



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SONALLY DE OLIVEIRA LIMA

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Penicillium sp* E  
*Chrysosporium sp* NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIOSSURFACTANTE  
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

CAMPINA GRANDE-PB  
2024

SONALLY DE OLIVEIRA LIMA

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Penicillium sp* E *Chrysosporium sp* NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Programa de Pós- Graduação em Química – Mestrado da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Química.

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia – Campina Grande.

**Orientadora:** Profa. Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo

**Coorientador:** Profa. Dra Pablicia Oliveira Galdino

**CAMPINA GRANDE-PB  
2024**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto em versão impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que, na reprodução, figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

L732c Lima, Sonally de Oliveira.

Comparação do potencial biotecnológico de *penicillium* sp e *chrysosporim* sp na produção sustentável de biossurfactante utilizando resíduos agroindustriais [manuscrito] / Sonally de Oliveira Lima. - 2024.

59 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2024.

"Orientação : Prof. Dra. Helvia Walewska Casullo de Araujo Carvalho, Departamento de Química - CCT".

"Coorientação: Prof. Dra. Pablícia Oliveira Galdino, Departamento de Química - CCT".

1. Fungos. 2. Biossurfactante. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Biorremediação. I. Título

21. ed. CDD 579.5

SONALLY DE OLIVEIRA LIMA

COMPARAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Penicillium sp* E  
*Chrysosporim sp* NA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DEBIOSSURFACTANTE  
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada à Coordenação  
do Curso de Programa de Pós- Graduação  
em Química – Mestrado da Universidade  
Estadual da Paraíba, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestra em  
Química.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia –  
Campina Grande.

Aprovada em: 23/12/ 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado eletronicamente por:

- **Helvia Walewska Casullo de Araujo Carvalho** (\*\*\*.611.224-\*\*), em **26/01/2025 22:57:15** com chave **0812abf6dc5211efa88506adb0a3afce**.
- **Deoclecio Ferreira de Brito** (\*\*\*.403.587-\*\*), em **27/01/2025 09:58:39** com chave **6d6d9b12dcae11ef8bcc06adb0a3afce**.
- **Neyliane Costa de Souza** (\*\*\*.245.113-\*\*), em **27/01/2025 10:03:52** com chave **28168758dcdf11ef96ee1a1c3150b54b**.

Documento emitido pelo SUAP. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QrCode ao lado ou acesse [https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar\\_documento/](https://suap.uepb.edu.br/comum/autenticar_documento/) e informe os dados a seguir.

**Tipo de Documento:** Folha de Aprovação do Projeto Final

**Data da Emissão:** 04/02/2025

**Código de Autenticação:** f9445a



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, à minha família e a Thaynara Policarpo amiga de longa data, minha imensurável gratidão por todo amor, força e coragem para superar todos os empecilhos ao longo do caminho.

À minha orientadora, Dra. Helvia Walewska Casullo de Araújo, pelo carinho, paciência e ajuda ao longo da minha trajetória de construção profissional e desenvolvimento deste trabalho.

Ao incentivo financeiro por meio de concessão de bolsa Termo nº 1991/2023, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ), ao Núcleo de Pesquisa em Alimentos (NUPEA), expresso minha total gratidão por fornecer apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Dra. Elaine Virginia dos Pereira, Dra. Isanna Menezes Florêncio, Dr. Giodanni Cabral, Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti e Dra. Pablícia Oliveira Galdino pelos conselhos e incentivos que impulsionaram o desejo de crescer como pesquisadora.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e corpo docente pela oportunidade de concluir esta importante etapa acadêmica.

Aos meus queridos colegas Mykaele da Silva Mendes, Michel Silva de Oliveira, Mateus Araújo da Luz, Havana Lorena Silva de Araújo, Paulo Ferreira de Brito, Thais Xavier de Lima, Fellype Diorgennes Cordeiro Gomes, Willis Galvncio Barbosa e Paulo Gomes Pereira Junior, agradeço pelas palavras de apoio, momentos de descontração e por estarem sempre presentes. Vocês foram uma fonte constante de força e inspiração para alcançar meus objetivos.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram ao longo desta pesquisa, meu muito obrigada.

## RESUMO

Biossurfactantes e bioemulsificantes são moléculas anfipáticas, reduzem a tensão superficial e interfacial, são biodegradáveis e de baixa toxicidade. Apesar dos desafios de altos custos e baixos rendimentos, o uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos apresenta uma solução sustentável. Este trabalho avaliou a influência das cascas de abacaxi e do óleo pós-fritura, utilizados pelos fungos *Penicillium* sp. e *Chrysosporium* sp., na produção de biossurfactantes e bioemulsificantes. Foi utilizado o planejamento Box Behnken Design com 15 ensaios. Os meios foram incubados em Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de produção com 10% de inóculos ( $10^7$  cel/mL), por 138 horas, a 150 rpm e 28°C. Os biossurfactantes produzidos foram avaliados por meio de medidas de tensão superficial e índice de emulsificação, utilizando óleo pós-fritura e óleo de motor queimado como substratos hidrofóbicos. Foram analisadas a dispersão de óleo em água e as características das emulsões. A composição química dos biossurfactantes foi determinada pelo teor de lipídeos e carboidratos, com grupos funcionais caracterizados por espectroscopia de infravermelho (FTIR) e carga iônica pelo potencial zeta. A fitotoxicidade foi avaliada em sementes de alface. Os resultados mostraram uma redução da tensão superficial para 55,74 mN/m (*Penicillium* sp.) e 53,22 mN/m (*Chrysosporium* sp.). O índice de emulsificação com o líquido metabólito foi de 81,12% com óleo de motor queimado (*Penicillium* sp.) e 45,16% com óleo pós-fritura (*Chrysosporium* sp.), formando emulsões água-em-óleo e óleo-em-água, respectivamente. Os rendimentos foram de 0,76 g/L e 0,60 g/L, com composições de carboidratos de 48,58% e 41,63% e de lipídios de 2,99% e 1,99%. O índice de emulsão dos biossurfactantes e bioemulsificantes extraídos na concentração de 1 mg/mL com óleo de motor foi de 60% e 59,09%, respectivamente. Análises de FTIR identificaram bandas expressivas em  $3304\text{ cm}^{-1}$  e  $3327\text{ cm}^{-1}$  (O-H e N-H), em  $1024\text{ cm}^{-1}$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$  (C-CO-C), características de compostos poliméricos e ligações glicosídicas, sugerindo que ambos podem ser glicolipídios. A avaliação revelou que *Penicillium* sp. não apresentou efeitos tóxicos nas plantas, enquanto *Chrysosporium* sp. exibiu uma toxicidade moderada na concentração de 1 mg/mL. Os resultados destacam a viabilidade da biotransformação de resíduos como substratos econômicos, com potencial para aplicações industriais e ambientais.

