



Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando resíduos de cacau (*Theobroma cacao* L.) e seu potencial na dispersão de óleo

Joane de Almeida Alves¹

 <https://orcid.org/0009-0002-1821-9206>

Emilly Cruz da Silva¹

 <https://orcid.org/0000-0001-9755-4875>

Giulian César da Silva Sá¹

 <https://orcid.org/0000-0002-4734-4228>

Alan Moura Feio¹

 <https://orcid.org/0000-0001-5087-1857>

Evelly Oliveira Ramos¹

 <https://orcid.org/0009-0005-9794-6111>

Glenda Soares Gomes¹

 <https://orcid.org/0009-0009-2194-0978>

Lucas Mariano de Siqueira Pimentel¹

 <https://orcid.org/0009-0003-8225-1144>

Sidnei Cerqueira dos Santos^{1,*}

 <https://orcid.org/0000-0003-1169-256X>

* Contato principal

¹ Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará/Unifesspa, Marabá/PA, Brasil. <joaneaa@unifesspa.edu.br, emillycruzds@gmail.com, giuliancesarsa@gmail.com, alan.moura@unifesspa.edu.br, evelly.ramos@unifesspa.edu.br, glenda.soares@unifesspa.edu.br, lucas.pimentel@unifesspa.edu.br, sidnei.cerqueira@unifesspa.edu.br>.

Recebido em 27/05/2024 – Aceito em 16/12/2024

Como citar:

Alves JA, Silva EC, Sá GCS, Feio AM, Ramos EO, Gomes GS, Pimentel LMS, Santos SC. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando resíduos de cacau (*Theobroma cacao* L.) e seu potencial na dispersão de óleo. Biodivers. Bras. [Internet]. 2025; 15(1): 1-12. <https://doi.org/10.37002/biodiversidadebrasileira.v15i1.2637>.

Palavras-chave: Amazônia; fontes renováveis; bactéria; tensoativo.

RESUMO – Biossurfactantes (BS) são moléculas de relevância industrial significativa, reconhecidas por suas propriedades tensoativas e potencial para produção por microrganismos que utilizam fontes alternativas de carbono e energia. O cacau (*Theobroma cacao* L.), fruto amazônico amplamente utilizado como matéria-prima na produção de chocolate, representa um recurso alternativo exemplar. Apesar da falta de valor econômico atribuído aos resíduos provenientes do processamento do cacau, esses subprodutos podem ser substratos valiosos para a produção de BS. Este estudo avaliou a eficácia da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* BM02 na produção de BS, usando resíduos de cacau como matéria-prima, bem como investigou o potencial do BS como agente dispersante de óleo. O BS bruto exibiu uma concentração de ramnolipídios de 3,06 g/L e índice de emulsificação de 60%, influenciando significativamente na capacidade de dispersão do óleo de motor, que atingiu 2,5 cm²/min após 10 minutos. Esses resultados evidenciam a viabilidade, inovação e sustentabilidade da utilização de resíduos de cacau como matéria-prima para a produção de BS, com aplicações promissoras na biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos. Ademais, essa abordagem contribui diretamente para a economia circular na Amazônia, pois a utilização sustentável de resíduos agroindustriais demonstra potencial para aumentar o valor agregado dentro da cadeia de produção local, proporcionando, assim, implicações sociais importantes ao promover o crescimento econômico na região.



Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* using cocoa (*Theobroma cacao* L.) residue and its potential in oil dispersion

Keywords: Amazon; renewable sources; bacterium; tensoactive.

ABSTRACT – Biosurfactants (BS) are molecules of significant industrial relevance, recognized for their surfactant properties and potential for production by microorganisms utilizing alternative carbon and energy sources. Cocoa (*Theobroma cacao* L.), an Amazonian fruit extensively utilized as a raw material in chocolate production, presents an exemplary alternative resource. Despite the lack of economic value attributed to the residues generated from cocoa processing, these by-products can be transformed into valuable substrates for BS production. This study evaluates the efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* BM02 in producing BS, leveraging cocoa waste as the primary substrate, and further investigates the potential of the resulting BS as an oil dispersant. The crude BS exhibited a rhamnolipid concentration of 3.06 g/L and an emulsification index of 60%, significantly influencing its oil dispersion capacity, measured at 2.5 cm²/min after 10 minutes. These findings underscore the viability, innovation, and sustainability of utilizing cocoa residues as feedstock for BS production, with promising applications for bioremediation of hydrocarbon-contaminated areas. Furthermore, this approach contributes directly to the circular economy in the Amazon, as the sustainable utilization of processing waste demonstrates potential for enhancing added value within the local production chain, thus providing important social implications by fostering economic growth in the region.

Producción de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* a partir de residuos de cacao (*Theobroma cacao* L.) y su potencial en dispersión oleosa

Palabras clave: Amazonía; recursos renovables; bacteria; tensoactivo.

RESUMEN – Los biosurfactantes (BS) son moléculas de gran relevancia industrial, reconocidas por sus propiedades tensoactivas y su potencial para ser producidas por microorganismos que utilizan fuentes alternativas de carbono y energía. El cacao (*Theobroma cacao* L.), un fruto amazónico ampliamente utilizado como materia prima en la producción de chocolate, representa un recurso alternativo ejemplar. A pesar de la falta de valor económico atribuido a los residuos generados del procesamiento del cacao, estos subproductos pueden transformarse en sustratos valiosos para la producción de BS. Este estudio evalúa la eficacia de *Pseudomonas aeruginosa* BM02 en la producción de BS, aprovechando los residuos de cacao como sustrato principal, y además investiga el potencial del BS resultante como agente dispersante de aceite. El BS crudo presentó una concentración de ramnolípidos de 3,06 g/L y un índice de emulsificación del 60%, influyendo significativamente en su capacidad de dispersión de aceite, medida en 2,5 cm²/min después de 10 minutos. Estos hallazgos subrayan la viabilidad, innovación y sostenibilidad de utilizar los residuos de cacao como materia prima para la producción de BS, con aplicaciones prometedoras para la biorremediación de áreas contaminadas por hidrocarburos. Además, este enfoque contribuye directamente a la economía circular en la Amazonía, ya que la utilización sostenible de los desechos del procesamiento muestra potencial para aumentar el valor agregado dentro de la cadena productiva local, brindando así importantes implicaciones sociales al fomentar el crecimiento económico en la región.

