

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

NATÁLIA VAMA VIEIRA

**UTILIZAÇÃO DE CAROÇO DE MANGA COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO
PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE**

Sorocaba

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

NATÁLIA VAMA VIEIRA

**UTILIZAÇÃO DE CAROÇO DE MANGA COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO
PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientação: Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Sorocaba

2022

Vieira, Natália Vama

Utilização de caroço de manga como substrato alternativo para produção de biossurfactante / Natália Vama Vieira -- 2022.

51f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte

Banca Examinadora: Cleoni dos Santos Carvalho, Roberta Barros Lovaglio

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8
6979

Folha de aprovação

Natália Vama Vieira

“UTILIZAÇÃO DE CAROÇO DE MANGA COMO SUBSTRATO ALTERNATIVO PARA
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE”

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba

Sorocaba, 19 de abril de 2022.



Orientadora _____

Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Membro 1 _____


Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho



Membro 2 _____

Dra. Roberta Barros Lovaglio

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe, Valéria, meu pai, Marcelo, minha irmã, Alessandra, e minha avó, Carmen por todo o esforço para que eu recebesse uma boa educação, pelo incentivo, pelo apoio e pelo amor incondicional. Sou grata por tê-los sempre ao meu lado, não importa o que aconteça. Todo esse suporte me permitiu encarar os desafios e me dedicar para alcançar meus sonhos.

À minha orientadora Iolanda por quem tenho um imenso carinho, respeito e admiração. Não sou capaz de colocar em palavras o quão gratificante foi aprender e trabalhar junto com ela, e graças a ela eu amadureci não apenas profissionalmente, mas como pessoa também. Com ela eu aprendi o que é “fazer ciência” e como fazer.

Às minhas amigas do laboratório: Fernanda, Gabriela, Mariana, Maria, Juliane e Bárbara por todo o companheirismo, união e por sempre me estenderem a mão quando precisei.

A todos meus amigos que fiz na Universidade, que enfrentaram comigo esses anos de curso, principalmente à: Agatha, Beatriz, Caroline, Iara, Keila, Leilane, Luiza, Mayara, Rebeca, Suzana e Yasmin, por todo o carinho e por estarem sempre comigo, fazendo dessa uma experiência tão incrível.

Por fim, agradeço ao CNPq por me possibilitar desenvolver projetos de Iniciação Científica e pelo incentivo à pesquisa, além da bolsa concedida.

Tenho imensa gratidão a todos que fizeram parte, junto a mim, deste período memorável e por todas as oportunidades oferecidas na Universidade.

RESUMO

VIEIRA, Natália Vama. Utilização de caroço de manga como substrato alternativo para produção de biossurfactante. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2022.

Surfactantes são moléculas anfifílicas, com propriedades de adsorção e formação de micelas, o que lhes garante a capacidade de redução da tensão superficial, formação de emulsão, dispersão de fases e demais finalidades. Entretanto os surfactantes sintéticos ainda são produzidos à base de petróleo, podem ser recalcitrantes e prejudiciais ao ambiente. Os biossurfactantes são moléculas produzidas por microrganismos a partir de fontes renováveis, tais como resíduos agroindustriais. O Brasil, por ser um grande produtor agrícola, gera resíduos agroindustriais em larga escala, e seu uso como substrato na fermentação pode reduzir significativamente o custo de produção dos biossurfactantes e valorizar a biomassa residual com a obtenção de produto com valor agregado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de biossurfactante por bactérias autóctones isoladas do enriquecimento de biomassa residual de manga e por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando caroço de manga desidratado, moído e pré-tratado como substrato. Entre os isolados identificados *Brevibacillus borstelensis* foi o único com potencial em produzir agentes emulsificantes, apresentando índice máximo de emulsão de 48,65% com glicose, contudo a cepa de *P. aeruginosa* apresentou os melhores resultados, com índice de emulsão de 57,7% e, sendo essa selecionada para os ensaios de produção de biossurfactante com o hidrolisado de caroço de manga. Por meio de planejamento experimental obteve a otimização da produção de biossurfactante em pH 6, com 3 g/L de açúcares redutores totais e sem adição de óleo de soja e glicerol, atingindo índice máximo de emulsão de 66,86%, sendo 9,16% maior que o controle de glicose. O biossurfactante extraído apresentou carga iônica negativa e pertence a classe de glicolipídios, provavelmente um ramnolipídeo. Portanto, hidrolisado de caroço de manga obtido de tratamento térmico pode ser um substrato alternativo para produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, auto-fermentado, biossurfactante, manga, emulsão.

ABSTRACT

Surfactants are amphiphilic molecules with properties of adsorption and formation of micelles, which guarantee the ability to reduce surface tension, emulsion formation, phase dispersion, and other purposes. However, conventional surfactants are still produced from petroleum, which is harmful to the environment and the populations that consume it. Because of this, biosurfactants have been the subject of studies, as they are molecules similar to synthetic surfactants and produced by microorganisms, being biodegradable and less toxic, and for their production renewable sources can be used, such as agro-industrial residues that in addition to being a source of carbon it is a valuation of residual biomass. Brazil, as a large agricultural producer, generates agro-industrial residues on a large scale, and its use as a substrate in fermentation can significantly reduce the cost of production of biosurfactants. Within this agricultural sector, Brazil is the seventh world producer of mango and its residual biomass has considerable amounts of oils and sugars to be used in the production of biosurfactants. Thus, the production of biosurfactant by autochthonous bacteria isolated from self-fermented residual mango biomass and by *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated, using dehydrated, ground, and pre-treated mango seed as substrate. The mango seed was characterized with lipid content of 3.25% and in the pre-treatment, by autoclave, it released 67 ± 0.01 mg/g of total reducing sugars. The isolate identified as *Brevibacillus borstelensis* was the only one capable of producing emulsifying agents, presenting a maximum emulsion index of 48.65% with glucose, however, the *P. aeruginosa* strain showed the best results, with an emulsion index of 57.7% with glucose and positive results in the droplet collapse, oil displacement and hydrocarbon plaque tests, which was selected for the biosurfactant production assays with the pre-treated mango seed. Through experimental planning, it was possible to optimize the production of biosurfactant at pH 6, with 3 g/L of substrate and without the addition of soybean oil and glycerol, reaching a maximum emulsion index of 66.86%, with 9, 16% higher than glucose control. The extracted biosurfactant showed a negative ionic charge and belongs to the class of glycolipids. Therefore, pre-treated mango seed can be an alternative substrate for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, self-fermented, biosurfactant, mango, emulsion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma operacional da metodologia realizada.....15
- Figura 2** - Árvore filogenética construída usando o método Neighbor-Joining, com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA do isolado NV04 com as sequências parciais do gênero *Brevibacillus* no GenBank, gerada no programa MEGA 10.2 com 1.000 bootstrap para o nível de confiança. *Isolado identificado, denominado NV04.....26
- Figura 3** - Índice de emulsão (em querosene) obtido com sobrenadante da fermentação utilizando o isolado *Brevibacillus borstelensis* e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.....27
- Figura 4** - Teste de colapso de gota realizado com o sobrenadante. A) Água - controle negativo; B) *Brevibacillus borstelensis*; C) *P. aeruginosa*.....28
- Figura 5** - Teste de deslocamento de óleo. A) Água - controle negativo; B) *Brevibacillus borstelensis*; C) *P. aeruginosa*.....29
- Figura 6** - Teste de placa de óleo. A) *E.coli* - controle negativo; B) *P. aeruginosa*.....30
- Figura 7** - Gráficos de contorno do índice de emulsão em relação as variáveis. A) pH x óleo de soja (%); B) Glicerol (%) x óleo de soja (%).....33
- Figura 8** - Índices de emulsão (em querosene) dos ensaios de produção de biossurfactante com hidrolisado de caroço de manga após 72 horas de fermentação, com a *P. aeruginosa* ATCC 9027. Ensaios de 1 a 16 segundo as condições descritas na Tabela 1; C = controle.....33
- Figura 9** - Índice de emulsão da condição otimizada, utilizando meio com glicose (controle) e meio com hidrolisado de caroço de manga.....35
- Figura 10** - Micrografia da emulsão formada pelo biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo o hidrolisado de caroço de manga. Aumento de 100x.....35
- Figura 11** - Crescimento celular na condição otimizada, pelo método de biomassa seca, do

hidrolisado de caroço de manga e do controle com glicose.....36

Figura 12 - Estabilidade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*. a) Estabilidade em diferentes temperaturas; b) Estabilidade em diferentes pH; c) Estabilidade em diferentes concentrações de NaCl. Barras de desvio padrão/ausência de barra: desvio padrão = 0.....38

Figura 13 - Carga iônica do biossurfactante produzido em meio otimizado com hidrolisado de caroço de manga.....38

Figura 14 - Teste de detecção de glicolípido do biossurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa*.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento fatorial 2k das condições para os ensaios de produção de biossurfactante.....	20
Tabela 2 - Dados comparativos da caracterização química da polpa de manga. (\pm = Desvio padrão).....	23
Tabela 3 - Dados comparativos da caracterização físico-química do caroço de manga (\pm = Desvio padrão).....	25
Tabela 4 - Divergência genética obtida entre as sequências do gênero <i>Brevibacillus</i> , pelo modelo de Kimura dois-parâmetros. Valores em porcentagem (%).....	27
Tabela 5 - Concentração de açúcares redutores totais nos diferentes pré-tratamentos e hidrólise. (\pm = Desvio padrão).....	31
Tabela 6 - p-valor do efeito das variáveis independentes nas variáveis dependentes avaliadas para a produção de biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no caroço de manga.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo principal	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 METODOLOGIA	15
3.1 Coleta e armazenagem do resíduo	16
3.2 Enriquecimento da biomassa de manga e isolamento de microrganismos autóctones	16
3.3 Preparação do inóculo para ensaios e triagem de produção de biossurfactante	16
3.4 Avaliação do potencial dos isolados na produção de biossurfactante	17
3.4.1 Procedimentos analíticos	17
3.5 Identificação dos microrganismos produtores de biossurfactante	18
3.5.1 Extração e sequenciamento do DNA das amostras	18
3.5.2 Análise das sequências	18
3.6 Caracterização da biomassa de manga	18
3.6.1 Caracterização da polpa de manga	18
3.6.2 Caracterização do caroço	18
3.7 Preparo do caroço de manga como substrato para a produção de biossurfactante	19
3.8 Ensaio da produção de biossurfactante utilizando o hidrolisado de caroço de manga como substrato	20
3.9 Monitoramento dos ensaios de produção de biossurfactante	21
3.10 Fermentação e monitoramento da condição otimizada	21
3.11 Extração do biossurfactante	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Caracterização da biomassa	22
4.2 Identificação e triagem dos isolados produtores de biossurfactantes	26
4.3 Pré tratamento do caroço de manga	30
4.4 Otimização da produção de biossurfactante a partir de hidrolisado de caroço de manga por <i>P. aeruginosa</i>	31
4.5 Fermentação da condição otimizada	35
4.6 Caracterização química do biossurfactante produzido	38
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, possuem uma região hidrofóbica (apolar) e uma região hidrofílica (polar), sendo que a parte apolar é constituída, majoritariamente, por hidrocarbonetos, lineares ou ramificados, os quais podem ou não apresentarem duplas ligações ou grupos aromáticos. A parte polar, ou iônica, é responsável por realizar as atrações eletrostáticas com a solução, permitindo a entrada da cadeia hidrofóbica na mesma, e assim a solubilização da substância envolta pelo surfactante, sendo que quanto maior for a polaridade, positiva ou negativa, da parte iônica, maior será a solubilização em água, já que essa é polar (NITSCHKE & PASTORE, 2002; DALTIM, 2019).

A molécula de surfactante possui propriedades fundamentais como a adsorção e formação de micelas. Tais propriedades conferem à molécula a capacidade de reduzir a tensão superficial, realizar atividade emulsificante, lubrificante, de detergência, formadora de espuma, solubilizante, de dispersão de fases, entre outras diversas funções (ARAUJO, FREIRE & NITSCHKE, 2013).

A maioria dos surfactantes sintéticos é produzido a partir de compostos advindos de petróleo, isso faz com que eles apresentem maior toxicidade e sejam pouco compatíveis com o meio ambiente. Portanto existe uma tendência e necessidade da substituição pelos biossurfactantes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Biossurfactantes são moléculas produzidas por microrganismos, sejam eles leveduras, fungos ou bactérias (ARAUJO, FREIRE & NITSCHKE, 2013). Apresentam maior biodegradabilidade, podem ser utilizados para diversas finalidades, dentre elas auxiliar a biorremediação de substâncias nocivas, como óleos e metais, e a principal aplicação em processos industriais tais como emulsificação, separação de fases, formação de espuma, solubilização, diminuição de viscosidade, detergência, agente antimicrobiano, entre outras (SULLIVAN, 1998; THAVASI & BANAT, 2014).

As vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes sintéticos são: maior redução da tensão superficial - isso porque os biossurfactantes apresentam uma concentração micelar crítica (CMC) baixa; são menos tóxicos - portanto são mais seguros para serem utilizados nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas; possuem maior estabilidade e, por isso, são capazes de se manter em ambientes mais extremos; podem ser produzidos em substratos mais econômicos e renováveis, como resíduos agrícolas (FELIPE & DIAS, 2016). Com isso, é estimado que em 2023 a comercialização de biossurfactante produzirá um faturamento de cerca de US \$2,7 bilhões de dólares, além de um volume de 524 mil toneladas (FELIPE & DIAS, 2016).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua massa, composição química e de qual microrganismo se originaram, aqueles que possuem baixa massa são os glicolípídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolípídeos e os de alta massa abrangem os poliméricos e particulados. Sendo que dentre essas classificações os mais comuns são os lipopeptídeos e glicolípídeos, produzidos por *Bacillus subtilis* (surfactina) e *Pseudomonas aeruginosa* (ramnolípídeo), respectivamente (NITSCHKE & PASTORE, 2002; BANAT et al., 2014; DAS & KUMAR 2019; PURWASENA et al., 2019).

Todavia, o custo da produção de biossurfactantes ainda é elevado, devido às fontes de carbono utilizadas, como petróleo, gasolina, heptadecano; as formas ineficazes de extração e processamento do biossurfactante podendo atingir de 60% a 80% do custo de produção e o baixo rendimento. Por isso, tem-se buscado formas alternativas de produção de biossurfactante, sendo que os fatores que podem contribuir significativamente para a diminuição dos custos são: a utilização de substratos mais baratos, a otimização do meio de produção e condições ambientais e a triagem de microrganismos para atingir a maior produção possível (DECESARO et al., 2013; BANAT et al., 2014; FELIPE & DIAS, 2016; PARASZKIEWICZ et al., 2018).

A utilização de resíduos agrícolas como substratos tem se mostrado uma alternativa promissora, podendo levar a uma diminuição de 10 a 30 % do custo de produção (DECESARO et al., 2013; FELIPE & DIAS, 2016; PARASZKIEWICZ et al., 2018). Biossurfactante produzido a partir do substrato contendo o suco de caju foi capaz de reduzir a tensão superficial em 30 mN/m (OLIVEIRA et al., 2013). Cepas de *Bacillus subtilis* em substrato de suco de caju foram capazes de produzir biossurfactantes que reduziram a tensão superficial da água de 72,0 para 31,8 mN/m (FELIX et al., 2019). Biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em substrato de caldo de casca de laranja foi capaz de reduzir a tensão superficial da água para 48,65 mN/m (ROVINA, EHRHARDT & TAMBOURGI, 2018).

Substratos como trigo, arroz, mandioca, milho, melão de beterraba, bagaço de cana-de-açúcar, suco de maçã, caju, e outros diversos substratos também já foram testados para a produção de biossurfactante (OLIVEIRA et al., 2013; PARASZKIEWICZ et al., 2018; FELIX et al., 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas do mundo, sendo esse um dos setores de maior destaque do agronegócio brasileiro. Dentre as frutas produzidas, tem-se a manga. O Brasil ocupa a sétima posição no *ranking* mundial de produção de manga e em 2018, exportou 149,4 mil toneladas da fruta, gerando uma receita de 157 milhões de dólares (SILVA, FERREIRA & LIMA, 2016; OLIVEIRA & PALMIERI, 2018).

Aproximadamente 25% do peso total da manga é desperdiçado, este peso corresponde

à semente. A semente da manga possui altos níveis de óleos, sendo estimado que somente na Índia são produzidas, anualmente, 30.000 toneladas de gordura advinda do caroço da manga (PAREKH, PATRAVALE & PANDIT, 2012).

A produção de biossurfactante, utilizando *Starmarella bombicola*, a partir da porção oleica do caroço da manga mostrou-se significativa quando comparada a produção a partir de ácidos oleicos convencionais como fonte lipídica, produzindo 5% de sofrorolípídeo, em 100 g de substrato, em fermentação submersa e 15% em fermentação sólida (PAREKH, PATRAVALE & PANDIT, 2012).

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, com óleo de caroço de manga como substrato, produziram ramnolípídeo capaz de reduzir a tensão superficial da água para 30 mN/m (REDDY et al., 2016).

A partir de revisão da literatura constatou-se que a produção de biossurfactante utilizando caroço de manga ainda é escassa e pode ser melhor avaliada. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi avaliar a produção de biossurfactante por bactérias, utilizando como substrato o caroço de manga. Sendo a hipótese inicial de que existem bactérias com potencial de produção de surfactantes presentes no resíduo de manga e que o caroço da mesma pode ser um substrato alternativo para a produção de biossurfactante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Avaliar a produção de biossurfactantes por bactérias isoladas da polpa de manga por auto-fermentação e por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando como substrato o hidrolisado de caroço de caroço de manga.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias autóctones da polpa da manga;
- Testar as bactérias isoladas e a *P. aeruginosa* quanto a produção de biossurfactante;
- Identificar a melhor bactéria produtora de biossurfactante isolada;
- Caracterizar quimicamente o caroço e a polpa da manga;
- Avaliar os diferentes processos de hidrólises do caroço da manga
- Otimizar a produção de biossurfactantes;
- Caracterizar quimicamente o biossurfactante produzido.

3 METODOLOGIA

O projeto foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental – LMA, da UFSCar *campus* Sorocaba e dividido em 6 etapas. A etapa 1: coleta e caracterização dos resíduos; Etapa 2: enriquecimento da polpa de manga; Etapa 3: isolamento, seleção e identificação dos microrganismos produtores de biossurfactante; Etapa 4: hidrólises do caroço de manga; Etapa 5: otimização da produção de biossurfactante; Etapa 6: extração e caracterização do biossurfactante (Figura 1).

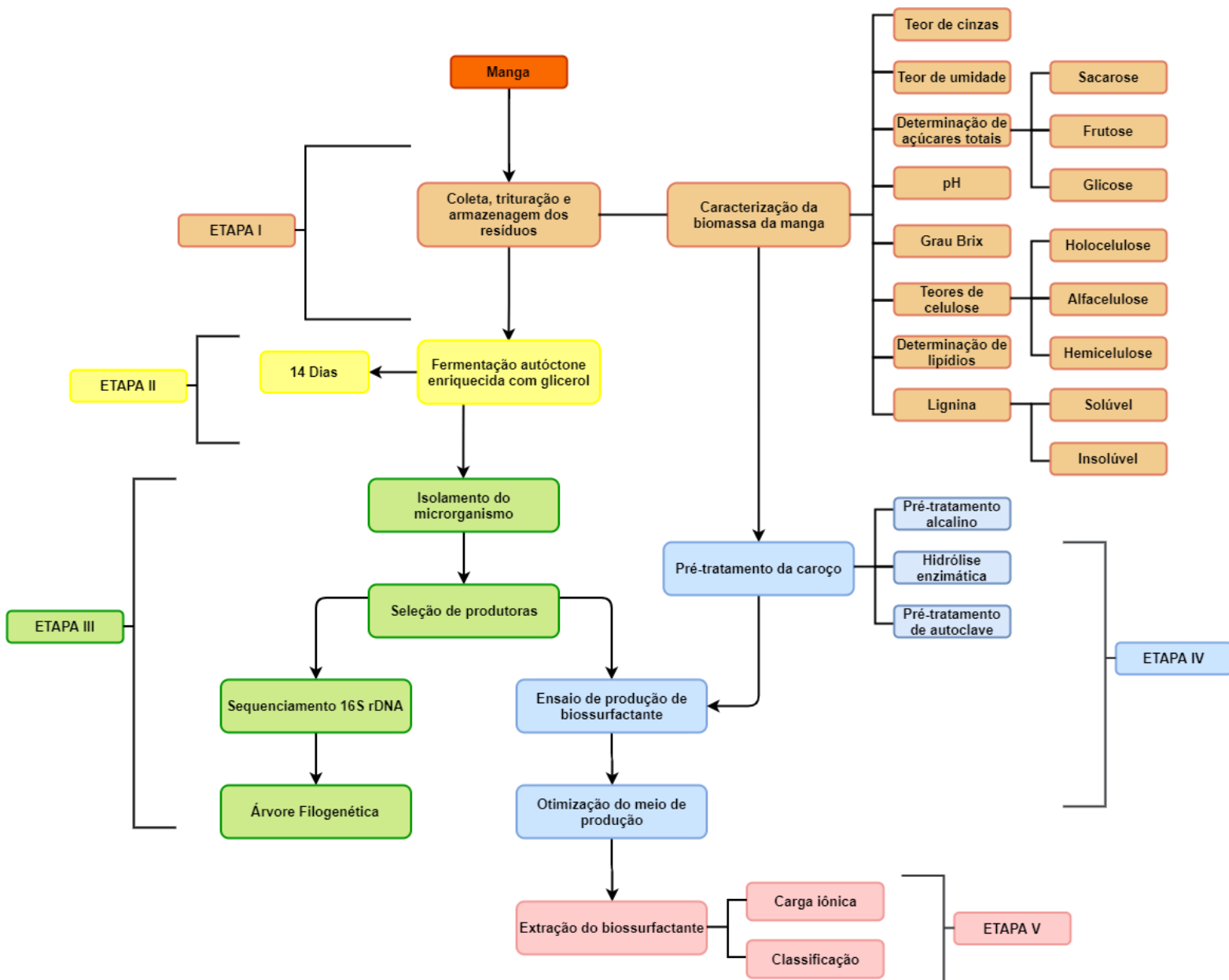


Figura 1: Fluxograma operacional da metodologia realizada.

3.1 Coleta e armazenagem do resíduo

Mangas (*Mangifera indica*) descartadas em feiras livres e comércios locais da cidade de Sorocaba-SP foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos sob refrigeração a 4°C até sua utilização para caracterização e em ensaios de produção de biossurfactantes.

A polpa de manga foi obtida por meio da retirada do caroço, mas a casca foi mantida. A homogeneização foi realizada em processador doméstico e em seguida armazenadas dentro de sacos herméticos estéreis sob refrigeração a 4°C.

Os caroços retirados foram desidratados em estufa a 60°C por 24 horas, em seguida triturados em moinho de facas do tipo Willey, peneirado em tamises entre 30 e 60 mesh e guardado em sacos herméticos em temperatura ambiente.

3.2 Enriquecimento da biomassa de manga e isolamento de microrganismos autóctones

Para obtenção de microrganismos autóctones adicionou-se 25 g/L da polpa homogeneizada em meio de Luria-Bertani (LB) em frascos reagentes de 500 mL com 250 mL de meio, mantidos a 34°C e 150 rpm por 5 dias.

Uma alíquota do fermentado foi transferida para meio LB, contendo 1% de glicerol (NAPP et al., 2018) durante sete dias, nas mesmas condições de temperatura e agitação, nova alíquota foi transferida nas mesmas condições anteriores por mais sete dias. Diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) foram realizadas e inoculadas por semeadura em superfície em placas de Petri contendo ágar nutriente, e incubadas por 48 horas a 35°C para promover o isolamento dos microrganismos. Após sucessivas estrias de esgotamento, colônias foram isoladas e, mantidas sob refrigeração a 4°C, gerando um banco de culturas de microrganismos autóctones em meio de enriquecimento.

3.3 Preparação do inóculo para ensaios e triagem de produção de biossurfactante

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 foi utilizada como controle positivo para produção de biossurfactantes. Os isolados e a *P. aeruginosa* foram usados como inóculos e estes foram padronizados da seguinte forma, com alça estéril de 10 µL as colônias foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 30 mL de caldo nutriente, no qual ficaram incubadas por 24 horas sob agitação a 150 rpm e 30°C. Após esse período, o caldo fermentado foi centrifugado por 10 minutos a 7.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em solução salina 0,9% (p/v) até atingir absorvância igual a 1 em comprimento

de onda de 600 nm (GEORGE & JAYACHANDRAN, 2008; DOMINGOS et al., 2015).

3.4 Avaliação do potencial dos isolados na produção de biossurfactante

Os ensaios para avaliar a produção de biossurfactantes foram realizados em frascos reagentes de 500 mL contendo 100 mL de meio composto por (g/L): 0,68 KH_2PO_4 ; 4,5 Na_2HPO_4 ; 0,1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6,5 NaNO_3 e 0,5 extrato de levedura em pH 7,0, como fonte de carbono, utilizou-se 3% de glicose. A concentração de inóculo foi de 5% (v/v) com absorbância de 1 (OD=600 nm). Esses frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm, 37°C por 3 dias (GEORGE & JAYACHANDRAN, 2008).

Para avaliar a produção de biossurfactantes foram analisados: índice de emulsão, colapso de gota, deslocamento de óleo (YOUSSEF et al., 2004; KUMAR et al. 2016) e placa de hidrocarboneto (VIGNESHWARANA et al., 2018).

3.4.1 Procedimentos analíticos

O índice de emulsão foi determinado em 0h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h de fermentação, os demais testes foram realizados ao final da fermentação. Amostras de 2 mL do caldo fermentado foram centrifugadas e 1 mL do sobrenadante livre de células foi misturado a 1 mL de querosene, agitadas em vórtex por 2 minutos e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas, para a medição do índice de emulsão. O índice foi medido pela divisão da altura total pela altura da emulsão multiplicado por 100 (TABATABAEE et al., 2005; MARCELINO et al., 2019).