**Palavras-Chave:** fungos; biossurfactante; resíduos agroindustriais; biorremediação.

## ABSTRACT

Biosurfactants and bioemulsifiers are amphipathic molecules, reduce surface and interfacial tension, are biodegradable and have low toxicity. Despite the challenges of high costs and low yields, the use of agro-industrial waste as alternative substrates presents a sustainable solution. This study evaluated the influence of pineapple peels and post-frying oil used by the fungi *Penicillium* sp. and *Chrysosporium* sp. on the production of biosurfactants and bioemulsifiers. A Box Behnken Design with 15 trials was used. The media were incubated in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the production medium with 10% inoculum ( $10^7$  cell/mL) for 138 hours at 150 rpm and 28°C. The biosurfactants produced were evaluated using surface tension and emulsification index measurements, using post-frying oil and burnt engine oil as hydrophobic substrates. The dispersion of oil in water and the characteristics of the emulsions were analyzed. The chemical composition of the biosurfactants was determined by lipid and carbohydrate content, with functional groups characterized by infrared spectroscopy (FTIR) and ionic charge by zeta potential. Phytotoxicity was assessed on lettuce seeds. The results showed a reduction in surface tension to 55.74 mN/m (*Penicillium* sp.) and 53.22 mN/m (*Chrysosporium* sp.). The emulsification index with the metabolite liquid was 81.12% with burnt motor oil (*Penicillium* sp.) and 45.16% with post-frying oil (*Chrysosporium* sp.), forming water-in-oil and oil-in-water emulsions, respectively. The yields were 0.76 g/L and 0.60 g/L, with carbohydrate compositions of 48.58% and 41.63% and lipid compositions of 2.99% and 1.99%. The emulsion index of the biosurfactants and bioemulsifiers extracted at a concentration of 1 mg/mL with engine oil was 60% and 59.09%, respectively. FTIR analysis identified significant bands at 3304  $\text{cm}^{-1}$  and 3327  $\text{cm}^{-1}$  (O-H and N-H), at 1024  $\text{cm}^{-1}$  and 1028  $\text{cm}^{-1}$  (C-CO-C), characteristic of polymeric compounds and glycosidic bonds, suggesting that both may be glycolipids. The evaluation revealed that *Penicillium* sp. showed no toxic effects on plants, while *Chrysosporium* sp. exhibited moderate toxicity at a concentration of 1 mg/mL. The results highlight the feasibility of biotransforming waste as economical substrates, with potential for industrial and environmental applications.

**Keywords:** fungi; biosurfactant; agro-industrial waste; bioremediation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Colônia do <i>Penicillium</i> sp em meio ágar batata. ....                                                                                                                                          | 16 |
| Figura 2 - Colônia do <i>Chrysosporium</i> sp em meio ágar batata.....                                                                                                                                         | 17 |
| Figura 3 - Caracterização estrutural da molécula de biossurfactante e bioemulsificante.....                                                                                                                    | 18 |
| Figura 4 - Aplicações dos biossurfactantes e bioemulsificantes em vários setores. ...                                                                                                                          | 22 |
| Figura 5 - Representação das etapas de preparação das cascas de abacaxi (A) cascas de abacaxi cortadas, (B) cascas de abacaxi trituradas após secagem, (C) cascas peneiradas. ....                             | 27 |
| Figura 6 - Fluxograma da produção e caracterização do biossurfactante/bioemulsificante. ....                                                                                                                   | 29 |
| Figura 7-Gráfico dos índices de emulsificação (IE%) com o óleo pós-fritura e óleo de motor para o <i>Penicillium</i> sp e <i>Chrysosporium</i> sp. ....                                                        | 36 |
| Figura 8-Diagrama de Pareto para a influência das variáveis independentes na resposta do índice de emulsificação do <i>Penicillium</i> sp (A) IE% O.Pf (B) IE% O.M. .                                          | 37 |
| Figura 9- Superfícies de resposta para índice de emulsificação 24h do <i>Penicillium</i> sp (A) I.E% O.Pf óleo pós-fritura versus casca de abacaxi (B) I.E% O.M óleo pós-fritura versus casca de abacaxi ..... | 37 |
| Figura 10-Emulsões formadas após 24h (A) <i>Penicillium</i> sp (B) <i>Chrysosporium</i> sp: (1) óleo de motor queimado; (2) óleo pós-frutura .....                                                             | 38 |
| Figura 11- Formação das emulsões formadas pelo <i>Penicillium</i> sp 24h vizualizadas microscopicamente(40x), (A) Óleo pós-fritura; (B) Óleo de motor queimado. ....                                           | 39 |
| Figura 12- Formação das emulsões formadas pelo <i>Chrysosporium</i> sp após 24h vizualizadas microscopicamente(40x), (A) Óleo pós-fritura; (B) Óleo de motor queimado.....                                     | 40 |
| Figura 13- Dispersão do óleo de motor em água (A) prova em branco (B) <i>Chrysosporium</i> sp ( C) <i>Penicillium</i> sp (D) Surfarctante comercial.....                                                       | 41 |
| Figura 14- Biossurfactante/bioemulsificantes liofilizados (A) <i>Penicillium</i> sp (B) <i>Chrysosporium</i> sp .....                                                                                          | 42 |
| Figura 15- Espectros de FTIR <i>Penicillium</i> sp e <i>Chrysosporim</i> sp.....                                                                                                                               | 44 |
| Figura 16- Emulsões formadas pelo bipssurfactante/bioemulsificante com óleo de motor após 24h, (A) <i>Penicillium</i> sp (B) <i>Chrysosporium</i> sp: (1) 0,1mg/ mL; (2) 1mg/mL .....                          | 46 |



|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 17- Emulsões formadas pelo <i>Penicillium</i> sp com óleo de motor após 24h<br>vzualizadas microscopicamente(40x), (1) 0,1mg/mL; (2) 1mg/mL. ....                                                                                             | 47 |
| Figura 18- Emulsões formadas pelo <i>Penicillium</i> sp com óleo de motor após 24h<br>vzualizadas microscopicamente(40x), (1) 0,1mg/mL; (2) 1mg/mL. ....                                                                                             | 47 |
| Figura 19- Placas com sementes de <i>Lactuca sativa</i> após 7 dias umedecidas: (A)<br>água; (B) <i>Penicillium</i> sp 0,1mg/mL; (C) <i>Penicillium</i> sp 1mg/mL; (D) <i>Chrysosporium</i><br>sp 0,1mg/mL; (E) <i>Chrysosporium</i> sp 1mg/mL ..... | 49 |