Introdução

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore perenifólia pertencente à família Malvaceae, cuja origem e importância nutricional e comercial são

significativas para o Brasil [1]. Atualmente, o estado do Pará é o maior produtor nacional de cacau, com uma arrecadação estimada entre 1,8 e 3,5 bilhões de reais [2]. Apesar de sua relevância econômica, a industrialização do processamento do cacau gera uma quantidade massiva de resíduos que não acompanha



o consumo do fruto, sendo geralmente descartados de maneira inadequada nas áreas adjacentes às plantações. Embora pequenos agricultores utilizem esses resíduos como fertilizantes naturais, as grandes indústrias ainda não têm dado a devida atenção a esse problema, resultando em degradação do solo e propagação de pragas [3]. Para mitigar tais danos ambientais e atender às diretrizes da Política Nacional de Resíduos Sólidos, é crucial repensar as práticas de cultivo e estabelecer destinações ambientalmente corretas para esses resíduos [4].

Os resíduos provenientes do processamento do cacau, assim como o fruto, possuem alto valor nutricional, o que pode favorecer sua valorização em diversas aplicações biotecnológicas [5]. A busca por soluções sustentáveis para o gerenciamento de resíduos alimentares constitui um dos principais desafios contemporâneos. Nesse sentido, pesquisas recentes têm atribuído valor a esses

resíduos, empregando-os como matéria-prima no desenvolvimento de bioprodutos industriais, como os biossurfactantes (BS).

Recentemente, houve um crescente interesse em explorar matérias-primas mais econômicas e sustentáveis para a produção de BS, com ênfase nos resíduos industriais e domésticos. Essa abordagem não apenas se revela vantajosa em termos de custo, como também contribui para a redução dos resíduos ambientais gerados em ritmo acelerado. O uso de diferentes resíduos, incluindo águas residuais do processamento da mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, espigas de milho, palha de arroz, talos de banana, assim como cascas de milho, abacaxi, beterraba e laranja, tem apresentado resultados promissores em processos fermentativos para a produção de BS [6][7][8][9]. Alguns dos estudos recentes que relatam a fabricação verde de BS por meio da valorização de resíduos biológicos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Fabricação verde de biossurfactantes por meio da abordagem de valorização de resíduos vegetais.

Resíduo	Microrganismo	BS	Aplicação	Referência
Palha de arroz	<i>Serratia nematodiphila</i>	Glicolipídio	Emulsificante e antimicrobiano	[7]
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ramnolipídio	Biorefinaria	[8]
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>	Soforolipídio	Indústria alimentar e cosmética	[9]
Cascas de abacaxi	<i>Bacillus subtilis</i>	ND	Emulsificante	[10]

ND = classe de biossurfactante (BS) não determinada.

Os BS são moléculas anfipáticas com propriedades tensoativas semelhantes às dos surfactantes derivados do petróleo, mas apresentam vantagens como menor toxicidade, alta biodegradabilidade e produção a partir de fontes renováveis, como bactérias [10]. Para a produção de BS, as bactérias necessitam de fontes de carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo, que são abundantes em diversos resíduos vegetais.

Os resíduos de origem agroindustrial têm sido indicados como uma fonte promissora de nutrientes para a produção de BS [11]. Devido à sua natureza ecologicamente amigável, os BS são considerados potenciais substitutos dos surfactantes químicos em várias aplicações industriais, incluindo as áreas farmacêutica, cosmética e de biorremediação [12] [13], conforme esquematizado na Figura 1.

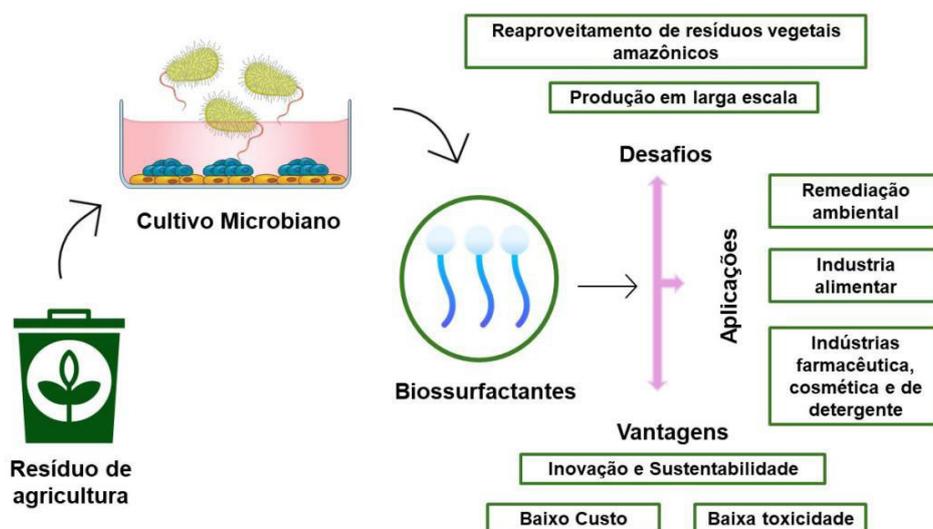


Figura 1 – Produção de biossurfactantes microbianos a partir de resíduos agroindustriais: vantagens, desvantagens e aplicações. Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

O mercado global de BS vem crescendo exponencialmente, apesar das limitações associadas aos custos de produção, especialmente em relação às matérias-primas, que podem representar até 30% do valor final do produto [14]. Para superar essas dificuldades, pesquisas têm demonstrado que o uso de fontes energéticas alternativas e renováveis, como os resíduos agroindustriais, pode reduzir consideravelmente os custos do processo [3].