Para o teste de colapso de gota, o óleo utilizado foi óleo de motor de veículo usado (queimado). Adicionou-se 2 μL de óleo em microplacas de poliestireno, essas foram mantidas em repouso por 1 hora a 37°C. Em seguida adicionou-se 5 μL do sobrenadante, para controle negativo foi utilizado 5 μL de água destilada e após 1 minuto as gotas foram examinadas visualmente (DATTA, TIWARI & PANDEY, 2018).

Para o teste de deslocamento de óleo, foram adicionados 40 mL de água destilada em placas de Petri e 1 mL de óleo de motor queimado, em seguida adicionou-se 100 μL do sobrenadante no centro da camada fina de óleo, a formação da zona clara indica a presença de biossurfactante, foram utilizados 100 μL de água como controle negativo (NAYAK et al., 2020).

O teste de placa de hidrocarboneto foi realizado em placas de ágar nutriente, na qual foram pulverizados 50 μL de querosene, em seguida as bactérias foram transferidas para as placas, estas foram incubadas por 72 horas a 35°C. A *E. coli* foi utilizada como controle

negativo (VIGNESHWARANA et al., 2018).

3.5 Identificação dos microrganismos produtores de biossurfactante

3.5.1 Extração e sequenciamento do DNA das amostras

Os microrganismos que apresentaram potencial em produzir biossurfactante foram submetidos a extração de DNA utilizando o *Dneasy PowerSoil Kit*, seguido da amplificação do DNA por meio da técnica de PCR. Após esse procedimento o produto foi purificado em coluna (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare), e enviadas para a UNESP de Jaboticabal - SP para sequenciamento com método de Sanger, utilizando os primers universais para o domínio Bactéria 27f 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 1100r 5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3' (LANE, 1991).

3.5.2 Análise das sequências

Os cromatogramas das sequências parciais do gene 16S rDNA resultantes foram conferidos e editados para minimizar a interferência de ruídos, no software Geneious V8. A partir da análise das sequências de ambas as fitas de DNA (*foward e reverse*), foram geradas sequências-consenso representativas de cada amostra, as quais foram comparadas com sequências de organismos depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

As sequências de DNA foram alinhadas por meio do programa Geneious V8, e para análise das distâncias genéticas utilizou-se o programa MEGA versão 10.2 (TAMURA et al., 2013), calculada com o modelo de Kimura dois-parâmetros ou K2P (KIMURA, 1980) e a árvore filogenética, foi gerada a partir das distâncias genéticas, utilizando o método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987), com valores de bootstrap que foram calculados com 1.000 reamostragens, também no programa MEGA 10.2.

3.6 Caracterização da biomassa de manga

3.6.1 Caracterização da polpa de manga

Para caracterizar a polpa da manga, utilizou-se a metodologia do Instituto Adolfo Lutz para caracterização de polpas de frutas, no qual se determinou: pH, cinzas, teor de umidade quantidade de açúcares (sacarose, frutose e glicose), Grau Brix, extrativos solúveis em água e teor de lipídios (IAL, 2008).

3.6.2 Caracterização do caroço

O caroço da manga desidratado e moído, foi caracterizado seguindo as normas

do National Renewable Energy Laboratory (NREL) correspondente a “Determinação de sólidos totais em biomassa e sólidos totais dissolvidos em amostras de processos líquidos”, da TAPPI - Technical Association of Pulp and Paper Industry (1991; 1993; 2002 & 2004). Nas quais se determinou: extrativos solúveis em água, teor de umidade, teor de lipídios, cinzas, teores de celulose (α -celulose, holocelulose e hemicelulose) e lignina Klason solúvel e insolúvel (SUDHAKAR & MAAINI, 1999).

3.7 Preparo do caroço de manga como substrato para a produção de biossurfactante

Com o intuito de disponibilizar açúcares presentes no caroço, o mesmo foi submetido a 3 diferentes processos de pré-tratamento: 1) pré-tratamento alcalino, 2) hidrólise enzimática (NIEVES et al., 2016) e 3) térmico por autoclavagem (RAO & VIRARAGHAVAN, 2002). As porções líquidas (hidrolisado) resultantes dos pré-tratamentos foram analisadas quanto à concentração de açúcares e posteriormente utilizados como substrato para os ensaios fermentativos de produção de biossurfactante.

Para a determinação dos açúcares redutores, alíquotas de 0,5 mL das frações líquidas obtidas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, em seguida essas foram transferidas para tubos de ensaio, nos quais se adicionou 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). As amostras foram aquecidas em banho-maria por 10 minutos a 95°C, posteriormente, resfriadas em banho de gelo e adicionados 4 mL de água destilada, por fim, foi medida a absorvância das amostras a 540 nm em espectrofotômetro calibrado com uma curva padrão de glicose (6g/L) (MILLER, 1959).

O pré-tratamento alcalino foi realizado em micro-ondas doméstico. Nesse processo misturou-se 1% (p/v) do caroço em uma solução de 0,5% NaOH (p/v), essa mistura foi colocada no micro-ondas a 400W por um minuto (RAVINDRAN et al., 2017). A porção líquida resultante foi avaliada pelo método de DNS (MILLER, 1959), para quantificação de açúcares redutores totais. A fração sólida foi lavada com água destilada até atingir pH 6,0 e seca a temperatura ambiente. Essa fração seca foi utilizada para a hidrólise enzimática (BINOD et al., 2012).

Para a hidrólise enzimática, utilizou-se 1 g de biomassa seca e 10 mL de solução contendo citrato de sódio 0,05 M, foram adicionados 158, 75 μ L da enzima comercial Novozymes Celluclast® (*Sigma-Aldrich*) e submetida a agitação de 200 rpm a 50°C por 5 dias (RAVINDRAN et al., 2017; CANDIDO, MORI & GONÇALVES, 2019). Após esse período, resfriou-se a amostra por 10 minutos, a fim de encerrar a atividade enzimática, e centrifugou-

se a 7.500 rpm por 10 minutos, o hidrolisado resultante foi utilizado para análise de açúcares redutores (FLEITA, EL-SAYED, RIFAAT, 2015), pelo método de DNS (MILLER, 1959).

O tratamento térmico do caroço foi realizado em autoclave onde 1 g de caroço moído foi adicionado em 10 mL de água destilada e autoclavado por 30 minutos a 120°C e 1 atm (RAO & VIRARAGHAVAN, 2002), a fração líquida foi analisada pelo método de DNS (MILLER,1959).

3.8 Ensaio da produção de biossurfactante utilizando o hidrolisado de caroço de manga como substrato

Para otimizar o meio de cultura, seguindo George e Jayachandran (2008), a produção de biossurfactante foi avaliada levando em consideração 4 variáveis, seguindo o planejamento fatorial 2^k: concentração de açúcares redutores (3 e 4 g/L), concentração de glicerol (0 e 1,5%), pH (6,0 e 7,0) e concentração de óleo de soja (0 e 1,5%). Obtendo-se as seguintes condições apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Planejamento fatorial 2^k das condições para os ensaios de produção de biossurfactante.

Condição	Concentração de açúcares redutores totais (g/L)	pH	Glicerol (%)	Óleo de soja (%)
1	3,0	7,0	1,5	1,5
2	4,0	7,0	1,5	1,5
3	4,0	6,0	0	1,5
4	3,0	6,0	0	0
5	3,0	6,0	1,5	1,5
6	4,0	6,0	1,5	1,5
7	4,0	7,0	0	0
8	3,0	7,0	0	0
9	3,0	7,0	1,5	0
10	4,0	7,0	1,5	0
11	4,0	6,0	0	0
12	3,0	6,0	0	1,5
13	3,0	6,0	1,5	0
14	4,0	6,0	1,5	0
15	3,0	7,0	0	1,5
16	4,0	7,0	0	1,5

Os ensaios foram realizados em triplicatas em tubos Falcon de 50 mL, contendo 5 mL de meio de cultivo e 5% de inóculo (v/v), por 3 dias a 150 rpm e 37°C, os tubos foram fechados com tampões de algodão. Como controle foi utilizado 3% de glicose como fonte de carbono (GEORGE & JAYACHANDRAN, 2008).

3.9 Monitoramento dos ensaios de produção de biossurfactante

O monitoramento dos ensaios de produção foi realizado após 72 horas de fermentação, no qual alíquotas de 1 mL de cada experimento foram coletadas e centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm a 20°C, o sobrenadante foi utilizado para a avaliação de produção de emulsão pelo índice de emulsão utilizando querosene (TABATABAEE et al., 2005; MARCELINO et al., 2019).

Para determinar diferenças significativas, os resultados dos índices de emulsão em querosene foram avaliados estatisticamente, em nível de significância de 5% ($p < 0,05$), usando a Análise de Variância (ANOVA) e comparação múltipla de teste de Tukey, disponíveis no software MiniTab 19 (PINTO, MARTINS & COSTA, 2009).

3.10 Fermentação e monitoramento da condição otimizada

A fermentação da condição otimizada foi realizada em triplicata, em frascos reagentes de 1.000 mL contendo 300 mL do meio otimizado de cultivo e 5% do inóculo (v/v), por 3 dias a 150 rpm e 37°C. O controle foi realizado nas mesmas condições, substituindo o hidrolisado de caroço de manga por 3% de glicose.

Durante a fermentação otimizada, avaliou-se, em triplicata, o índice de emulsão em 0h, 24h, 48h e 72h, de acordo com o item 3.8 e o consumo de açúcar pelo método de DNS (MILLER 1959) foi avaliado antes do início de fermentação e após as 72h.

O crescimento celular foi mensurado pelo método de biomassa seca, segundo Camargo et al. (2018), no qual alíquotas de 1 mL foram coletadas em 0h, 2h, 20h, 24h, 26h, 42h, 44h, 48h, 50h, 66h, 68h, 70h e 72h de fermentação, essas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado, as amostras foram colocadas em estufa de secagem a 105°C por 2h, após isso, o peso foi medido até se tornar constante. O crescimento celular foi calculado pela diferença de pesos entre os recipientes vazios e contendo a biomassa seca.

Testes de estabilidade em relação a temperatura, salinidade e pH foram realizados com o sobrenadante após 72h da fermentação otimizada. Para a estabilidade térmica, submeteu-se 15 mL de sobrenadante (pH 8,0 a 8,5), a temperaturas de 20°C, 40°C, 60°C e 80°C por 60 min,

após esse período as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente. Para a estabilidade quanto a concentração de sais, foram adicionadas soluções de NaCl com concentrações de 5 g/L, 10 g/L, 50 g/L e 100 g/L em tubos contendo 15 mL de sobrenadante (pH 8,0 a 8,5), na proporção de 1:1, mantidos em temperatura ambiente. Para a estabilidade referente ao pH, foram adicionadas soluções de NaOH (1M) e HCl (1M) em tubos com 15 mL de sobrenadante, atingindo pH 4, 6, 8 e 10, as amostras foram incubadas em banho-maria a 25°C por 30 min. Os índices de emulsão de todas as amostras foram avaliados após 24h usando querosene como fonte de hidrocarbonetos (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

3.11 Extração do biossurfactante

O sobrenadante da fermentação otimizada foi filtrado em membrana de 1,5 µm, em seguida adicionou-se quatro volumes de acetona a -15°C a um volume de sobrenadante, esse ficou em repouso por 12 horas a 4°C. Após esse período a amostra foi centrifugada novamente por 10 min a 2000 rpm e 4°C, o precipitado de biossurfactante foi seco em estufa de esterilização a 105°C para a evaporação da acetona residual (PRUTHI & CAMEOTRA, 2003).

A determinação da propriedade iônica do biossurfactante foi realizada a partir do método de difusão em ágar, de acordo com Meylheuc et al (2001), na qual foram inseridas em poços nas extremidades de uma placa de Petri com gel agarose a 1%, solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 20 mM (carga positiva) e solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 mM (carga negativa). O biossurfactante foi inserido no centro do gel.

A detecção de glicolipídios foi feita por meio do teste de ágar azul. 50 µL de biossurfactante bruto foram adicionados em poços feitos em placas de ágar azul, composto por 0,2 g de CTAB e 0,005 g de azul de metileno a 1 L de meio de sais minerais. O experimento ficou incubado por 24 - 48h a 35°C. O aparecimento de manchas azuis distintas ao redor dos poços indica a natureza glicolipídica do biossurfactante (IBRAHIM, 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da biomassa

Os resultados obtidos foram comparados com demais resultados encontradas na literatura, em relação a manga - polpa e caroço. A umidade da polpa foi de 85% (Tabela 2), semelhante aos parâmetros descritos por Okpala e Gibson-Umeh (2015) e Kuria et al. (2021). O pH encontrado foi de 8,3, (Tabela 2) valor esse bem maior do que os encontrados na literatura, isso pode estar relacionado com o estágio de maturação da fruta, visto que frutas mais maduras como as do presente trabalho tendem a ter menor acidez, além disso, o período de

armazenamento da fruta antes da caracterização pode ter influenciado o valor do pH, devido a oxidação do ácido presente na polpa (ISLAM et al., 2013).

Em relação aos extrativos solúveis, nenhum dado a respeito dessa caracterização na manga foi encontrado na literatura, porém sabe-se que o valor obtido de 85,42% (Tabela 2) representa um alto teor de minerais inorgânicos, açúcares e polissacarídeos (SILVÉRIO et al., 2006).