## LISTAS DE TABELAS

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1- Dados sobre composição bioquímica de bioemulsificantes. ....                                                                                               | 19 |
| Tabela 2- Dados sobre espectros de infravermelho (FTIR) de bioemulsificantes produzidos por diversos microrganismos .....                                            | 20 |
| Tabela 3- Fungos produtores de biossurfactantes conforme espécie fúngica. ....                                                                                       | 21 |
| Tabela 4- Resíduos usados por microrganismos para produção de biossurfactante. ....                                                                                  | 23 |
| Tabela 5- Composição centesimal da casca de abacaxi.....                                                                                                             | 25 |
| Tabela 6- Componentes químicos do óleo de soja pós-fritura .....                                                                                                     | 26 |
| Tabela 7- Matrix do planejamento Box Behnken Desing.....                                                                                                             | 28 |
| Tabela 8- Matrix do planejamento com os fatores de influência na tensão superficial para o <i>Penicillium</i> sp e <i>Chrysosporium</i> sp .....                     | 33 |
| Tabela 9- Resultados do índice de emulsificação do <i>Penicillium</i> sp e <i>Chrysosporium</i> sp de acordo com o planejamento .....                                | 35 |
| Tabela 10- Composição química do biossurfactante/ bioemulsificante .....                                                                                             | 43 |
| Tabela 11- Valores do I.E% do biossurfactante/ bioemulsificante extraído.....                                                                                        | 46 |
| Tabela 12- Fitotoxicidade do biossurfactante/bioemulsificante isolado de <i>Penicillium</i> sp e <i>Chrysosporium</i> sp em sementes de <i>Lactuca sativa</i> . .... | 48 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |                                                                  |
|------------------|------------------------------------------------------------------|
| BE               | Biosulfactante                                                   |
| BS               | Biossurfactante                                                  |
| C.Abx            | Casca de abacaxi                                                 |
| CR               | Percentual de crescimento da raiz                                |
| f                | Fator de correção                                                |
| FAO              | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| g                | Gravidade                                                        |
| G                | Percentual de germinação das sementes                            |
| IE O.M           | Percentual do índice de emulsificação com o óleo motor           |
| IE O.Pf          | Percentual do índice de emulsificação com o óleo pós-fritura     |
| IE               | Percentual do índice de emulsificação                            |
| IE <sub>24</sub> | Índice de emulsificação após 24h                                 |
| IG               | Índice de germinação                                             |
| m                | Massa de uma gota                                                |
| NUPEA            | Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos                       |
| O.M              | Óleo de motor queimado                                           |
| O.Pf             | Óleo pós-fritura                                                 |
| Óleo Pf          | Óleo pós-fritura                                                 |
| r                | Raio da gota                                                     |
| T.S              | Tensão Superficial                                               |
| $\pi$            | Pi                                                               |

## SUMÁRIO

|         |                                                                    |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | INTRODUÇÃO .....                                                   | 12 |
| 2       | OBJETIVO .....                                                     | 14 |
| 2.1     | Objetivo Geral .....                                               | 14 |
| 2.2     | Objetivo Específicos .....                                         | 14 |
| 3       | REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....                                         | 15 |
| 3.1     | Fungos filamentosos .....                                          | 15 |
| 3.2     | Penicillium sp .....                                               | 15 |
| 3.3     | Chrysosporium sp .....                                             | 16 |
| 3.4     | Metabólitos secundários.....                                       | 17 |
| 3.5     | Biossurfactantes/ bioemulsificantes .....                          | 18 |
| 3.6     | Biossurfactantes/ bioemulsificantes aplicações.....                | 21 |
| 3.7     | Resíduos agroindustriais.....                                      | 22 |
| 3.7.1   | <i>Substratos: cascas de frutas</i> .....                          | 24 |
| 3.7.1.1 | <i>Casca de Abacaxi</i> .....                                      | 24 |
| 3.7.2   | <i>Óleo Pós-Fritura</i> .....                                      | 25 |
| 4       | METODOLOGIA .....                                                  | 27 |
| 4.1     | Microrganismo e manutenção.....                                    | 27 |
| 4.2     | Resíduos agroindustriais/ Substratos.....                          | 27 |
| 4.3     | Planejamento Experimental.....                                     | 28 |
| 4.4     | Produção do biossurfactante/bioemulsificante.....                  | 28 |
| 4.4.1   | <i>Preparo do inóculo</i> .....                                    | 28 |
| 4.4.2   | <i>Fermentação</i> .....                                           | 29 |
| 4.5     | Tensão superficial.....                                            | 29 |
| 4.6     | Índice de emulsificação.....                                       | 30 |
| 4.7     | Análise microscópica da emulsão.....                               | 30 |
| 4.8     | Extração e purificação parcial do biossurfactante/bioemulsificante | 30 |
| 4.9     | Caracterização química do biossurfactante/bioemulsificante.....    | 30 |
| 4.9.1   | <i>Determinação de carboidratos e açúcares totais</i> .....        | 30 |
| 4.9.2   | <i>Extração e quantificação dos lipídeos totais</i> .....          | 31 |
| 4.10    | Potencial Zeta.....                                                | 31 |
| 4.11    | Análise por espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....            | 31 |

|       |                                                                                                             |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.12  | Avaliação do índice de emulsificação do biossurfactante/<br>bioemulsificante extraído.....                  | 31 |
| 4.13  | Teste de fitotoxicidade.....                                                                                | 32 |
| 5     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                 | 33 |
| 5.1   | Produção do biossurfactante.....                                                                            | 33 |
| 5.2   | Produção do bioemulsificante.....                                                                           | 34 |
| 5.2.1 | <i>Caracterização macroscópica e microscópica da emulsão do<br/>Penicillium sp e Chrysosporium sp</i> ..... | 38 |
| 5.3   | Potencial do biossurfactante/bioemulsificante na dispersão de<br>petroderivados em água.....                | 40 |
| 5.4   | Caracterização do biossurfactante/ bioemulsificante.....                                                    | 42 |
| 5.5   | Análise química e carga iônica do biossurfactante/<br>bioemulsificante.....                                 | 43 |
| 5.6   | Espectro de infravermelho (FTIR).....                                                                       | 44 |
| 5.7   | Teste de eficiência do biossurfactante/ bioemulsificante extraído...                                        | 45 |
| 5.7.1 | <i>Índice de emulsificação em hidrofóbico poluente</i> .....                                                | 45 |
| 5.8   | Teste de fitotoxicidade.....                                                                                | 48 |
| 6     | CONCLUSÃO .....                                                                                             | 50 |
|       | REFERÊNCIAS .....                                                                                           | 51 |