As propriedades físico-químicas dos BS, incluindo sua capacidade de reduzir a tensão superficial e de formar emulsões entre água e óleo, são de alto interesse para aplicações em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados [15]. Esse problema não é recente; desde o início do século XX, com a proeminência dos grandes petroleiros, os derramamentos de óleo têm representado uma das principais fontes de poluição nos ecossistemas aquáticos, afetando negativamente o turismo e as comunidades pesqueiras [16][17]. Nesse contexto desafiador, devido à sua compatibilidade ambiental, os BS surgem como promissores agentes biorremediadores de ambientes contaminados por hidrocarbonetos, desempenhando um papel na dispersão do óleo, transformando-o em gotículas menores para degradação por microrganismos [14]. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de BS por *Pseudomonas aeruginosa* BM02 utilizando resíduos de cacau como matéria-prima, além de investigar seu potencial como agente dispersante de óleo.

Materiais e Métodos

Cepa bacteriana

A cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* BM02, produtora de BS do tipo ramnolipídio, foi isolada do solo superficial de uma área de mineração de bauxita no estado do Pará [6]. O uso da referida bactéria está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen, nº A4DA401). A cepa é mantida em conservação em solução de glicerol a -20 °C, no Laboratório de Bioensaios e Bioprocessos (L@Bio) da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa), em Marabá-PA, Brasil.

Obtenção e preparo do resíduo vegetal

O resíduo de cacau utilizado neste estudo foi fornecido pela fazenda Chácara Parabucana, situada em São Domingos-PA, Brasil. A preparação do resíduo foi realizada conforme as diretrizes estabelecidas no pedido de patente de invenção (BR1020230152090; fase de sigilo), depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A utilização do resíduo vegetal está registrada no SisGen sob o nº AA28D2F.

Produção do BS

A produção do BS foi conduzida em frascos Erlenmeyer contendo meio salino vegetal (MSV), composto pelos seguintes componentes: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, com pH ajustado para 7,0, utilizando o resíduo de cacau como única fonte de carbono e energia, em concentrações ideais de cultivo (g/L), conforme a formulação registrada no INPI (BR1020230152090).

O MSV foi esterilizado à 121 °C durante 30 minutos e, após resfriamento, 5% do inóculo bacteriano (densidade óptica entre 0,6 e 0,8 a 600 nm), previamente cultivado em caldo Luria-Bertani (LB; Kasvi), foi transferido para os frascos. Os frascos foram incubados em um agitador orbital (SL-22, Solab) a 30 °C e 180 rpm por um período de 5 dias (Figura 2).

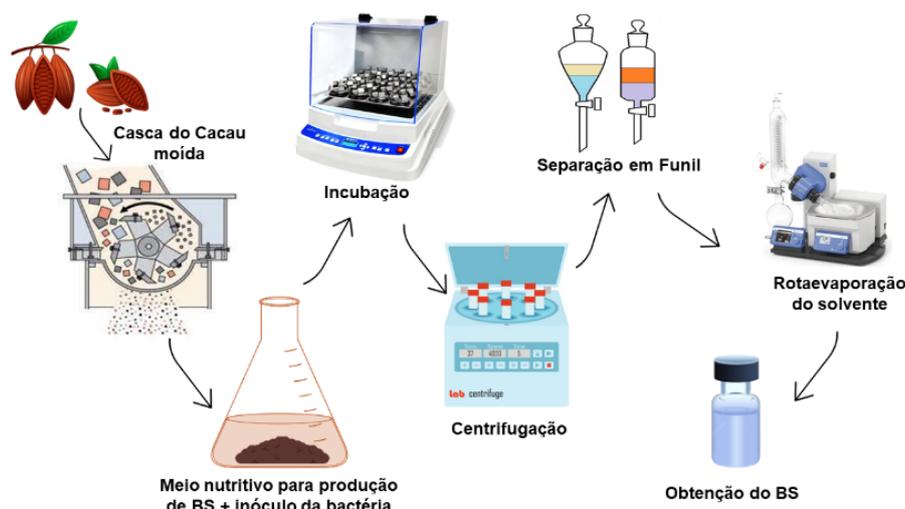


Figura 2 – Processo de produção e extração de biossurfactante.
Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

Extração do BS

O cultivo bacteriano resultante do processo de produção foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos, visando a obtenção do caldo livre de células (CLC). O CLC foi misturado com uma solução de clorofórmio-metanol (3:1, v/v) em um funil de separação e, em seguida, a solução foi deixada em repouso até a completa separação das fases. A fase hidroalcolica foi descartada e a fase orgânica foi coletada. Esse procedimento foi repetido cinco vezes e denominado lavagem. Posteriormente, a fase orgânica foi evaporada em um rotaevaporador a 45 °C e seca em estufa com ar circulado até atingir peso constante, resultando na obtenção do BS bruto (Figura 2).