O Grau Brix, referente ao teor de sólidos solúveis, também está dentro dos parâmetros encontrados na literatura, entre 10° e 18° (Tabela 2). O teor de cinzas indica a quantidade de minerais presentes na fruta, sendo que o teor do presente estudo (2,56%) foi semelhante ao descrito por Kuria et al. (2021) de 2,09%, o valor de 0,8 % encontrado por Onimawo et al. (2003) foi considerado baixo (ONIMAWO et al., 2003; BARRÓN-GARCIA et al., 2021; KURIA et al., 2021).

O teor de lipídio foi de 4,24%, dentro da faixa encontrada nos trabalhos usados como referência no presente trabalho (1,06 a 6,6%) (ONIMAWO et al., 2003; FURTADO et al., 2009).

Quanto aos açúcares, foi determinado 35,89 mg/g de sacarose, 23,12 mg/g de frutose e 4,58 mg/g glicose. Os valores de açúcares também foram distintos entre as literaturas encontradas e o presente trabalho, sendo o menor valor. Segundo o Banco de Dados Australiano de Composição de Alimentos (NUTTAB), a manga possui 89 mg/g de sacarose, 34 mg/g de frutose, 6 mg/g de glicose, porém as variações estão relacionadas com o estágio de maturação da fruta, a qual sofre diversas alterações químicas e físicas conforme amadurece (BARRÓN-GARCIA et al., 2021).

Tabela 2: Dados comparativos da caracterização química da polpa de manga. (\pm = Desvio padrão).

Referências	Umidade (%)	pH	Grau Brix	Extrativos solúveis em água (%)	Teor de cinzas (%)	Teor de lipídios (%)	Sacarose (mg/g)	Frutose (mg/g)	Glicose (mg/g)
Presente Estudo	85,15	8,3	11	85,42	2,56	4,24	35,89	23,12	4,58
Narendra et al., 2021	70,32	4,3	-	-	1,83	-	-	-	-
Barrón-García et al., 2021	-	3,53 \pm 0,01	18,1 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
Ribeiro & Cristianini 2021	-	4,1 \pm 0,03	12,5 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-

Continuação da tabela 2: Dados comparativos da caracterização química da polpa de manga. (\pm = Desvio padrão).

Kuria et al., 2021	85.46 ± 0.77	4.06 ± 0.02	18.60 ± 1.33	-	2.09 \pm 0.18	-	-	-	-
Oliveira et al., 2017	83,54 \pm 0,05	4,28 \pm 0,08	15,0	-	-	-	-	-	-
Onimawo et al., 2003	80.0 \pm 2	5.84 \pm 0.01	10.0 \pm 0.45	-	0.8 \pm 0.1	1.06 \pm 0.04	-	-	-
Furtado et al., 2009	79,25	-	13	-	0,81	6,6	-	-	-
Gutierrez et al., 1976	-	-	-	-	-	-	67,1	55,5	14,8
Liu et al., 2013	-	3,95 - 5,98	-	-	-	-	43,0 - 103,2	21,7 - 46,8	10,6 - 25,8

O caroço foi caracterizado quanto a umidade - *in natura* e seco - pH, extrativos solúveis em água, teor de cinzas, teor de lipídios, teores de celulose - alfa-celulose, hemicelulose e holocelulose - e teor de lignina (Tabela 3).

A umidade também se encontra dentro dos parâmetros encontrados na literatura, variando de 44% a 59% *in natura*, enquanto na biomassa seca varia de 3% a 13%, assim como o teor de cinza que também se enquadra dentro dos parâmetros encontrados em demais estudos (ONIMAWO et al., 2003; OKPALA, GIBSON-UMEH, 2013; ONIAS & CAVALCANTI, 2014).

O teor de lipídios encontrado foi de 3,25%, dentro da faixa citada na literatura de 1,74 a 4,17% (LEGESSE & EMIRE, 2012; ONIAS & CAVALCANT, 2014).

A fonte de carbono é diretamente ligada a produção de biossurfactante, sendo que alguns microrganismos são capazes de incorporar ácidos graxos e demais compostos para a síntese de biossurfactante, ainda é observado que uma maior produção de biossurfactante é alcançada quando há compostos hidrofóbicos presentes no meio de cultivo (ABDALLA et al., 2007; FONTES, AMARAL & COELHO, 2008).

No caroço da manga foram determinados 23,61% de hemicelulose e 21,62% de lignina considerados os principais componentes de materiais vegetais, os quais estão arranjados de formas complexas que garantem a estabilidade e resistência do material perante a degradação e utilização por microrganismos. Essas estruturas são compostas, predominantemente, por glicose, monossacarídeos polimerizados, como xilose, arabinose, glucose e outros. A lignina é responsável pela forte união da celulose e hemicelulose, tornando a biomassa lignocelulósica

resistente e conservada, desse modo elevados teores de lignina impedem a degradação e liberação de açúcares presentes nas ligações de celulose e hemicelulose (SILVA et al., 2009). Estudos realizados por Cruz et al. (2011) e Monteiro et al. (2021) com caroço de manga, apontaram porcentagens de 18,34% de hemicelulose, 26,6% de lignina e 59,98% de celulose.

Tabela 3: Dados comparativos da caracterização físico-química do caroço de manga. (\pm = Desvio padrão).

Referências	Umidade (%)		pH	Extrativos solúveis em água (%)	Teor de cinzas (%)	Teor de lipídios (%)	Teor de celulose (%)			Teor de Lignina (%)
	<i>In natura</i>	Seco					Alfa-celulose	Holocelulose	Hemicelulose	
Presente Estudo	53,27	9,04	4,55	48,39	2,18	3,25	18,25 \pm 0,17	23,61 \pm 0,11	5,36	21,62
Okpala & Gibson-Umeh, 2013	-	5,09	-	-	1,20	-	-	-	-	-
Onimawo et al., 2003	-	3,36 \pm 0,12	-	-	2,26 \pm 0,11	-	-	-	-	-
Abdala et al., 2007	50,7	8,5	-	-	2,5	2,7	-	-	-	-
Legesse & Emire, 2012	-	13,01 \pm 0,02	5,91 \pm 0,07	-	0,85 \pm 0,02	1,74 \pm 0,06	-	-	-	-
Onias & Cavalcant, 2014	59,00 \pm 0,80	-	5,56 \pm 0,11	-	1,16 \pm 0,22	4,17 \pm 0,09	-	-	-	-
Cruz et al., 2011	-	-	-	-	-	-	-	59,98 \pm 0,1	-	26,6 \pm 1,0
Monteiro et al., 2021	-	-	-	-	0,29 \pm 0,02	-	-	45,60 \pm 0,25	18,34 \pm 0,83	29,42 \pm 0,38

As diferenças quanto aos parâmetros analisados, tanto da polpa quanto do caroço, podem ser explicadas pelo estágio de maturação da fruta, sendo que essa sofre diversas alterações físico-químicas em resposta às atividades enzimáticas ocorrentes no processo de amadurecimento, mediadas por polifenol oxidase, pectina metil esterase e peroxidase, entre outras (BARRÓN-GARCIA et al., 2021). Ademais, cada espécie da fruta apresenta

características físicas e químicas diferentes (ABDALA et al., 2007; ONIAS & CAVALCANTI, 2014). Além disso, nas literaturas comparadas, a fruta se encontrava madura, enquanto no presente estudo utilizou-se mangas muito maduras e até mesmo em decomposição, portanto as características relativas ao sabor e doçura são divergentes. Em relação ao caroço, geralmente, esse é estudado de forma segmentada, enquanto nesta pesquisa, o caroço foi moído e caracterizado por completo - tegumento e amêndoa.

4.2 Identificação e triagem dos isolados produtores de biosurfactantes

Quatro isolados de bactérias foram obtidos, dentre esses apenas um isolado com capacidade de produzir tensoativos. O isolado, denominado de NV04, foi identificado como *Brevibacillus borstelensis*, a partir da construção da árvore filogenética (figura 2) com base na sequência de gene 16S rDNA com 949 pb de comprimento, com alto suporte (bootstrap = 100).

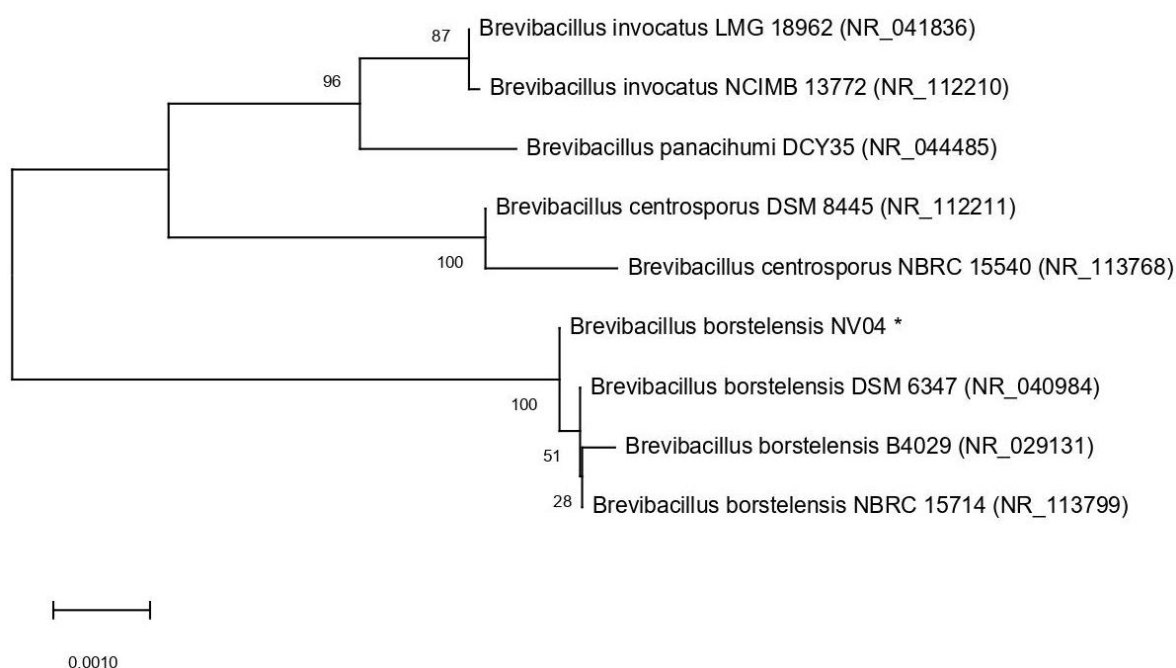


Figura 2: Árvore filogenética construída usando o método Neighbor-Joining, com base no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA do isolado NV04 com as sequências parciais do gênero *Brevibacillus* no GenBank, gerada no programa MEGA 10.2 com 1.000 bootstrap para o nível de confiança. *Isolado identificado, denominado NV04.

A divergência genética entre as sequências da espécie *B. borstelensis* foi baixa (0 - 0,0007%) corroborando a árvore filogenética, em que a sequência do isolado é da espécie *B. borstelensis*. (Tabela 4).

Tabela 4: Divergência genética obtida entre as sequências do gênero *Brevibacillus*, pelo modelo de Kimura dois-parâmetros. Valores em porcentagem (%)

	<i>B. invocatus</i>	<i>B. panacihumi</i>	<i>B. centrosporus</i>	<i>B. borstelensis</i>
<i>B. invocatus</i>	0	0,0062	0,0130-0,0175	0,0220 - 0,0245
<i>B. panacihumi</i>	-	-	0,0146-0,0180	0,0237 - 0,0254
<i>B. centrosporus</i>	-	-	0,002	0,0206 - 0,0285
<i>B. borstelensis</i>	-	-	-	0-0,0007

O *Brevibacillus borstelensis* apresentou máximo de índice de emulsão em querosene de 48,64% em 60 horas de fermentação, enquanto o controle com *P. aeruginosa* apresentou 57,50% em 72 horas de fermentação (Figura 3).

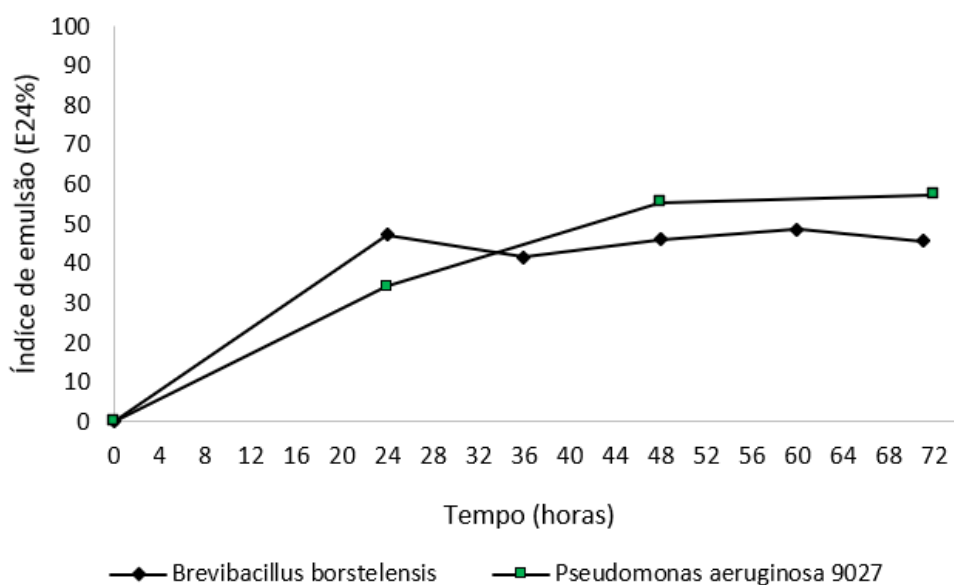


Figura 3: Índice de emulsão (em querosene) obtido com sobrenadante da fermentação utilizando o isolado *Brevibacillus borstelensis* e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

A capacidade emulsionante é um indicativo da presença de biossurfactante, entretanto, apesar de observada a emulsão só são considerados agentes emulsificantes aqueles capazes de manter uma emulsão de no mínimo 50% em 24h (WILLUMSEN & KARLSON, 1996), em vista disso, a *Pseudomonas aeruginosa* usada como controle foi melhor em produzir agente emulsificante considerável.