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, os surfactantes sintéticos vêm sendo amplamente utilizados em diversos segmentos industriais, desde alimentícios até farmacêuticos. Eles possuem propriedades químicas anfipáticas com ampla produção, por serem originados do petróleo e seus derivados. Seu uso em excesso e descarte incorreto apresentam riscos ao meio ambiente. (Rebello et al., 2014, Rodríguez et al., 2021).

Os surfactantes impactam negativamente os ecossistemas aquáticos, sendo uma das principais fontes de poluição. Eles estão presentes em efluentes industriais que frequentemente são despejados em rios, mares e lagos. Suas moléculas interferem nas funções celulares de microalgas e outros microrganismos, impactando a cadeia alimentar e, eventualmente, os seres humanos (Gautam et al., 2023).

Com o amplo uso de petroderivados, compostos por misturas complexas de moléculas de hidrocarbonetos, substâncias tóxicas e potencialmente cancerígenas são liberadas no meio ambiente. Estudos indicam que fungos e bactérias possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos, oferecendo uma perspectiva promissora para aplicações em bioprocessos (Maddela et al., 2015).

Os biosurfactantes e bioemulsificantes representam alternativas promissoras aos surfactantes químicos convencionais (Da Silva et al., 2022), oferecendo vantagens como menor custo, propriedades comparáveis ou até superiores em termos de limpeza e formação de emulsões, além de serem menos tóxicos e altamente eficazes em aplicações relacionadas à biorremediação (Kappeli et al., 1984).

Os fungos são seres heterotróficos, compondo uma boa parcela dos seres vivos no planeta, tendo seu próprio reino naturalmente bons em realizar processos de decomposição de matéria orgânica (Nazir et al., 2022). Os fungos filamentosos detêm de capacidade metabólica de ampla conversão de resíduos orgânicos, para geração de bioprodutos, passíveis de aplicações industriais com bom valor agregado (Sadeghian et al., 2023).

O Brasil, como um dos maiores produtores de alimentos, gera uma enorme quantidade de resíduos agroindustriais, grande parte descartada de forma inadequada em aterros sanitários (Freitas et al., 2021). Esses resíduos são ricos em nutrientes, oferecendo um grande potencial para biotransformação. Cascas de frutas e legumes, óleos residuais, bagaços e caroços, entre outros, podem ser reaproveitados por meio de processos fermentativos (Sala et al., 2021).

Os processos de biotransformação por fungos têm sido utilizados desde os primórdios, especialmente na fabricação de alimentos e bebidas. Atualmente, a química verde busca a redução da geração de resíduos poluentes e tem bastante interesse na utilização de fungos em bioprocessos para produção de biocombustíveis, biopolímeros, enzimas, biolubrificantes, biossurfactantes e bioemulsificantes (Punt et al., 2011).

Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo comparar o potencial biotecnológico para a produção de biossurfactante e bioemulsificante dos fungos filamentosos *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*, usando como substratos rejeitos agroindustriais, casca de abacaxi e óleo pós-fritura. Tal processo torna-se uma estratégia atraente e ecossustentável por promover e minimizar os impactos ambientais causados por estes rejeitos.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir biossurfactantes/bioemulsificante, por fungos filamentosos sendo *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*, utilizando como substratos cascas de frutas e óleo pós-fritura.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a produção de biossurfactante/bioemulsificante por *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* utilizando como substrato casca de abacaxi e óleo pós-fritura;
- Analisar a eficiência do biossurfactante produzido por *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* através das propriedades físico-químicas;
- Comparar a capacidade do biossurfactante produzido pelos fungos filamentosos na dispersão de poluentes hidrofóbicos em água com o surfactante comercial;
- Avaliar a possível toxicidade do biossurfactante/bioemulsificante produzido por cada cepa no crescimento da raiz das sementes de alface (*Lactuca sativa*) como modelo experimental;
- Investigar as características microscópicas e macroscópicas das emulsões formadas na presença de óleos pelo biossurfactante/bioemulsificante produzidos pelos fungos filamentosos;
- Investigar a composição química do biossurfactante/bioemulsificante;
- Comparar e avaliar o potencial biotecnológico das cepas *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* na produção de biossurfactante/bioemulsificante.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos fazem parte do reino Fungi, tendo como principal característica morfológica a formação de hifas sendo multicelulares, estruturas facilitadoras no processo de reprodução e absorção de nutrientes (Freitas, 2022).

Os fungos filamentosos, também conhecidos como bolores, destacam-se pela eficiência na clivagem e biodegradação de nutrientes. Eles são capazes de crescer em condições de pH tendendo à ácido e em ambientes com baixa disponibilidade nutricional (Arun et al., 2023).

A estrutura micelial presente nesses microrganismos facilita a bioconversão de fontes de carbono, nitrogênio e outros componentes no ambiente, até mesmo secretar biomoléculas para facilitar a interação em ambientes com presença abundante em água (Rodriguez et al., 2024).

Processos biotecnológicos vêm sendo aplicados com fungos filamentosos, devido a versatilidade dos metabólitos gerados, desde produtos alimentícios fermentados até ácidos orgânicos, antibióticos, biossurfactantes, sendo diretamente aplicados na indústria farmacêutica e química (Dzurendová et al., 2021).

#### 3.2 *Penicillium* sp

O gênero *Penicillium*, formado por mais de 200 espécies, é de grande relevância no âmbito de pesquisas e de produção de antibióticos e metabólitos secundários, com diversas propriedades aplicáveis a indústria farmacêutica. Caracterizado como endofítico na sua grande maioria, realiza o beneficiamento de proteção para os hospedeiros vegetais por proporcionar a inibição de fitopatógenos e a de biocontrole no ecossistema (Toghueo et al, 2020).