Quantificação do BS

A concentração do BS ramnolipídico foi determinada por meio do método do orcinol, que estima a quantidade de ramnose. Para tal, foram adicionados 60 μ L da suspensão do BS bruto a 14,96 mL de uma solução de H_2SO_4 (53%) contendo 0,19% de orcinol. Após aquecimento durante 30 minutos a 80 °C, a solução reacional foi mantida em repouso, durante 15 minutos, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), seguida pela leitura da absorbância em espectrofotômetro (Bel V-M5, Biovera) a 421 nm [15]. A curva padrão foi construída utilizando soluções de L-ramnose em diferentes concentrações (1 a 200 μ g/mL). Como a ramnose compõe apenas uma fração da molécula de ramnolipídio, foi necessário ajustar a massa da ramnose utilizando um fator de correção, que varia entre 3,0 e 3,4 [18]. É importante ressaltar que esse valor não é exato, uma vez que os ramnolipídios constituem uma família de moléculas congêneres com diferentes massas moleculares [18]. Para este estudo, foi adotada a média dos fatores (3,2).

Atividade emulsificante

A atividade emulsificante do BS presente no CLC foi determinada conforme o método descrito por Iqbal et al. [17]. O índice de emulsificação (IE_{24}) foi quantificado em tubos de ensaio contendo 2 mL do CLC e 2 mL de óleo mineral (Cimed), agitados em agitador vortex por 2 minutos. Após 24 horas, o IE_{24} foi calculado utilizando a equação: IE_{24} (%) = $(x / y) \times 100$, onde x e y representam a altura da camada emulsificada (mm) e a altura total (mm), respectivamente. Os controles foram realizados com MSV não inoculado e solução de dodecil sulfato de sódio (SDS; Dinâmica Química Contemporânea) a 1%.

Teste de dispersão do óleo

O teste de dispersão do óleo foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 40 mL de água destilada e 1 mL de óleo de motor queimado. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL do CLC no centro do halo formado pelo óleo. O diâmetro das zonas claras foi calculado utilizando a fórmula: $ODA = (22/7) \times (\text{raio})^2 \text{ cm}^2$, onde ODA representa a área

de deslocamento do óleo em cm^2/min e r é o raio da circunferência formada pelo halo de óleo, nos intervalos de 1, 10 e 60 minutos [19]. Os controles foram realizados com MSV não inoculado e solução de SDS a 1%.

Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos dados. A análise estatística descritiva foi aplicada para os resultados obtidos nos testes de produção de BS. O desvio padrão e o erro padrão foram calculados para avaliar a variabilidade dos resultados.

Resultados e Discussão

A bactéria *P. aeruginosa* BM02 demonstrou capacidade de produção de BS utilizando resíduos de cacau como matriz energética (Figura 3). Esses resultados são promissores, pois refletem a utilização de resíduos de baixo valor econômico como única fonte de carbono e energia na síntese de BS com potencial biotecnológico [12].

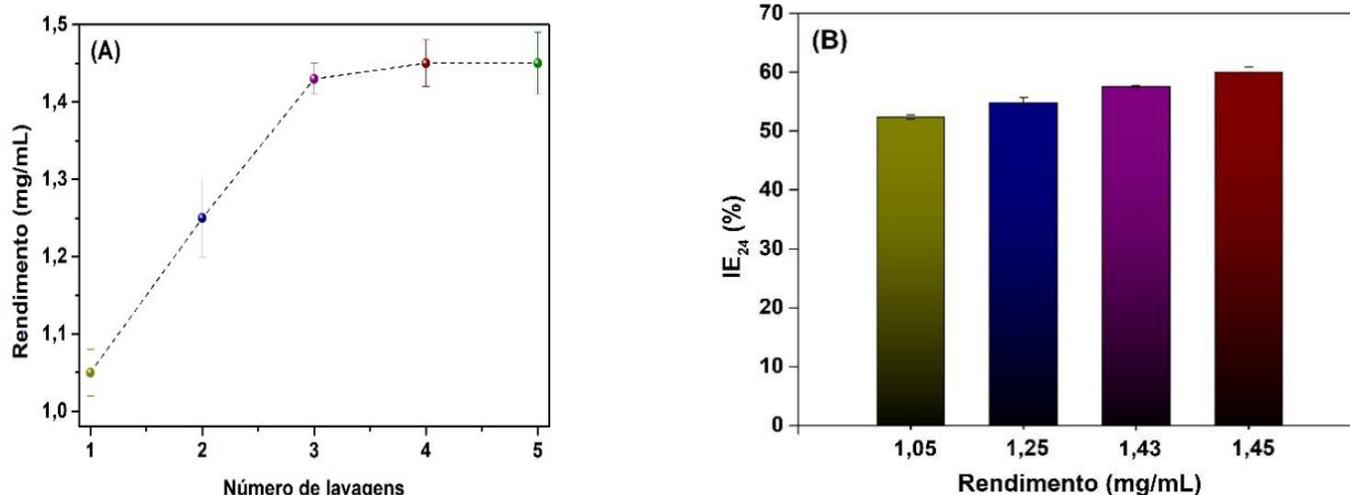


Figura 3 – Relação entre o número de lavagens do caldo livre de células produzido pela cepa *Pseudomonas aeruginosa* BM02 e o rendimento (mg/mL) do biossurfactante bruto (A), e relação entre o rendimento em massa do biossurfactante bruto e o índice de emulsificação (IE_{24} , expresso em %) (B).

A capacidade das bactérias em produzir BS é amplamente reconhecida na literatura, e os achados deste estudo corroboram a eficácia da espécie *P. aeruginosa* como produtora de BS [20]. Observa-se que, à medida que o número de lavagens do CLC aumenta, o índice de emulsificação também se eleva, com destaque para os valores obtidos na terceira lavagem. Este resultado é particularmente promissor do ponto de vista industrial, já que a elevação do índice de emulsificação sugere que o BS pode melhorar a estabilidade das emulsões durante o armazenamento e a aplicação, especialmente em formulações de cosméticos e produtos farmacêuticos [6].

