA, J. S.; RODRIGUES, J. P.; GHESTI, G. F. Conscientização e execução de projeto ambiental – Reciclagem de óleo residual a partir de coleta seletiva na comunidade do Gama-DF. In: **ENCONTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**, 2. Gama-DF, 2010.

GHESTI, G. F. *et al.*. **A educação ambiental na Engenharia e a reciclagem de óleo residual coletado: projeto de extensão Biogama.** Gama-DF, 2012.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. R. ***Serratia marcescens*.** J. Med. Microbiol. - v. 46, p. 903-912, 1997,.

HOMMA, A.K.O.; FURLAN JUNIOR, J. Desenvolvimento da dendeicultura na Amazônia: cronologia. In: MÜLLER, A.A.; FURLAN JUNIOR, J. **Agronegócio do dendê: uma alternativa social, econômica e ambiental para o desenvolvimento sustentável da Amazônia**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001, p.193-207.

IOSTI, C. A. R.; RAETANO, C. G. Tensão superficial dinâmica e ângulo de contato de soluções Aquosas com surfatantes em superfícies artificiais e naturais. **Eng. Agrícola**, v. 30, n.4, p.670-680, jul./ago. Jaboticabal-SP, 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W.C.: **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. São Paulo, 2001.

KONISHI, J.; ONAKA, T.; ISHII, Y.; SUZUKI, M. **Demonstration of carbon sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic *Paenibacillus* sp. Strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene**. FEMS Microbiology Letters, 187, p. 151-154, 2000.

LENG, S.L.; MISRAN, M.; TAN, I.K.P. 2003. **Biosurfactant Production by Palm Oil Utilizing Microorganisms**. Seminar Penyelidikan Jangka Pendek .f,1-3.

LIMA, C. J. B. de. **Produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. Uberlândia-MG, 2007.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; TAKAKI, G. M. C. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 52:4, 785-793, 2009.

Manipueira um líquido precioso. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso: 09 ago. 2013.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biosurfactante visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Alimentos, 98f. Campinas-SP, 2004.

MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Utilização de biosurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **Scientia Plena**, v. 8, n. 10, 2012.

MORÁS, P. L.; SILVA, J. D. Programa de reciclagem de óleo domésticos em Mandiritura-Paraná. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, 25. Recife. 2009.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactant. **EnvironmenPollut.** n. 133, p. 183-198, 2005.

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

PONTE, J.J. **Histórico das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivo agrícola**. Fito-atol. Venez., 5(1): 2-5, 1992.

ROCHA, R. N. C. **Culturas intercalares para sustentabilidade da produção de dendê na agricultura familiar.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, 2007. 73p.

SANTOS, Luiz Queiroz *et al.* Produção de biossurfactante por pseudomonasfluorescens em caldo de abacaxi (*Ananascomosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. **Exacta**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies.** São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1975.

VIEGAS, I. de M.; MÜLLER, A. A. **A cultura do Dendzeiro na Amazônia.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental/Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. p. 48-60.