O crescimento de fungos do gênero pode ocorrer na presença de toxigênicos, visto que espécies como *Penicillium chrysogenum* são capazes de produzir proteínas como PgAFP com atividade biológica. O *Penicillium nalgiovense* apresenta metabólitos secundários antifúngicos, evidenciando o desempenho de aplicações em processos industriais (Ren et al. 2020).

Segundo Kulkarni et al.(2020), fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Stemphylium* e *Penicillium* têm habilidade na produção de proteínas ativas de superfícies, sendo tensoativas com propriedades anfipáticas, facilitadoras na fixação das hifas em

superfícies hidrofóbicas. A espécie *Penicillium islandicum*, em fermentação submersa, obteve redução da tensão superficial com valores próximos da surfactina sintética vendida comercialmente.

A Figura 1 mostra a colônia do *Penicillium sp*, na qual possui características macroscópicas de tonalidade escura e bordas claras, sem estruturas de micélios aéreo.

**Figura 1** - Colônia do *Penicillium sp* em meio ágar batata.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

### 3.3 *Chrysosporium sp*

Fungos dos gêneros *Clasdosporium*, *Fusarium*, *Chrysosporium* e *Scopulariopsis* compõem um grupo que tem capacidade de degradar queratina, importante proteína formadora estrutural em diversos animais e humanos, sendo em sua grande maioria patógenos (Błyskal, 2009).

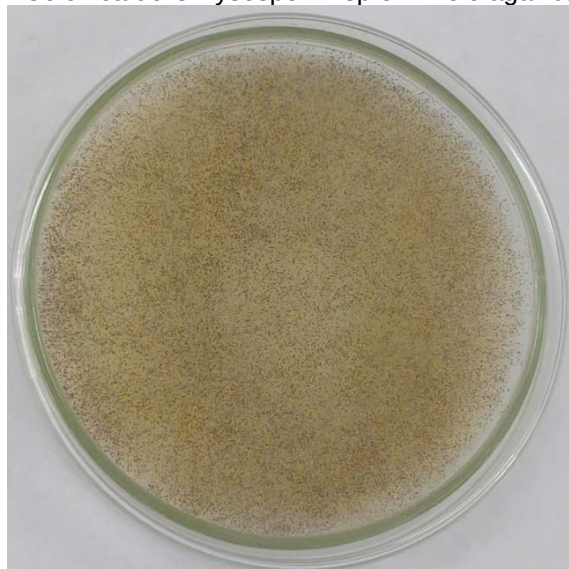
O *Chrysosporim* é considerado um queratinofílico facilmente encontrado no solo. No processo bioquímico, enzimas como a queratinases é secretada de forma extracelular, sendo enzimas proteases com vantagens para aplicação industrial (Alwakeel et al., 2021).

Metabólitos presentes no caldo de cultura do gênero foram identificados com função antitumoral (Hayakawa et al., 1998). Nanotubos de carbono são usados como estrutura para fixar o fungo *Chrysosporim* em processos adsorção para retirada de cádmio (Naseri et al., 2023).

O crescimento celular do *Chrysosporim sp* apresenta características

macroscópicas, desenvolvimento de micélios aéreo longos com tonalidade clara, próximo da cor branca, esporos escuros e boa amplitude no cultivo laboratorial controlado, conforme a Figura 2.

**Figura 2** - Colônia do *Chrysosporium* sp em meio ágar batata.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

### 3.4 Metabólitos secundários

Os fungos filamentosos são fontes de produção de metabólitos secundários, enzimas e biomassa, bastante utilizados em seguimentos têxtil e alimentar, produzidos através de fermentação submersa ou em estado sólido (Cairns et al, 2019).

Os Metabólitos podem ser divididos em dois grupos primários, compostos por substâncias essenciais nas funções vitais do microrganismo, como crescimento e nutrição. Secundários são voltados para processos adaptativos e proteção (Akilandeswari et al., 2016).

A produção de metabólitos secundários tem relação com os substratos fornecidos e com a espécie do microrganismo, possuindo singularidades, podendo assim a mesma fonte nutricional gerar biomoléculas distintas com apenas a alteração de espécies, condições de pH e temperatura (Kumar et al., 2015).

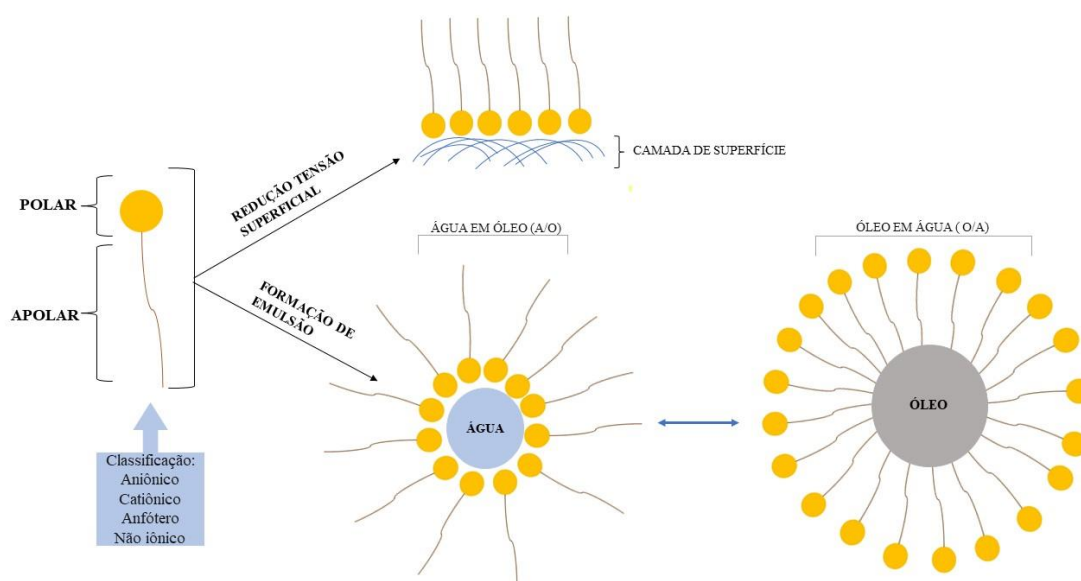
Em geral, a estrutura destas moléculas, possuem baixa massa molecular produzidas por vias biosintéticas (Brakhage, 2013). Os fungos filamentosos podem produzir metabólitos de interesse biotecnológico; no entanto, há o risco de gerarem micotoxinas que limitam seu uso para fins humanos (Banani et al., 2016).