Em contextos de biorremediação, um BS com elevados índices de emulsificação pode facilitar a solubilização e a biodisponibilidade de contaminantes hidrofóbicos, promovendo sua remoção de solos e águas contaminadas [21]. Assim, a utilização de resíduos de cacau na produção de BS apresenta-se como uma solução viável para o reaproveitamento desses materiais, representando uma estratégia inovadora do ponto de vista biotecnológico, capaz de agregar valor à cadeia produtiva de frutos amazônicos e beneficiar as comunidades locais que tradicionalmente utilizam esse material biológico como fonte de renda.

De acordo com Sánchez *et al.* [22], a biomassa residual derivada da produção e processamento do cacau representa entre 70% e 80% do total da casca, o que correspondente a até 20% do peso total do fruto. Embora essa biomassa seja considerada e tratada como resíduo, sua composição nutricional não difere significativamente daquela dos grãos de cacau [5], sendo abundante em carboidratos, fibras alimentares, lipídios, compostos fenólicos, antioxidantes e vitaminas. Em particular, o teor de lipídios representa quase 50% do peso seco do fruto, cujas características físico-químicas se assemelham às da gordura da manteiga de cacau, exceto pelos níveis de acidez [23]. Os teores de carboidratos presentes nos resíduos variam entre 13,2 g/100 g e 70,3 g/100 g, constituindo-se principalmente de glicose (17%), galactose (3%), manose (3%), xilose (1,2%) e arabinose (1,7%) [22].

Estudos anteriores indicam que carboidratos e lipídios são fatores essenciais para a produção de BS [24], uma vez que a absorção desses compostos por *P. aeruginosa* é facilitada pelo mecanismo dependente de energia que é crítico para a produção de BS. Além disso, o fornecimento de nutrientes específicos influencia diretamente a regulação genética relacionada às atividades metabólicas de *P. aeruginosa* [25]. Assim, acredita-se que os componentes nutricionais dos resíduos de cacau oferecem desdobramentos valiosos para a produção de BS.

A avaliação do rendimento do BS bruto foi realizada considerando a eficiência de extração e o IE_{24} do CLC (Figura 3), evidenciando que o maior rendimento em massa do BS bruto foi obtido após a terceira lavagem (1,43 mg/mL \pm 0,04), juntamente com a estabilização do BS bruto (Figura 3A). Tal resultado é atribuído à capacidade do solvente em extrair a fase orgânica de interesse da fase inorgânica, isolando, assim, a molécula alvo. Esses resultados indicam a viabilidade da produção de BS em larga escala e a redução dos custos do processo. A análise da correlação entre o rendimento de BS e o IE_{24} revelou que o IE_{24} aumentou proporcionalmente com o rendimento do BS bruto (Figura 3B). O IE_{24} é um método comumente utilizado para identificar indiretamente a presença de BS no CLC [26], sendo considerado promissor quando a formação de emulsão permanece estável acima de 50% após 24 horas de repouso [27].

Através do teste do orcinol, foi possível determinar que a maior concentração de ramnose (1,02 g/L \pm 0,02) estava presente na massa de BS bruto que passou pelo maior número de lavagens com solventes orgânicos, a qual também exibiu o maior índice de emulsificação (Figura 4). Após a aplicação do fator de correção, observou-se que a concentração de ramnolipídio no BS bruto variou de 2,25 g/L a 3,06 g/L, conforme o número de lavagens testadas. Os resultados obtidos neste estudo assemelham-se àqueles descritos para os BS ramnolipídicos produzidos por *P. aeruginosa*, que utilizaram óleo de palma e óleo de coco, com teores de 2,91 g/L e 2,93 g/L de ramnose, respectivamente [28].

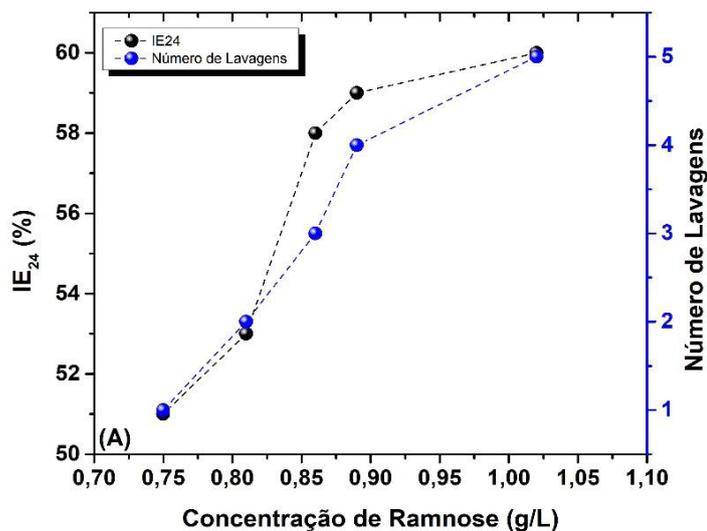


Figura 4 – Relação entre a concentração de ramnose, índice de emulsificação (IE_{24}) e número de lavagens no processo de extração do biossurfactante.