O segundo teste de triagem realizado foi o colapso de gota (Figura 4), esse teste se baseia na capacidade do biossurfactante em desestabilizar gotículas de líquido em uma superfície

oleosa, de modo que essa habilidade é correlacionada com a tensão superficial, visto que gotas com menores tensão superficial irá colapsar em superfícies oleosas (JAIN et al., 1991).

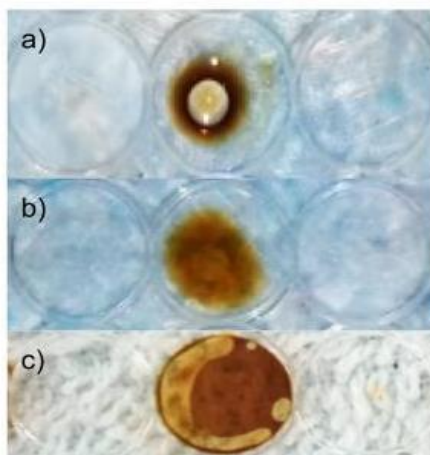


Figura 4: Teste de colapso de gota realizado com o sobrenadante. a) Água - controle negativo; b) *Brevibacillus borstelensis*; c) *P. aeruginosa*

O teste é considerado positivo quando o diâmetro da gota é no mínimo 1,0 mm maior que o diâmetro da gota da água - controle negativo (MARCELINO et al., 2019). Nesse teste, o composto produzido pela *Brevibacillus borstelensis* e pelos demais isolados não identificados não apresentou mudanças em relação ao diâmetro e se manteve abaixo do necessário para ser considerado positivo *Pseudomonas aeruginosa* produziu um composto secundário com maior capacidade de redução de tensão, portanto capaz de colapsar em superfície oleosa.

Utilizando a água como controle negativo no teste de deslocamento de óleo foi possível observar que o produto do isolado *B. borstelensis* foi capaz de reduzir a tensão interfacial água/óleo a partir da formação de um halo de diâmetro de 0,2 cm. Com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 observou-se halo com um diâmetro de 5,8 cm (figura 5). Ademais, os outros isolados não foram capazes de reduzir a tensão interfacial da água/óleo. O teste de deslocamento de óleo foi realizado para avaliar a capacidade do produto em reduzir a tensão interfacial entre as fases oleosas sendo que ao reduzir tal tensão, a razão entre as forças viscosas e capilares aumenta e com isso a pressão para deslocar e remover o óleo aumenta (AKBARI et al., 2018; KRYACHKO, 2018; ARAÚJO et al., 2019).

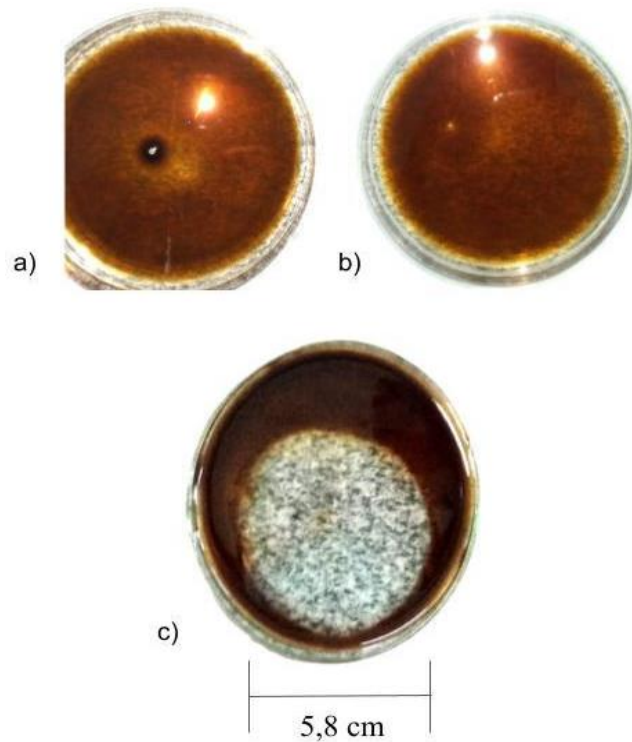


Figura 5: Teste de deslocamento de óleo. a) Água - controle negativo; b) *Brevibacillus borstelensis*; c) *P. aeruginosa*.

O teste da placa de hidrocarboneto utilizando uma cepa de *E. coli* como controle negativo, foi positivo para *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 6).

Ao realizar a microscopia do controle negativo e da *Pseudomonas aeruginosa*, foi possível identificar a formação de glóbulos de emulsão na cultura de *Pseudomonas*, indicando que essa foi capaz de produzir compostos responsáveis pela formação de emulsão em hidrocarbonetos. Os demais isolados não apresentaram a formação da zona de emulsão. Nesse teste é possível observar a formação de uma zona emulsificada, sendo essa caracterizada por uma zona mais clara na região interna da cultura bacteriana (VIGNESHWARAN et al., 2018).

Assim, optou-se por utilizar nos ensaios de otimização de produção de biossurfactantes a *P. aeruginosa* ATCC 9027.

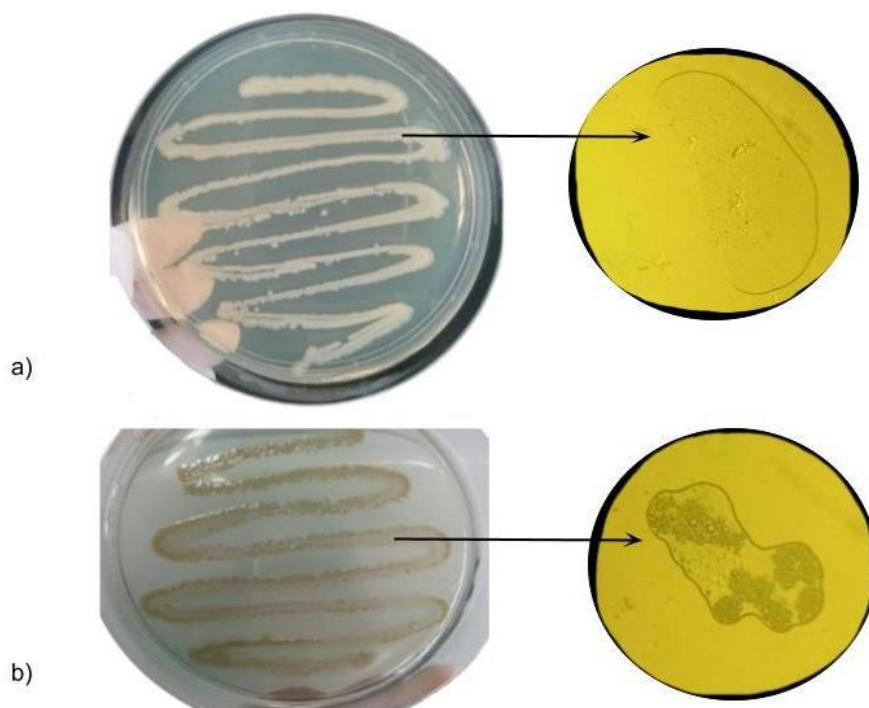


Figura 6: Teste de placa de óleo. a) *E.coli* - controle negativo; b) *P. aeruginosa*.

4.3 Pré-tratamento do caroço de manga

Para os ensaios de produção de biossurfactante utilizou-se o sobrenadante dos processos de tratamento do caroço de manga, a fim de obter a maior concentração de açúcar (Tabela 5), a partir de análises de DNS. Dessa forma observou-se que apesar da hidrólise enzimática ter disponibilizado 75,2 mg/g de açúcar, o pré-tratamento em autoclave foi escolhido como melhor tratamento, em relação ao custo-benefício, com 67 mg/g de açúcares reductores totais liberados, visto que o meio de cultura já teria que ser submetido à autoclave, além de não ser necessário adicionar produtos enzimáticos com custos elevados, assim evitando custos adicionais ao processo.

O pré-tratamento alcalino resultou na liberação de 65,7 mg/g de glicose, entretanto ao submeter a biomassa resultante desse pré-tratamento a hidrólise enzimática obteve-se uma liberação de glicose de 3,23 mg/g. A liberação reduzida de açúcar pela execução dos dois tratamentos em conjunto pode ser devido ao fato do caroço ter sido previamente moído, aumentando a área de superfície deste e, portanto, aumentando a quantidade de açúcar liberada no tratamento alcalino e reduzindo sua concentração na biomassa, outro fator que corrobora para isso, é a concentração de glicose de 75,2 mg/g liberada somente na hidrólise enzimática.

Tabela 5: Concentração de açúcares redutores totais nos diferentes pré-tratamentos e hidrólise. (\pm = Desvio padrão).

Pré-tratamento	[Açúcares redutores totais] (mg/g)
Caroço <i>in natura</i>	58,0 \pm 0,02
Pré-tratamento de autoclave	67,0 \pm 0,01
Pré-tratamento alcalino	65,7 \pm 0,05
Hidrólise enzimática	75,2 \pm 0,16
Hidrólise alcalina + hidrólise enzimática	3,23 \pm 0,08

São realizados pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos, a fim de disponibilizar a maior concentração de açúcares possíveis para os microrganismos, para que ocorra a produção de biossurfactantes (FONTES, AMARAL & COELHO, 2008). Sendo assim, o objetivo do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é liberar açúcares presentes no caroço e ainda aumentar a exposição da superfície de celulose para a realização da hidrólise deste, sendo o pré-tratamento alcalino o mais eficiente na remoção da lignina presente na biomassa, na remoção de grupos acetil e no inchaço da celulose aumentando a área da superfície para a ação enzimática da hidrólise (NIEVES et al., 2016; RAVINDRAN & JAISWAL, 2016; ZHANG, HAN & DONG, 2021). Ademais, a composição da biomassa, os pré-tratamentos empregados e o tempo de colheita, ou seja, estágio de maturação da fruta podem afetar a composição química da lignocelulose, deixando-a mais ou menos suscetível a ação dos tratamentos (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016).

No pré-tratamento térmico em autoclave é possível haver liberação de celulose, hemicelulose e glicose das ligações da lignina, o caroço de manga submetido a esse pré-tratamento liberou 67 mg/g de açúcares redutores totais.

4.4 Otimização da produção de biossurfactante a partir de hidrolisado de caroço de manga por *P. aeruginosa*

Os ensaios de produção de biossurfactante utilizando os açúcares provenientes da hidrólise do caroço de manga como fonte de carbono ocorreu seguindo o planejamento fatorial 2^k , para identificar a condição mais otimizada de produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, já que essa apresentou os melhores resultados na triagem. Ao todo, foram testadas 16 condições distintas (Tabela 1), descritas no item 3.8 da metodologia.

O monitoramento dos ensaios ocorreu após 72h de fermentação, no qual foi realizado o

teste de índice de emulsão usando a querosene. Os resultados obtidos permitiram avaliar a dependência e significância de cada variável na produção do biossurfactante, a partir da análise de variância (ANOVA), através do teste de comparação de médias de Tukey (*p*-valor), no software MiniTab 19, com uma significância de 5% ($p < 0,05$) (PINTO, MARTINS & COSTA, 2009) (Tabela 6).

Tabela 6: p-valor do efeito das variáveis independentes nas variáveis dependentes avaliadas para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* no caroço de manga.

Fator	p-valor
Açúcares redutores totais (g/L)	0,046
pH	>0,05
Glicerol (%)	0,000
Óleo de soja (%)	0,048
Açúcares redutores totais (g/L) * Glicerol (%)	>0,05
Açúcares redutores totais (g/L) * pH	>0,05
Açúcares redutores totais (g/L) * Óleo de Soja (%)	>0,05
Glicerol (%) * pH	>0,05
Glicerol (%) * Óleo de Soja (%)	0,003
pH * Óleo de Soja (%)	0,001
Açúcares redutores totais (g/L) * Glicerol (%) * pH	>0,05
Açúcares redutores totais (g/L) * Glicerol (%) * Óleo de Soja (%)	>0,05
Açúcares redutores totais (g/L) * pH * Óleo de Soja (%)	>0,05
Glicerol (%) * pH * Óleo de Soja (%)	0,007
R ²	0,778

Para a geração de emulsão os fatores significativos foram concentração dos açúcares redutores totais, presença ou ausência de glicerol e óleo de soja, enquanto o pH, isoladamente, não apresentou efeito estatisticamente significativo, porém a interação deste com óleo de soja foi significativa. Dentre a interação de dois fatores, ocorreu efeito sinérgico entre glicerol e óleo de soja; pH e óleo de soja. Ademais há uma interação sinérgica entre 3 fatores: glicerol, pH e óleo de soja.