Para esta produção, é necessário ajuste nas condições nutricionais, nas fontes de carbono, nitrogênio e ajuste de temperatura e pH. Quando ocorre um bom rendimento de metabólitos, um alto valor é agregado, devido as possibilidades de aplicação (Ren et al., 2020).

### 3.5 Biossurfactantes/ bioemulsificantes

Os biossurfactantes são moléculas com propriedades anfipáticas como mostra a Figura 3 , na qual uma de suas extremidades tem caráter apolar, com ácidos graxos e cadeias de hidrocarbonetos, não tendo assim afinidade com água. Já na outra parte, pode ser polissacarídeos, peptídeo, ânions ou cátions, com polaridade (Hasanshahian, 2014 , Sharma e Saharan, 2016 ).

**Figura 3** - Caracterização estrutural da molécula de biossurfactante e bioemulsificante



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

A classificação dos biossurfactantes vai depender de sua composição química e do microrganismo, sendo ele bactéria ou fungo e suas espécies, como os glicolípídios, fosfolípídeos, ácidos graxos, lipossacarídeos, lipídeos neutros, lipopeptídeos e alguns polímeros particulados (Oliveira et al, 2015). A Tabela 1 apresenta a correlação dos dados de composição bioquímica de biossurfactantes e biomemulsificantes. A identificação de carboidratos, proteínas e lipídios direciona a classificação do tipo de molécula.

**Tabela 1-** Dados sobre composição bioquímica de biossurfactantes e bioemulsificantes.

| Referência                 | Características bioquímicas                                | Tipo de biomolécula                                                                                     | Microrganismo                         |
|----------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Luna et al., 2007          | Lipídios (67%),<br>Carboidratos (11%)<br>Proteínas (7%).   | Mirístico, esteárico e oleico foram os ácidos majoritários detectados na fração lipídica.               | <i>Penicillium</i> sp                 |
| Calvo et al., 2018         | Carboidratos (64,35%)<br>Proteínas (32,57%)                | Exopolissacarídeos (EPS) biopolímeros                                                                   | <i>Ochrobactrum anthropi</i> cepa AD2 |
| Paraszkiewicz et al., 2002 | Proteínas (25%)<br>Polissacarídeo (48%)                    | Heteropolímero, que consistia em partes de polissacarídeos e proteínas, sem a presença de ácidos graxos | <i>C. lunata</i> IM 2901              |
| Jagtap et al., 2010        | Lipídios (3,8%)<br>Carboidratos (43%)<br>Proteínas (50,5%) | Proteoglicano (proteína e polissacarídeo)                                                               | <i>Acinetobacter junii</i>            |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024

Os biossurfactantes são compostos com desempenho na formação de espumas, de emulsões, redução da tensão superficial e interfacial de líquidos micivéis, facilitando remoção e dispersão de hidrocarbonetos (Hasanshahian, 2014 , Sharma e Saharan, 2016 ).

A capacidade do biossurfactante de produzir emulsões pode superar a redução da tensão superficial, dependendo do peso molecular. Em geral, a redução da tensão superficial é atribuída a compostos formados por fosfolipídios e saponinas de baixo peso molecular. No entanto, as moléculas produzidas por biotransformação, contendo proteínas e polissacarídeos de alto peso molecular, podem ser classificadas como

bioemulsificantes (Qamar e Pacífico, 2023). A Tabela 2 exibe os grupos funcionais presentes em diversas classificações de bioemulsificantes sendo de bactérias e fungos, em que reforça a singularidade da produção desta biomolécula.

**Tabela 2-** Dados sobre espectros de infravermelho (FTIR) de bioemulsificantes produzidos por diversos microrganismos.

| Referência                  | Bandas de absorção<br>(Tipo de ligação)                                                                                                                                                                                                                                                       | Biomoléculas                                                                   |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Kharangate-Lad et al., 2022 | 3200 e 3320 $\text{cm}^{-1}$ (O-H de compostos poliméricos)<br>1630 e 1660 $\text{cm}^{-1}$ (C = O e C-N de amidas associadas a proteínas)<br>1400 e 1420 $\text{cm}^{-1}$ (C = O dos carboidratos)<br>1060 e 1100 $\text{cm}^{-1}$ (O-H característicos de polissacarídeos e seus derivados) | Exopolissacarídeos (EPS)<br><br>Bacteria:<br>Halobacillus trueperi<br>MXM-16   |
| Meneses et al., 2017.       | 3285 $\text{cm}^{-1}$ (grupo carboidrato -OH)<br>2953 $\text{cm}^{-1}$ (ácidos graxos)<br>2852 $\text{cm}^{-1}$ (grupo éster hidrocarbonetos alifáticos combinados com uma porção lipídica)<br>712 $\text{cm}^{-1}$ e 1633 $\text{cm}^{-1}$ (grupos ésteres insaturados (C=O-C=C))            | Novo biossurfactante<br><br>Fungo:<br>Aureobasidium thailandese LB01           |
| Balan et al., 2017          | 3425 $\text{cm}^{-1}$ (estiramento NH presente na porção peptídica)<br>2777 e 1673 $\text{cm}^{-1}$ (presença do grupo ácido (COOH) e do grupo hidroxila dos aminoácidos)<br>1737 e 1647 $\text{cm}^{-1}$ (carboxílico dos aminoácidos e ao grupo carboxílico dos ácidos graxos)              | Lipopeptídico<br><br>Bacteria:<br>Aneurinibacillus aneurinilyticus cepa SBP-11 |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2024

Os fungos podem produzir mais de um tipo de biossurfactante, basta alterar os substratos e as espécies. A Tabela 3 apresenta espécies de fungos filamentosos e a

classificação do biossurfactante, nos trabalhos alguns autores não identificaram a classificação da biomolécula devido a falta de testes.