Entre as classes de BS, a de glicolipídios, especialmente os ramnolipídios, é a mais amplamente estudada. Os ramnolipídios são compostos por uma ou duas unidades de L-ramnose ligadas a uma ou duas unidades de ácidos graxos beta-hidroxi, sendo produzidos principalmente por *P. aeruginosa* [20,29]. Esses tensoativos são eficazes em emulsificar óleos e outros compostos hidrofóbicos, facilitando sua dispersão em água. A ramnose, como parte dos ramnolipídios, contribui para a capacidade de reduzir a tensão superficial e formar emulsões estáveis. Quando a concentração de ramnose no BS é suficiente, formam-se estruturas chamadas micelas, que encapsulam as gotículas de óleo em caudas hidrofóbicas, enquanto as cabeças hidrofílicas

interagem com a água. Esse mecanismo estabiliza a emulsão e evita a coalescência das gotículas de óleo. Assim, compreende-se que o aumento da ramnose com o número de lavagens aprimora propriedades físico-químicas, como a emulsificação e a dispersão de óleo.

Conforme ilustrado na Figura 5, o CLC produzido por *P. aeruginosa* BM02 formou emulsão estável após 24 horas de repouso, o que representa uma propriedade físico-química promissora para aplicações industriais [11]. O MSV não inoculado não apresentou formação de emulsão, enquanto o SDS (controle positivo) formou emulsão com características visuais semelhantes às do CLC.

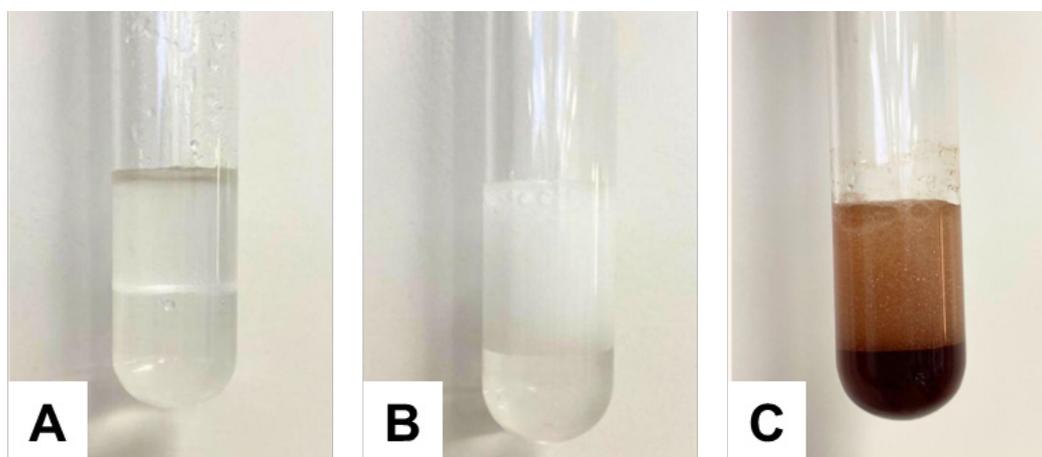


Figura 5 – Formação de emulsão em meio salino vegetal não inoculado (A), em dodecil sulfato de sódio a 1% (B) e em caldo livre de células produzido pela cepa *Pseudomonas aeruginosa* BM02 (C).

O CLC contendo o BS bruto obtido a partir de *P. aeruginosa* BM02 demonstrou atividade dispersante em relação ao óleo (Figura 6). Quando investigado sob a influência do tempo de contato com o óleo de

motor queimado, o CLC apresentou desempenho comparável ao do SDS no menor tempo avaliado (1 minuto), superando sua eficácia nos tempos de 10 e 60 minutos (Tabela 2).

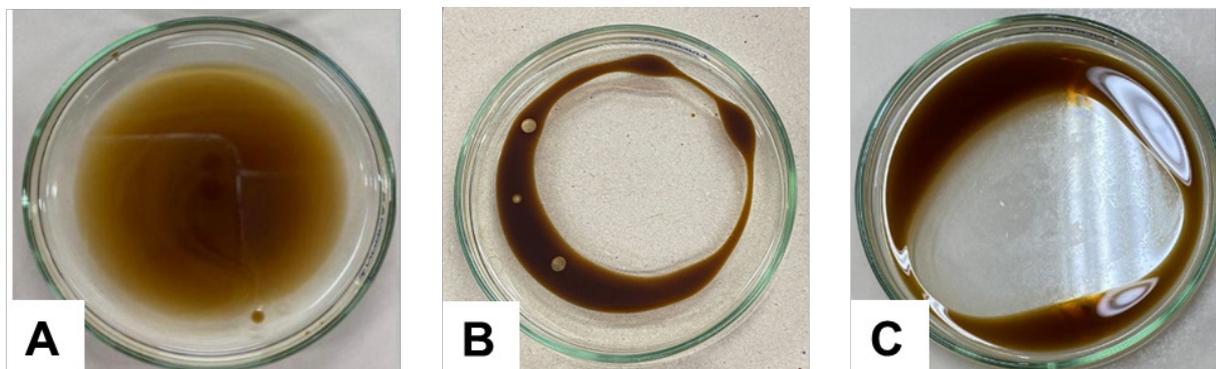


Figura 6 – Teste de dispersão do óleo em meio salino vegetal não inoculado (A), caldo livre de células produzido pela cepa *P. aeruginosa* BM02 (B) e dodecil sulfato de sódio a 1% (C).

O teste de deslocamento do óleo baseia-se na diferença de densidade entre óleo e água, onde a adição de BS na película oleosa resulta na redução da tensão interfacial, alterando o ângulo de contato entre óleo e água e, conseqüentemente, promovendo o deslocamento do óleo [12]. Este método também tem sido progressivamente utilizado para quantificar indiretamente o teor de BS, considerando que o

tamanho da zona clara formada (halo de deslocamento do óleo) é proporcional à concentração do BS [30], corroborando os resultados do IE_{24} descritos nas Figuras 3 e 4. Dessa maneira, o BS produzido por *P. aeruginosa* BM02, utilizando resíduos de cacau, apresenta potencial biotecnológico para atuar como agente biorremediador na remoção de petróleo e seus derivados em águas e efluentes.