Na figura 7a, foi observado que condições com menores valores de pH e menores ou nenhuma concentração de óleo de soja, apresentam um maior índice de emulsão. Da mesma forma, na Figura 7b indicou que concentrações de óleo soja menores que 0,9% e concentrações

de glicerol menores que 0,6% culminam para uma produção de uma maior emulsão.

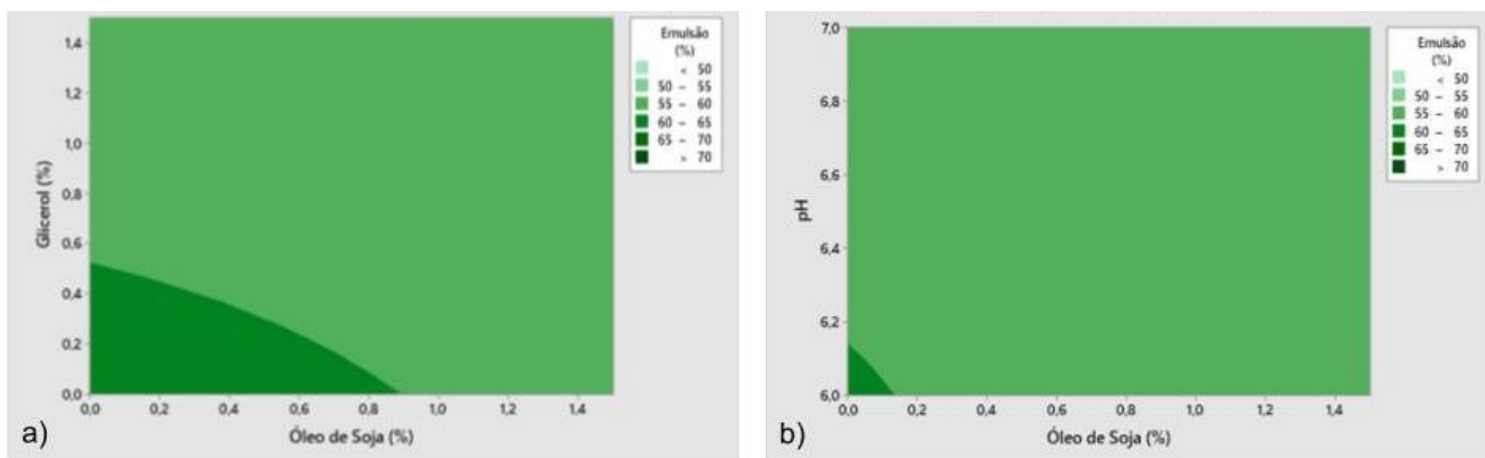


Figura 7: Gráficos de contorno do índice de emulsão em relação as variáveis. a) Glicerol (%) x óleo de soja (%); b) pH x óleo de soja (%).

Considerando, estatisticamente, 1,0 o caso ideal e 0 uma resposta fora dos limites aceitáveis, a análise obteve um resultado de Desejabilidade composta de 0,778, para a condição 4, cujas variáveis são: 3 g/L de açúcares redutores totais, pH 6,0; 0% glicerol e 0% óleo de soja, podendo assim, essas variáveis favorecem o alcance maximizado de emulsificação.

Quatro condições distintas apresentaram índice de emulsão superior a 60,0%, sendo elas: 4, 7, 11 e 15 com emulsões de $66,86\% \pm 3,1$, $60,04\% \pm 1,1$, $62,74\% \pm 3,39$ e $65,35\% \pm 1,13$, respectivamente, como apresentado na Figura 8.

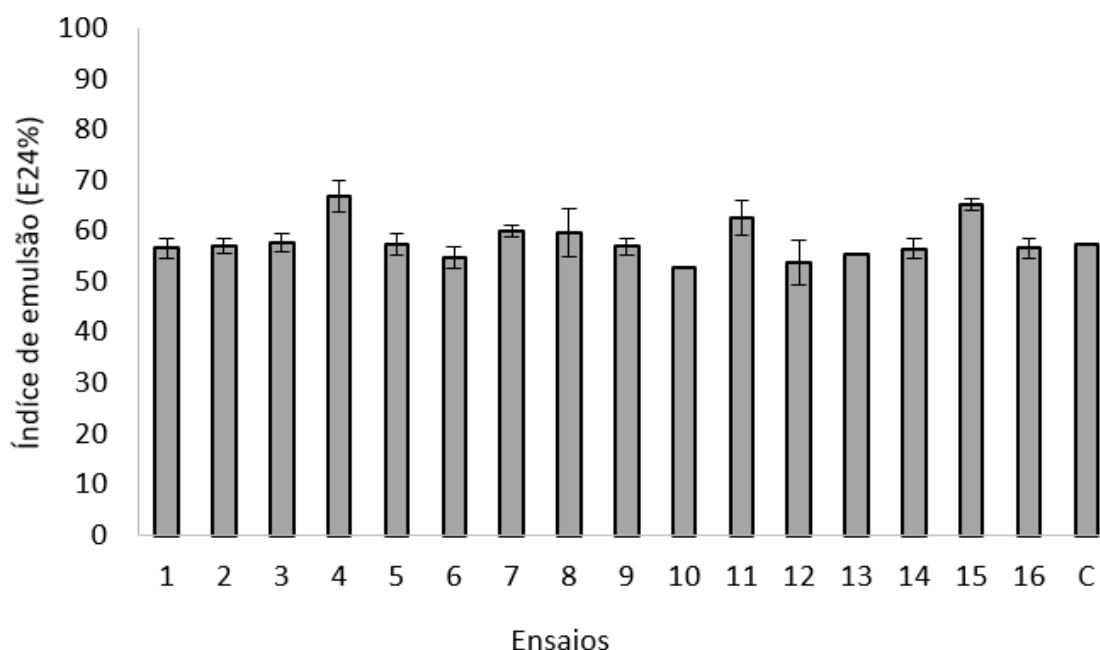


Figura 8: Índices de emulsão (em querosene) dos ensaios de produção de biossurfactante com hidrolisado de caroço de manga após 72 horas de fermentação, com a *P. aeruginosa* ATCC 9027. Ensaios de 1 a 16 segundo as condições descritas na Tabela 1; C = controle.

Com a condição 4 (3 g/L de açúcares redutores totais, pH 6,0, 0% de glicerol e 0% de óleo de soja) obteve-se o melhor índice de emulsão (66,86%) com o hidrolisado, sendo este 9,36% maior que a emulsão observada no controle com glicose.

Em estudos realizados por Reddy et al. (2016), foram utilizadas concentrações de 0,5%, 1,0%, e 1,5% (p/v) do substrato de óleo de manga, como resultado foi obtido a produção máxima de ramnolipídeos em 72h de fermentação utilizando 1,0% de substrato, ainda foi relatado uma emulsão máxima de $72,63\% \pm 0,47$ em óleo diesel, correspondendo a um valor de 5,77% a mais do que no presente estudo. Com o aumento do substrato para 1,5% foi observado uma diminuição no rendimento de biossurfactante, indicando que a concentração do substrato interferiu na produção do ramnolipídeo, corroborando com os resultados apresentados, em que o substrato a 3 g/L apresentou melhores resultados do que a uma concentração de 4 g/L de açúcares redutores totais.

Segundo George e Jayachandran (2008), a produção de biossurfactante por *Pseudomonas* diminui com valores de pH acima de 6,5, sendo que a faixa de pH testada foi de 5,0 a 7,5 em intervalos de 0,5, como resultado, a máxima produção de biossurfactantes com as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi com pH 6,5, contando com um índice de emulsão de 73,3% em querosene.

A utilização de óleo de soja como fonte de carbono para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de produzir biossurfactantes com índice de emulsão máxima de 70%, porém esse índice só foi relatado após 10 dias de fermentação e foi utilizado em uma concentração de 10 g/L. A diferença nos níveis de produção de biossurfactante usando diferentes tipos de óleos vegetais é relacionado com a presença ou não de ácidos graxos saturados e insaturados, assim como o comprimento das cadeias desses ácidos, influenciando na degradação dos óleos e consequentemente na produção do biossurfactante (ABBASI et al., 2012),

Concentrações de 2%, 3%, 5% e 7% de glicerol, foram avaliadas quanto a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* e a concentração a 3% apresentou os melhores resultados (SILVA et al., 2010).

O alto custo de produção de biossurfactantes está diretamente ligado a fonte de carbono utilizada pelos microrganismos, podendo atingir de 30-40% o valor total do custo de produção, portanto é economicamente viável utilizar substratos renováveis como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (DECESARO et al., 2013; FELIPE & DIAS, 2016; RIENZO, KAMALANATHAN & MARTIN, 2016; PARASZKIEWICZ et al., 2018).

4.5 Fermentação da condição otimizada

Durante a fermentação otimizada, foi monitorado o índice de emulsão da *P. aeruginosa* no meio contendo o hidrolisado do caroço de manga e no meio contendo glicose (Figura 9).

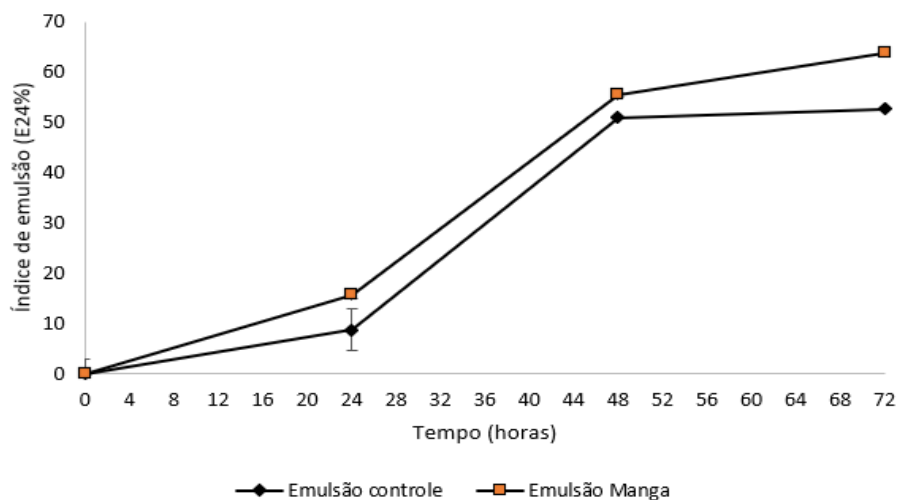


Figura 9: Índice de emulsão da condição otimizada, utilizando meio com glicose (controle) e meio com hidrolisado de caroço de manga.

O índice de emulsão máximo ($63,86\% \pm 0,5$) foi obtido em 72h de fermentação, enquanto o controle teve o maior índice de $52,63\% \pm 0,0$ no mesmo período de tempo.

A Figura 10 apresenta a micrografia, com aumento de 100x, da emulsão formada pelo biossurfactante e a querosene. O tamanho dos glóbulos e o grau de compactação se relacionam com a estabilidade do biossurfactante (DESAI & BANAT, 1997).

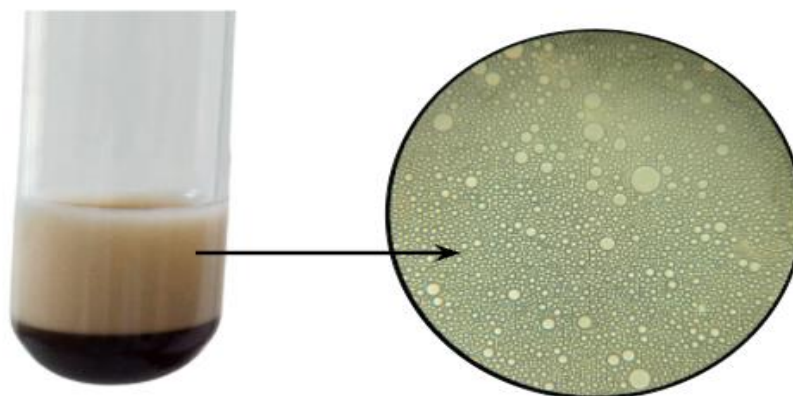


Figura 10: Micrografia da emulsão formada pelo biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo o hidrolisado de caroço de manga. Aumento de 100x.

Emulsões que apresentam glóbulos espaçados e maiores são menos estáveis, portanto, é possível identificar uma emulsão relativamente estável produzida pela *Pseudomonas aeruginosa* utilizando os açúcares provenientes do caroço de manga (DESAI & BANAT, 1997).

O crescimento celular foi monitorado e a maior concentração de biomassa seca foi obtida em 50h de fermentação com $9,5 \text{ g/L} \pm 1,0$ e $5,8 \text{ g/L} \pm 1,5$, para o tratamento com caroço de manga e controle com glicose, respectivamente, como apresentado na figura 11.