**Tabela 3-** Fungos produtores de biossurfactante conforme espécie fúngica.

| <b>Espécie</b>                             | <b>Biossurfactante</b>          | <b>Referências</b>     |
|--------------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| <i>Fusarium, Penicillium e Trichoderma</i> | Tipo não identificado           | Méndez et al., 2017    |
| <i>Aspergillus sp.RFC-1</i>                | Glicolipídios                   | Al-Hawash et al., 2019 |
| <i>Rhizopus arrhizus</i>                   | Tipo não identificado           | Milagre et al., 2018   |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>             | lipopeptídeos                   | Gautam et al., 2014    |
| <i>Cunninghamella echinulata</i>           | Carboidrato complexo            | Silva et al., 2014     |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> isolar Shu2   | Tipo não identificado           | Othman et al., 2022    |
| <i>Ustilago maydis</i>                     | Lípidos manosileritritol (MELs) | Becker et al., 2021    |

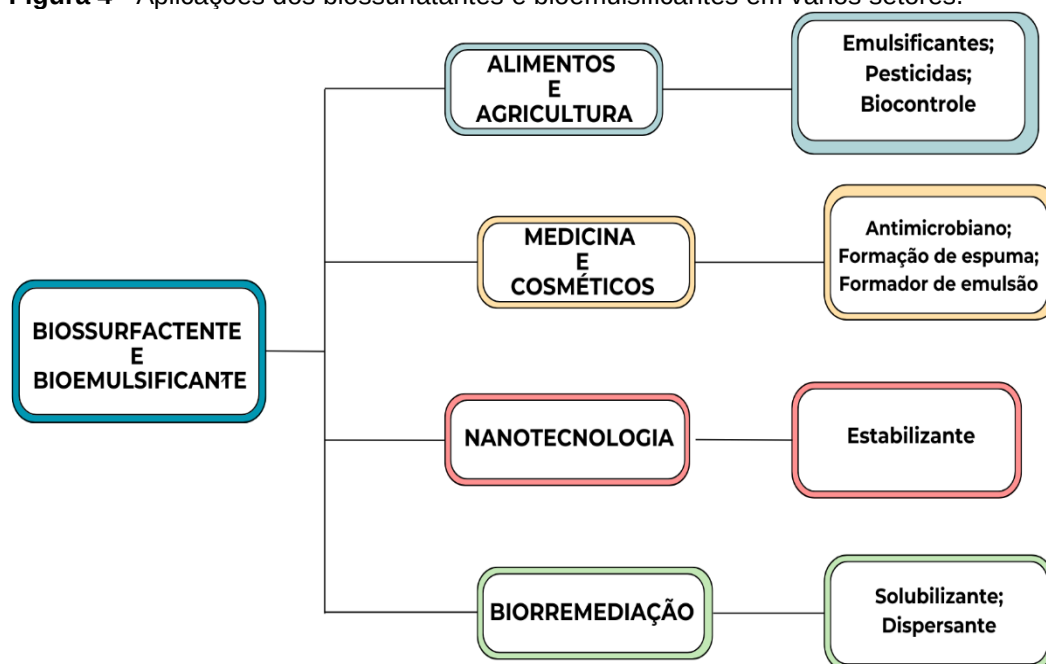
Fonte: adaptada de Ahmad et al, 2023.

A demanda por biossurfactantes aumenta de forma promissória por ser biodegradável e de baixa toxicidade. Há uma taxa de crescimento em relação ao ano de 2017 para 2022 de 5,6% no valor de sua comercialização. Ao intensificar a conscientização do consumo consciente, o mercado europeu se tornou um dos maiores consumidores desse bioproduto (Ambaye et al., 2021).

### 3.6 Biossurfactantes/bioemulssificantes aplicações

A gama de aplicação da biomolécula é extraordinária, desde tratamento de efluentes até adsorventes de metais pesados, biorremediação de petroderivados em solos, partes componentes de produtos farmacêuticos e cosméticos (Bezerra et al., 2018 , Sun et al., 2019 ). A Figura 4 mostra as aplicações em segmentos diversos.

**Figura 4** - Aplicações dos biossurfactantes e bioemulsificantes em vários setores.



Fonte: Kashif et al., 2022.

O pré-tratamento de efluentes com índices elevados de gordura pode ser aprimorado com uso de biossurfactantes. Uma vez que reduz a concentração de triglicerídios, promove atividade enzimática, aumenta a solubilidade, consequentemente melhora o desenvolvimento microbiano no efluente e evita um subsequente tratamento com agentes químicos (Damasceno et al., 2014).

Na biorremediação, os biossurfactantes respondem significativamente, pois destroem poluentes petroquímicos. Além disso, os biossurfactantes são capazes de remover óleos de amostras de solos e águas residuais, com potencial para reaproveitamento. Essa abordagem apresenta uma aceitação superior em relação às técnicas físico-químicas consolidadas e mais destrutivas, como extração por solventes e incineração, sendo considerada uma tecnologia de bom custo-benefício e baixo custo (Baranger et al., 2021).

### 3.7 Resíduos agroindustriais

O consumo de alimentos tem aumentado com o crescimento populacional, o que, consequentemente, resulta em maior desperdício e acúmulo de resíduos no meio ambiente, principalmente de matéria orgânica proveniente da agroindústria e alimentos processados. Existe um crescente interesse no reaproveitamento e transformação da biomassa para a fabricação de novos produtos (Sala et al., 2021).



Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2019), o volume de alimentos não consumidos transformados em desperdício era de aproximadamente 1,6 milhões de toneladas, resultando em prejuízos econômicos de 750 milhões de dólares.

Os resíduos são classificados em dois grupos básicos: de origem animal, provenientes de indústrias de laticínios, pesca e processados de carne; e de origem vegetal, que incluem cascas de frutas e legumes, bagaços, fibras, sementes, talos e partes impróprias para consumo direto. A extração de enzimas como pectinolíticas, lipases, invertases ocorre para a aplicação industrial (Esparza et al., 2020).

Para boa bioconversão de substratos selecionados, é ideal que haja uma relação de proporcionalidade de 3:1 entre o carbono e nitrogênio. O nível de componentes orgânicos no substratos mostra o nível de biodegradação e biotransformação por microrganismos, principalmente os fungos filamentosos (Sarangi et al., 2023).

Os substratos usados no processo de biotransformação para produção de biossurfactante por microrganismos pode ser observado na Tabela 4. O óleo residual vem tornando-se bastante versátil como fonte de carbono, tanto para bactérias como fungos gerando diversas tipos de biomoléculas.