Tabela 2 – Área de dispersão de óleo de motor queimado do caldo livre de células produzido por *Pseudomonas aeruginosa* BM02 utilizando resíduo de cacau como matéria-prima.

Amostras	Deslocamento cm^2 /minuto		
	1 minuto	10 minutos	60 minutos
MSV não inoculado	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
SDS a 1%	$3,0 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
CLC	$2,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$

MSV = Meio salino vegetal, SDS = Dodecil sulfato sódio, CLC = Caldo livre de células.

Embora a produção de BS por *P. aeruginosa* BM02 a partir de resíduos vegetais represente uma abordagem promissora para a biotecnologia sustentável, algumas limitações devem ser consideradas. A variabilidade dos substratos vegetais e a eventual inibição metabólica ocasionada por compostos presentes nos resíduos podem afetar a eficiência da fermentação e o rendimento de

extração. A transição da produção em laboratório para uma escala industrial ainda carece de garantias de reprodutibilidade e viabilidade econômica, uma vez que pequenas variações nas condições podem impactar os resultados.

As perspectivas futuras para esta área incluem o desenvolvimento de tecnologias e processos

que otimizem a extração e purificação do BS em condições que possibilitem sua integração em práticas de biorremediação, potencializando sua eficácia em contextos ambientais reais. A realização de testes em larga escala se mostra essencial para validar a performance e as implicações econômicas desse processo. Com base nos resultados descritos nesta pesquisa, a combinação dessas abordagens não apenas incentiva o uso sustentável de resíduos vegetais, mas também fortalece a transição para uma economia circular, contribuindo para a mitigação dos impactos ambientais.

Conclusão

O presente estudo sobre a produção de biossurfactantes (BS) pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* BM02, utilizando resíduos de cacau (*Theobroma cacao* L.), destaca a viabilidade do emprego desses resíduos como matéria-prima sustentável para aplicações industriais. Os resultados demonstram a influência direta do processo de extração no rendimento e nas propriedades físico-químicas do BS, evidenciadas pelo índice de emulsificação e pelos teores de ramnose. Além disso, os testes de dispersão de óleo indicam um potencial significativo para a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

As implicações deste estudo estendem-se a várias áreas. Do ponto de vista econômico, a utilização da biomassa residual do cacau para a produção de BS pode oferecer uma alternativa mais econômica em comparação aos tensoativos sintéticos, sendo necessária a condução de avaliações em larga escala que explorem sua viabilidade industrial. Em termos científicos, há espaço para a realização de estudos comparativos que identifiquem os melhores substratos para a síntese de BS, bem como investigações sobre os mecanismos que aumentam a atividade da bactéria produtora de BS. Socialmente, o aproveitamento desses resíduos pode fomentar a geração de empregos e valorizar o conhecimento tradicional nas comunidades amazônicas, que historicamente utilizam esses vegetais. Ambientalmente, a adoção de BS na indústria pode reduzir a dependência de surfactantes químicos sintéticos, o que, entretanto, não dispensa a necessidade de realizar estudos de toxicidade de longo prazo e ensaios de campo para avaliar a eficácia do BS, especialmente na biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

Futuras pesquisas devem concentrar-se na sinergia com outras tecnologias de remediação e na condução de avaliações do ciclo de vida, a fim de entender melhor o comportamento ambiental do BS produzido, promovendo assim uma abordagem sustentável e inovadora no uso de recursos naturais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (Fapespa) pela concessão de bolsas para a pesquisa de Iniciação Científica e Mestrado, bem como pelo apoio financeiro ao projeto Amazônia+10/CONFAP: 102/2023; ao Banco da Amazônia S.A. (BASA), pelo suporte financeiro ao projeto GPLAN/CDESU: 2022/251; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código de Financiamento 001), pela concessão de bolsas para as pesquisas de Mestrado e Pós-Doutorado e pelo apoio financeiro aos Projetos e Incentivos de Pós-Doutorado Estratégico, Equipamentos Amazônia Legal, Parcerias Estratégicas nos Estados III e Amazônia Legal; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas para as pesquisas de Iniciação Científica, Pós-Doutorado e Desenvolvimento Tecnológico Industrial.

Referências

1. Sousa RSR, Lima GVS, Garcias JT, Gomes GO, Mateus JR, Madeira LDPS, et al. The microbial community structure in the rhizosphere of *Theobroma cacao* L. and *Euterpe oleracea* Mart. is influenced by agriculture system in the Brazilian amazon. *Microorganisms*. 2024 Feb 17; 12(2): e398.
2. Cabral MVA, Conceição MMM, Bitencourt EB, Silva VF, Pessoa ACN, Queiroz JM, et al. Açaí, castanha e palmito: elementos da bioeconomia e da sociobiodiversidade no estado do Pará, Amazônia Brasileira. *Caderno Pedagógico*. 2024 Apr 18; 21(4): e3842.
3. Wagh MS, Sowjanya S, Nath PC, Chakraborty A, Amrit R, Mishra B, et al. Valorisation of agro-industrial wastes: Circular bioeconomy and biorefinery process – A sustainable symphony. *Process Saf Environ Prot* 2024 Mar; 183: 708–725.