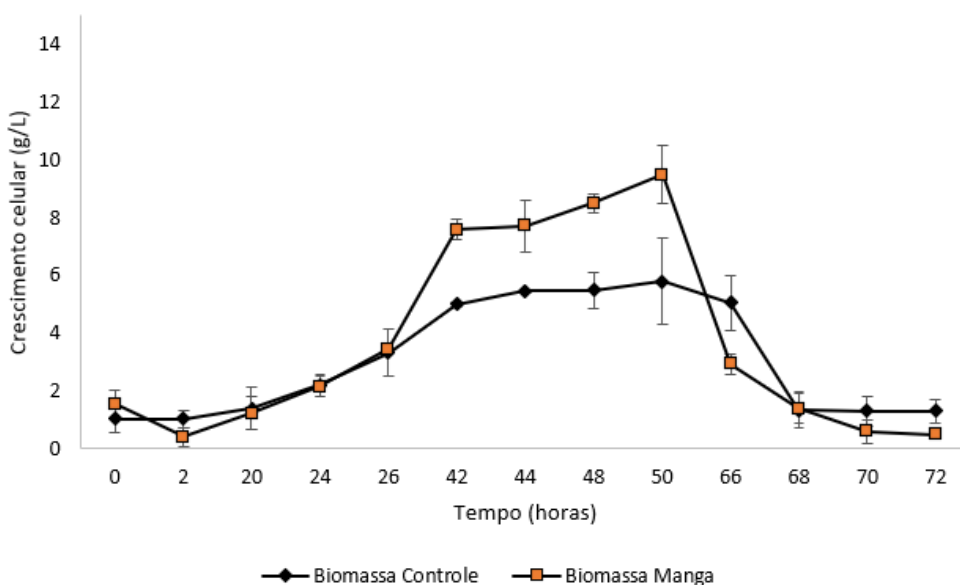


Figura 11: Crescimento celular na condição otimizada, pelo método de biomassa seca, do hidrolisado de caroço de manga e do controle com glicose.

É possível observar o crescimento exponencial, em ambos os experimentos, a partir da vigésima hora de fermentação. A *P. aeruginosa* teve o mesmo crescimento nos dois meios até 26h de fermentação, após esse período, o crescimento bacteriano foi superior no meio contendo os açúcares do caroço de manga até o tempo de 50 horas quando a curva entra em declínio. As *P. aeruginosas* iniciam a produção de biossurfactante nas fases de crescimento exponencial tardio e estacionário, sendo esse um subproduto do metabolismo da bactéria (REIS et al., 2010; SANT'ANA et al., 2018). Logo, entre 24 horas a 50 horas é possível observar a maior taxa de produção de emulsão de $15,78\% \pm 0,9$ a $55,55\% \pm 0,9$ e $8,76\% \pm 3,0$ a $50,97 \pm 4,1$ pelo meio contendo hidrolisado e no controle, respectivamente, sendo observado, nesse período, o índice de emulsão máximo na fase estacionária, pois se tem o esgotamento do nitrogênio, limitando o crescimento celular e maximizando a produção de biossurfactante, já que a via metabólica empregada produz acetil-coA, composto esse precursor da síntese de ácidos graxos e portanto de biossurfactantes, sendo assim esse é um metabólito secundário (SANT'ANA et al., 2018).

Na fase de declínio, ainda é observado o aumento dos índices de emulsão, no entanto tais aumentos são diminutos, sendo de $55,55\% \pm 0,9$ a $63,86\% \pm 0,5$ e $50,97 \pm 4,1$ a $52,63 \pm 0,0$ pelo meio com hidrolisado e controle, respectivamente.

Em estudos realizados por Dias e colaboradores (2018), utilizando cepas de *Bacillus subtilis* foi constatado que a maior concentração celular foi atingida quando a disponibilidade de fontes de carbono era maior, ademais a fonte de nitrogênio foi impactante no aumento taxa de crescimento bacteriano, sendo o extrato de levedura a fonte de nitrogênio mais comumente utilizada (DAS et al., 2009; SANT'ANA et al., 2018), resultando em uma concentração celular de 10,66 g/L em 32 horas de fermentação.

Quanto ao consumo de açúcares no início da fermentação, a concentração de açúcares redutores totais foi de $3,60 \text{ g/L} \pm 0,055$ em meio com hidrolisado de caroço de manga e no término da fermentação foi medido $0,76 \text{ g/L} \pm 0,005$ de açúcares redutores, apresentando um consumo de 78,80%, sugerindo que o substrato concentrado de, aproximadamente, 3 g/L foi o suficiente para o tempo de fermentação e produção de biossurfactante pelo microrganismo. Enquanto no meio controle com 30 g/L de glicose, a concentração inicial de açúcares redutores medidos foi de $17,92 \text{ g/L} \pm 0,031$ e após 72h, a concentração final foi de $11,66 \text{ g/L} \pm 0,084$, com consumo de 34,93%.

Por meio dos testes de estabilidade o biossurfactante produzido é termoestável (Figura 12a), visto que os valores dos índices de emulsão se mantiveram praticamente estáveis conforme o aumento de temperatura, variando de $51,03 \pm 3,36$ a $58,11 \pm 4,03$ no hidrolisado de manga e de $62,65 \pm 1,06$ a $50,58 \pm 0,80$ no controle de 30 g/L de glicose. Em relação a estabilidade em diferentes pH, notou-se que índices de emulsão acima de 50% foi mantida em uma faixa de pH entre 6 e 10 (Figura 12b), no entanto em pH abaixo de 6 pode ocorrer precipitação do biossurfactante, dificultando a formação de emulsão (REDDY et al., 2016). A estabilidade frente as mudanças de salinidade mostraram que o biossurfactante não foi capaz de formar emulsões significativas (acima de 50%) em elevadas concentrações de cloreto de sódio (Figura 12c).

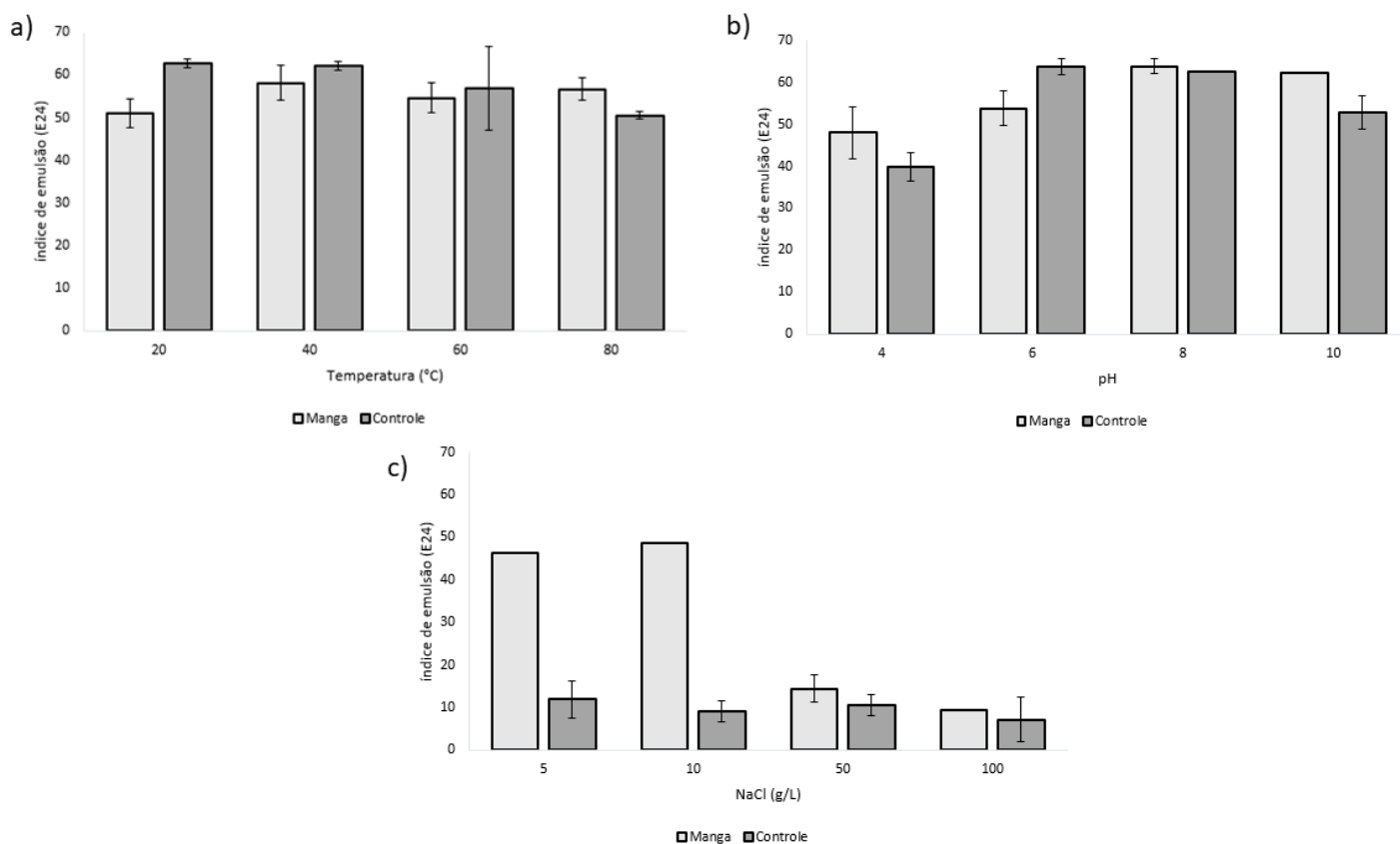


Figura 12: Estabilidade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*. a) Estabilidade em diferentes temperaturas; b) Estabilidade em diferentes pH; c) Estabilidade em diferentes concentrações de NaCl. Barras de desvio padrão/ausência de barra: desvio padrão = 0.

4.6 Caracterização química do biossurfactante produzido

Após a extração do biossurfactante da condição otimizada, foi realizado o teste de carga iônica (Figura 13). Com esse experimento foi possível verificar que, após 48h, existem linhas de precipitação no sentido do componente catiônico (CTAB).

Assim, foi possível afirmar que o produto do metabolismo secundário da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 possui natureza aniônica (MEYLHEUC et al., 2001; HAYTHAM & IBRAHIM, 2018).



Figura 13: Carga iônica do biossurfactante produzido em meio otimizado com hidrolisado de caroço de manga.

A detecção de natureza glicolípídica do biossurfactante se deu pelo teste de ágar azul, a presença de manchas azuis ao redor dos poços de ágar indica que esse biossurfactante produzido é um glicolípídio (Figura 14).

A formação da mancha azul ocorre devido a carga negativa dos glicolípídios que reagem com o complexo catiônico CTAB-azul de metileno. As *Pseudomonas sp.* são conhecidas pela produção de glicolípídios, mais especificamente, de ramnolipídeos, esses são ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar por ligações glicosídicas. Isso, pois as vias metabólicas envolvidas na síntese do biossurfactante são diversas e dependem intimamente da fonte de carbono utilizada pelo microrganismo. No caso da utilização de carboidratos como fonte de carbono apenas, as vias metabólicas lipogênicas e glicolíticas são supridas, resultando na formação do glicolípídio (COLLA & COSTA, 2003; FONTES, AMARAL & COELHO, 2008).

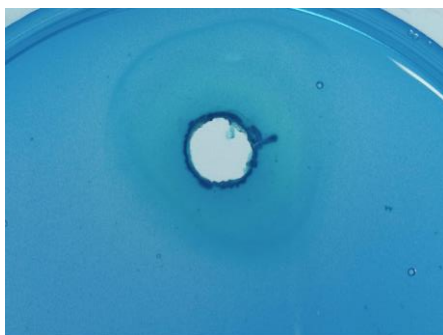


Figura 14: Teste de detecção de glicolípídio do biossurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa*.

5 CONCLUSÃO

O caroço de manga pode ser um substrato alternativo para produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*.

A hidrólise enzimática como único processo de pré-tratamento foi mais eficiente na liberação de açúcares. No entanto o pré-tratamento térmico com autoclavagem, apresentou ser uma alternativa pois é um processo já necessário para esterilização do meio de cultura, não adicionando gastos extras ao processo de produção e nem a necessidade de compostos enzimáticos.

Dos isolados obtidos da biomassa residual de manga apenas *Brevibacillus borstelensis* apresentou potencial em produzir surfactantes. Mas essa produção foi inferior à apresentada por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Utilizando *P. aeruginosa* determinou-se que a condição otimizada de produção de

biosurfactante foi obtida utilizando 3 g/L de açúcares redutores totais e pH 6,0 sem a necessidade de adição de glicerol e óleo de soja.

O biosurfactante produzido apresentou carga negativa, identificado como glicolípido, sendo provavelmente um ramnolípido.

REFERÊNCIAS

ABBASI, Habib et al. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant.: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 113, n. 2, p. 211-219, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.002>.

ABDALLA, Ahmed E.M. et al. Egyptian mango by-product 1. Compositional quality of mango seed kernel. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 103, n. 4, p. 1134-1140, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.017>.

ARAUJO, Livia Vieira de; FREIRE, Denise Maria Guimarães; NITSCHKE, Márcia. **Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas**. Química Nova, [s.l.], v. 36, n. 6, p.848-858, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000600019>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013000600019&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 07 out. 2019.

ARAUJO, Lorraine L.G.C. de et al. Microbial enhanced oil recovery using a biosurfactant produced by *Bacillus safensis* isolated from mangrove microbiota - Part I biosurfactant characterization and oil displacement test. **Journal Of Petroleum Science And Engineering**, [S.L.], v. 180, p. 950-957, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2019.06.031>.