4. Presidência da República (Brasil). Lei nº 12.288, de 20 de julho de 2010. Institui o Estatuto da Igualdade Racial; altera as Leis nos 7.716, de 5 de janeiro de 1989, 9.029, de 13 de abril de 1995, 7.347, de 24 de julho de 1985, e 10.778, de 24 de novembro de 2003 [Internet]. Diário Oficial da União. [citado em 2024 nov. 18]. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12288.htm. 2010.
5. Younes A, Li M, Karboune S. Cocoa bean shells: a review into the chemical profile, the bioactivity and the biotransformation to enhance their potential applications in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023 Nov 6; 63(28): 9111-9135.
6. Cerqueira dos Santos S, Araújo Torquato C, Alexandria Santos D, Orsato A, Leite K, Serpeloni JM, et al. Production and characterization of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* isolated in the Amazon region, and potential antiviral, antitumor, and antimicrobial activity. *Sci Rep*. 2024 Mar 12; 14(1): e4629.
7. Panjiar N, Mattam AJ, Jose S, Gandham S, Velankar HR. Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. *Sci Total Environ*. 2020 Aug; 729: e138933.
8. Lopes VS, Fischer J, Pinheiro TMA, Cabral BV, Cardoso VL, Coutinho Filho U. Biosurfactant and ethanol co-production using *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* co-cultures and exploded sugarcane bagasse. *Renew Energy*. 2017 Aug; 109: 305-310.
9. Marcelino PRF, Peres GFD, Terán-Hilares R, Pagnocca FC, Rosa CA, Lacerda TM, et al. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Ind Crops Prod*. 2019 Mar; 129: 212-223.
10. Vieira IMM, Santos BLP, Silva LS, Ramos LC, de Souza RR, Ruzene DS, et al. Potential of pineapple peel in the alternative composition of culture media for biosurfactant production. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Dec 20; 28(48): 68957-68971.
11. Yadav S, Malik K, Moore JM, Kamboj BR, Malik S, Malik VK, et al. Valorisation of agri-food waste for bioactive compounds: recent trends and future sustainable challenges. *Molecules*. 2024 Apr 29; 29(9): e2055.
12. Johnson P, Trybala A, Starov V, Pinfield VJ. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. *Adv Colloid Interface Sci*. 2021 Feb; 288: e102340.
13. Parthasarathi R, Mayakrishnan V, Natesan V, Akash K, Poonguzhali P, Ramamoorthy K, et al. *Serratia rubidinea* SNAU02-mediated biosurfactant production from cashew apple bagasse: A promising biotechnological strategy for environmental sustainability. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2024 Jun; 58: e103158.
14. Hari A, Doddapaneni TRKC, Kikas T. Common operational issues and possible solutions for sustainable biosurfactant production from lignocellulosic feedstock. *Environ Res*. 2024 Jun; 251: e118665.
15. Cheng T, Liang J, He J, Hu X, Ge Z, Liu J. A novel rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. *AMB Express*. 2017 Dec 8; 7(1): e120.
16. Chang SE, Stone J, Demes K, Piscitelli M. Consequences of oil spills: a review and framework for informing planning. *Ecol Soc*. 2014; 19(2): art26.
17. Iqbal S, Khalid ZM, Malik KA. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol*. 1995 Sep; 21(3): 176-179.
18. Camilios Neto D, Meira JA, Araújo JM, Mitchell DA, Krieger N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008 Dec 1; 81(3): 441-448.
19. Pele MA, Ribeaux DR, Vieira ER, Souza AF, Luna MAC, Rodríguez DM, et al. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electron J Biotechnol*. 2019 Mar; 38: 40-8.
20. Santos SC. Biosurfactantes: potenciais agentes biorremediadores. *CPROSP*. 2019 Dec 30; 12(5): e1531.
21. Zeng Z, Liu Y, Zhong H, Xiao R, Zeng G, Liu Z, et al. Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds. *Sci Total Environ*. 2018 Sep; 634: 1-11.
22. Sánchez M, Laca A, Laca A, Díaz M. Cocoa Bean Shell: A by-product with high potential for nutritional and biotechnological applications. *Antioxidants*. 2023 Apr 28; 12(5): e1028.
23. Okiyama DCG, Soares ID, Cuevas MS, Crevelin EJ, Moraes LAB, Melo MP, et al. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Res Int*. 2018 Dec; 114: 20-29.
24. Noordman WH, Janssen DB. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Sep; 68(9): 4502-4508.

25. Zhao K, Li J, Yuan Y, Lin J, Wang X, Guo Y, et al. Nutrient factor-dependent performance of bacterial quorum sensing system during population evolution. *Arch Microbiol.* 2020 Oct 10; 202(8): 2181-2188.
26. Wei YH, Chou CL, Chang JS. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem Eng J.* 2005 Dec; 27(2): 146-154.
27. Pinto MH, Martins RG, Costa JAV. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. *Quim Nova.* 2009; 32(8): 2104-2108.
28. Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, Thaniyavarn S, Pinphanichakarn P, Leepipatpiboon N, et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. *J Gen Appl Microbiol.* 2006; 52(4): 215-222.
29. Araujo JS, Rocha JC, Filho MAO, Ribeiro VT, Vasconcelos LTCP, Araujo NK, et al. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIIA and application on bioremediation and as a fungicide. *Biosci Biotechnol Res Asia.* 2020 Sep 20; 17(03): 467-477.
30. Jiang J, Jin M, Li X, Meng Q, Niu J, Long X. Recent progress and trends in the analysis and identification of rhamnolipids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Oct 26; 104(19): 8171-8186.

Biodiversidade Brasileira – BioBrasil.

Fluxo Contínuo e Edição Temática:

Gestão do Conhecimento e Sociobiodiversidade das Áreas Protegidas de Carajás
n.1, 2025

<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR>

Biodiversidade Brasileira é uma publicação eletrônica científica do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) que tem como objetivo fomentar a discussão e a disseminação de experiências em conservação e manejo, com foco em unidades de conservação e espécies ameaçadas.

ISSN: 2236-2886