AKBARI, Sweeta et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research And Innovation**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 81-90, jan. 2018. Editora Cubo. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>.

BANAT, Ibrahim M. et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 5, p. 697, 2014. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>

BARRÓN-GARCÍA, Oscar Y. et al. Physicochemical characterization and polyphenol oxidase inactivation of Acaulfo mango pulp pasteurized by conventional and ohmic heating processes. *Lwt*, [S.L.], v. 143, maio de 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111113>.

BARROS, Geraldo Sant'ana de Camargo (org.). **Hortifruti Brasil: anuário 2018-2019**. Anuário 2018-2019. 185. ed. Piracicaba: Esalq/usp, 2018. p. 41-42. Disponível em: <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/acessar/completo/anuario-2018-2019.aspx>. Acesso em: 10 fev. 2020.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante; QUADROS, Cedenir Pereira de; PASTORE, Gláucia Maria. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 979-985, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612008000400034>.

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K.U.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**. v.37, p.109-116, 2012.

CAMARGO, F. P. et al. Characterization of biosurfactants from yeast using residual soybean oil under acidic conditions and their use in metal removal processes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 10, p. 1–8, 2018.

CANDIDO, R.g.; MORI, N.r.; GONÇALVES, A.r.. Sugarcane straw as feedstock for 2G ethanol: evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. : Evaluation of pretreatments and enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 142, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111845>.

COLLA, Luciane Maria; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, n. 13, p. 85-103, 2003.

CRUZ, Alisson Costa da et al. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, [s. l], v. 34, n. 3, p. 385-389, 2011.

DALTIN, Decio. Introdução e primeiros conceitos. In: DALTIN, Decio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. Química, propriedades e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2019. p. 1-328.

DAS, Amar Jyoti; KUMAR Rajesh. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**, [s.l.], v 16, Nov 2019. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100450>.

DAS, Amar Jyoti; KUMAR, Rajesh. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 260, p.233-240, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.093>.

DAS, Palashpriya; MUKHERJEE, Soumen; SEN, Ramkrishna. Substrate dependent

production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 100, n. 2, p. 1015-1019, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.015>.

DATTA, Poulami; TIWARI, Pankaj; PANDEY, Lalit M.. Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 270, p. 439-448, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.047>.

DECESARO, Andressa; RIGON, Magali Rejane; THOMÉ, Antônio; COLLA, Luciane Maria. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, [s.l.], v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000700005>.

DESAI, J.D.; BANAT, I. M. Microbial Production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 61, pp. 47-64, 1997.

DIAS, Emanuele Cardoso et al. Utilização do extrato aquoso da algaroba na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Revista Saúde e Ciência Online**, [SI], v. 7, n. 2, p. 397-412, 2018.

DOMINGOS, Daniela Ferreira et al. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 7, p.3155-3167, 15 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6377-8>.

FELIPE, Lorena de Oliveira; DIAS, Sandra de Cássia. **Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens**. *Química Nova na Escola*, [s.l.], v. 39, n. 3, p.228-236, 11 dez. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>.

FELIX, Anne Kamilly Nogueira et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 175, p. 256-263, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>.

FLEITA, D., EL-SAYED, M., RIFAAT, D., Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*, **LWT - Food Science and Technology**, v.63, n.2, p.1236-1244, 2015.

FONTES, Gizele Cardoso; AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca; COELHO, Maria Alice Zarur. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000800033>.

GEORGE, Seba; JAYACHANDRAN, K.. Analysis of Rhamnolipid Biosurfactants Produced Through Submerged Fermentation Using Orange Fruit Peelings as Sole Carbon Source. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 158, n. 3, p. 694-705, 21 ago. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8337-6>.

GUTIERREZ, L. E. et al. Carboidratos solúveis em frutos: i. romã, manga, banana, jabuticaba, limão, abacaxi, laranja e cabeludinha. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, [S.L.], v. 33, p. 167-172, 1976. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0071-12761976000100013>.

HALL, Thomas A.. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Raleigh, p. 95-98. jan. 1999.

HAYTHAM, M.; IBAHIM, M. Characterization of biosurfactants produced by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 from used engine oil contaminated soil. **Egyptian Journal of Petroleum** v.27, p.21–29, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, 2008. 1020 p.

ISLAM, Md. Khairul et al. Changes in Acidity, TSS, and Sugar Content at Different Storage Periods of the Postharvest Mango (*Mangifera indica*L.) Influenced by Bavistin DF. **International Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 2013, p. 1-8, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/939385>.

JAIN, D.K. et al. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 271-279, ago. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90064-w](http://dx.doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-w).

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, jun. 1980.

KIRAN, G. Seghal et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**,

[s.l.], v. 73, n. 2, p.250-256, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.025>.

KRYACHKO, Yuriy. Novel approaches to microbial enhancement of oil recovery. **Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 266, p. 118-123, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.019>.

KUMAR, Arthala Praveen et al. Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. **3 Biotech**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 1-10, 4 fev. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-015-0362-x>.

KURIA, Martha Waithera et al. Physicochemical, antioxidant, and sensory properties of functional mango (*Mangifera indica* L.) leather fermented by lactic acid bacteria. **Journal Of Agriculture And Food Research**, [S.L.], v. 6, p. 100206, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100206>.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.), **Nucleic acids techniques in bacterial systematic**. New York: John Wiley, 1991. p. 115-175.

LEGESSE, Messay Birkneh; EMIRE, Shimelis Admassu. Functional and physicochemical properties of mango seed kernels and wheat flour and their blends for biscuit production. **African Journal Of Food Science And Technology**, [s. l.], v. 3, n. 9, p. 193-203, nov. 2012.

MARCELINO, P.r.f. et al. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 129, p.212-223, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.001>.

MAZARELI, Raissa Cristina da Silva et al. *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 247, p. 178-186, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.040>.

MEYLHEUC T.; VAN OSS C. J.; BELLON-FONTAINE M. N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, p. 822-832, 2001.

MEYLHEUC, T. et al. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria*

monocytogenes. **Colloids and Surfaces b: biointerfaces**, v.52, p.128-137, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959

MONTEIRO, Carla R.M. et al. Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, [S.L.], v. 253, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117274>.

NARENDRA, N. et al. Characterization and feasibility of biogas yield using mango fruit peels and durva grass. **Materials Today: Proceedings**, [S.L.], jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.479>.

NAYAK, Nisha S. et al. Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant *Bacillus licheniformis* LRK1. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 29, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101808>.

NIEVES, Danay Carrillo et al. Enzymatic hydrolysis of chemically pretreated mango stem bark residues at high solid loading. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 83, p. 500-508, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.079>.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. : propriedades e aplicações. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 772-776, set. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000500013>.

PINTO, Marta Heidtmann; MARTINS, Roberta Guimarães; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of Nutrients on Optimal Production of Biosurfactants by *Pseudomonas putida* - A Gujarat Oil Field Isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6 (1), 66-68, 2003.

OLIVEIRA, Darlane Wellen Freitas de et al. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 101, p. 34-43, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.011>.

OLIVEIRA, Gabriel Pacheco de Carvalho; PALMIERI, Fernanda Geraldini. Manga. In: OKPALA, L.c.; GIBSON-UMEH, G.i.. Physicochemical Properties of Mango Seed Flour.

Nigerian Food Journal, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 23-27, 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0189-7241\(15\)30052-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0189-7241(15)30052-7).

OLIVEIRA, Marcela Nobre et al. Caracterização físico-química de polpas de manga ‘Rosa’ liofilizadas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S.L.], v. 12, n. 5, 12 mar. 2018. Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas. <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v12i5.4756>.

ONIAS, Eliane Alves; CAVALCANTI, Mônica Tejo. Obtenção e caracterização do amido do endocarpo da manga Tommy Atkins proveniente do resíduo agroindustrial. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 9, n. 5, p. 60-63, dez. 2014.

ONIMAWO, I. A. et al. Physicochemical and nutrient evaluation of African bush mango (*Irvingia gabonensis*) seeds and pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**, 58(3). . 1–6. 2003. doi:10.1023/b:qual.0000040320.335.

PARASZKIEWICZ, Katarzyna et al. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal Of Environmental Management**, [s.l.], v. 209, p.65-70, 1 mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.033>.

PAREKH, Vishal J.; PATRAVALE, Vandana B.; PANDIT, Aniruddha B.. **Mango kernel fat: a novel lipid source for the fermentative production of sophorolipid biosurfactant using starmerella bombicola nrri-y 17069. A novel lipid source for the fermentative production of sophorolipid biosurfactant using Starmerella Bombicola NRRL-Y 17069.** 2012. Disponível em: <https://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/mango-kernel-fat-a-novel-lipid-source-for-the-fermentative-production-of-sophorolipid-biosurfactant-using-starmerella-bo.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2020.

PURWASENA, Isty Adhitya et al. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [s.l.], v 183, dez. 2019. Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2019.106383>

RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 2, p. 165–171, 2002.

RAVINDRAN, Rajeev et al. A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers’ spent grain. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 248, p. 272-279, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>.

RAVINDRAN, Rajeev; JAISWAL, Amit Kumar. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 199, p. 92-102, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>.

REDDY, K. Sathi et al. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as a biocontrol agent. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 221, p. 291-299, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.041>.

RIBEIRO, Luma Rossi; CRISTIANINI, Marcelo. Effect of high pressure combined with temperature on the death kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores and on the quality characteristics of mango pulp. **Lwt**, [S.L.], v. 152, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112266>.

RIENZO, M.A. Díaz de; KAMALANATHAN, I.D.; MARTIN, P.J.. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 51, n. 7, p. 820-827, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.007>.

ROVINA, Fernanda; EHRHARDT, Daniela Diniz; TAMBOURGI, Elias Basile. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia Plena**, [s.l.], v. 14, n. 4, 18 maio de 2018. Associação Sergipana de Ciência. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2018.044201>.

SAITOU, N; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.. : a new method for reconstructing phylogenetic trees.. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 406-425, jul. 1987. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

SANT'ANA, Gizele Cardoso Fontes et al. Produção de Biossurfactante. In: NASCIMENTO, Rodrigo Pires do et al (org.). **Microbiologia Industrial: bioprocessos**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. Cap. 15. p. 836-874.

SANTOS, C. M. et al. Application of orange peel waste in the production of solid biofuels and biosorbents. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 469–479, 2015.

SILVA, Rafael et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000300010>.

SILVA, S.N.R.L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [S.L.], v. 79, n. 1, p. 174-183, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>.

SILVA, Tiago José Jesus da; FERREIRA, Monaliza de Oliveira; LIMA, João Ricardo Ferreira de. A competitividade das exportações de manga e uva do Vale Submédio do São Francisco. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 152-164, dez. 2016.

SILVÉRIO, Flaviano Oliveira et al. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1009-1016, 2006.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J.; Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. **National Renewable Energy Laboratory**. 2008.

SOARES, Camylla Carneiro et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 using papaya (*Carica papaya* L.) waste as substrate: viability studies and ph influence of the culture medium. : Viability studies and pH influence of the culture medium. **African Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 30, p. 928-937, 25 jul. 2018. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2018.16408>.

SUDHAKAR, D.; MAAINI, S. Isolation and characterization of mango peel pectins. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 24, p. 209-227, 1999.

SULLIVAN, Elise R. **Molecular genetics of biosurfactant production**. 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166998800578>>. Acesso em: 06 dez. 2019.

SUWANSUKHO, Phitnaree et al. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. **Songklanakarín Journal Of Science And Technology**. Tailândia, p. 87-93. abr. 2008.

TABATABAEE, Akram et al. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Journal Of Environmental Health Science & Engineering**. [S.I.], p. 6-12. 2005. Disponível em: <http://www.bioline.org.br/pdf?se05002>. Acesso em: 25 mar. 2020.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 16 out. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T13 om-54 - Tappi Test Methods, 1991.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T211 om-93 - Tappi Test Methods, 1993.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T222 om-02 - Tappi Test Methods, 2002.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T222 om-88 - Tappi Test Methods, 1988.

TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standart Method T257 m-85 - Tappi Test Methods, 1985.

THAVASI, Rengathavasi; BANAT, Ibrahim M.. Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Sources. In: MULLIGAN, Catherine N.; SHARMA, Sanjay K.; MUDHOO, Ackmez. **Biosurfactants: Research Trends and Applications**. Boca Raton: Crc Press, 2014. Cap. 5. p. 125-140. Disponível em: <http://uir.ulster.ac.uk/30813/1/My_Chapter_5_Biosurfactant_book.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2019.

THOMPSON, J. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 15 dez. 1997. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>.

TUGRUL, Tugba; CANSUNAR, Emir. Detecting Surfactant-producing Microorganisms by the Drop-collapse Test. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 6-7, p. 851-853, out. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-5958-y>.

VIGNESHWARAN, C. et al. Potential of *Brevibacillus* sp. AVN 13 isolated from crude oil contaminated soil for biosurfactant production and its optimization studies. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 4347-4356, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.036>.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1996.

YOUSSEF, Noha H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.339-347, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>.

ZHANG, Haiyan; HAN, Lujia; DONG, Hongmin. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: experimental and modeling studies. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 140, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>.