**Tabela 4-** Resíduos usados por microrganismos para produção de biossurfactantes

| <b>Microrganismo</b>                      | <b>Resíduo</b>                                          | <b>Biossurfactante</b> | <b>Referências</b>     |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615           | Óleo de soja residual (2,0%)                            | Lipopeptídeos          | Durval et al., 2020    |
| <i>Candida bombicola</i> UR M 3718        | Melaço de cana (5%) óleo residual de soja (5,0%)        | Glicolipídios          | Al-Hawash et al., 2019 |
| <i>Lactococcus lactis</i> CECT-4434       | Soro de leite (15,0%), vinhaça (1,0%) e sacarose (2,0%) | Glicolipopeptídeo      | Vera et al., 2018      |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RHNK 22 | Suco de caju clarificado (4–9%)                         | Não identificado       | Durval et al., 2020    |

Fonte: adaptada de Sarubbo et al, 2022.

Os biossurfactantes e enzimas se tornam destaque em aplicações. Os resíduos

agroindustriais são fontes vastas de carbono, proteínas, nitrogênio, minerais, lípidios, componentes importantes para todos os seres vivos e para a geração de novos produtos. A bioconversão microbiana, a tecnologia enzimática e a engenharia metabólica possibilitam metodologias e novas perspectivas de uso dos resíduos na produção de bioprodutos (Rojas et al., 2022).

### **3.7.1 Substratos: cascas de frutas**

Subprodutos como cascas, caules, polpa e bagaço são constantemente desperdiçados na indústria e nas residências. São considerados partes menos essenciais no consumo direto ou na produção de determinados produtos (Pathania; Kaur, 2022).

A casca, de modo geral, corresponde a cerca de 40% do peso de frutas como manga e abacaxi. Quando somadas as sementes e outras partes, como coroa e folhagens, chega a 60% do peso total. Subprodutos com grande composição nutricional, favorável para vastas aplicações (Tirado-Kulieva et al., 2022).

Conforme Sharma et al., (2016), frutas cítricas têm em suas cascas um percentual de 25,71% a 80,41% de fibras, além dos componentes principais: carbono e nitrogênio, e pH tendendo a ácido, de maneira a propiciar condições benéficas ao desenvolvimento dos fungos filamentosos para conversão em bioprodutos.

A fermentação é uma das principais vias para o desenvolvimento de novos produtos, com a vantagem dos substratos serem provenientes de descartes e processo simples em termos mecânicos. Os subprodutos agroindustriais são fontes de baixo custo e alternativas viáveis de reaproveitamento para a produção de metabólitos fúngicos, com o objetivo de reduzir os problemas ambientais e econômicos (Panesar et al.; 2015).

#### **3.7.1.1 Casca de Abacaxi**

Segundo Rosli et al.,(2023), o Brasil produz em torno de 2,2 milhões de toneladas de abacaxi, sendo um dos maiores produtores atualmente. O abacaxi é uma fruta tropical, apresenta um caule curto, folhas estreitas e firmes, que se desenvolvem em frutos de tamanho médio a grande. Seu miolo e casca mostram potencial como substratos para fermentação devido ao alto teor de açúcar.

Estudos desenvolvidos por Jacqueline e Velvizhi, 2024, mostram que as cascas do abacaxi são fontes ricas em fibras e enzimas. A Tabela 5 apresenta a composição

centesimal da cascas de abacaxi, que compõem 50% dos resíduos sólidos dessa fruta.

**Tabela 5-** Composição centesimal da casca de abacaxi.

| <b>Casca de abacaxi <i>in natura</i></b> |                   |
|------------------------------------------|-------------------|
| <b>Características</b>                   | <b>Percentual</b> |
| Massa seca                               | 11,58%            |
| Proteína bruta                           | 6,82%             |
| Carboidratos totais                      | 87,61%            |
| Carboidratos não fermentável             | 29,57%            |
| Matéria mineral                          | 5,04%             |
| Extrato etéreo                           | 0,53%             |
| Nitrogênio digestível total              | 67,29%            |
| Digestibilidade <i>in vitro</i>          | 80,77%            |

Fonte: Ferreira et al., 2018.

Os substratos do abacaxi, por serem ricos em compostos fenólicos, antioxidantes, podem ser convertidos em bioetanol, biossurfactantes e biometano. Abordagens nas quais a biotecnologia vem aprimorando o uso sustentável dos resíduos (Sarangi et al., 2022).

De acordo Azman et al., 2024, a casca do abacaxi é uma fonte natural para a produção de biossurfactantes, utilizado para aumentar a solubilidade dos nutrientes do solo, além de servir como fertilizantes, melhorando a qualidade do solo a longo prazo. Maia et al., 2024 relata que 32,3% da produção nacional do abacaxi está concentrada na região nordeste do Brasil, com destaque para duas cidades na Paraíba: Itapororoca e Pedras de Fogo.

### **3.7.2 Óleo Pós- Fritura**

Os efluentes com composição alta de óleos são constantemente descartados por indústrias, comércios e residências. Muitas vezes, não são reutilizados ou descartados de maneira coerente ( Medeiros et al., 2022 ).

Os óleos vegetais são bastante usados em processos de conservação ou preparação de alimentos fritos, sendo os óleos de soja, algodão, girassol, palma mais

comercializados. O processo de fritura com aquecimento aumenta a insaturação das ligações, modificando a estrutura química e produzindo substâncias tóxicas (Sanibal et al., 2002).

Na indústrias, a utilização de gorduras e óleos ocasionam a geração de resíduos hidrofóbicos. O acúmulo desses resíduos tem aumentado o interesse da utilização desses materiais como fonte de nutrientes para transformação microbiana (Souza, 2016). Segundo Andrade et al., 2018, o óleo de soja pós-fritura possui três fontes disponíveis de carbono, conforme a Tabela 6.

**Tabela 6-** Componentes químicos do óleo de soja pós-fritura.

| <b>Componentes em ácidos graxos</b> | <b>Quantidade (%)</b> |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Monoinsaturados                     | 29,78                 |
| Saturados                           | 21,06                 |
| Polinsaturados                      | 55,97                 |

Fonte: adaptada de Andrade et al., 2018.

A gordura vegetal de palma está sendo difundida para substituir outras gorduras vegetais, mas ao alcançar elevadas temperaturas, ocorre uma modificação em suas estruturas, deixando elas mais insaturadas. Segundo Fernandes et al., (2018), esse tipo de fonte oleaginosa tem ácido palmítico, ácido oleico e tem ausência de ácidos linolênico.

Óleo de palma e óleo de soja pós-fritura podem ser utilizados como matéria-prima com grande fornecimento de carbono para biocorverção em processos fermentativos de bioprodutos em especial biossurfactantes (Perera et al., 2022).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Microrganismo e manutenção

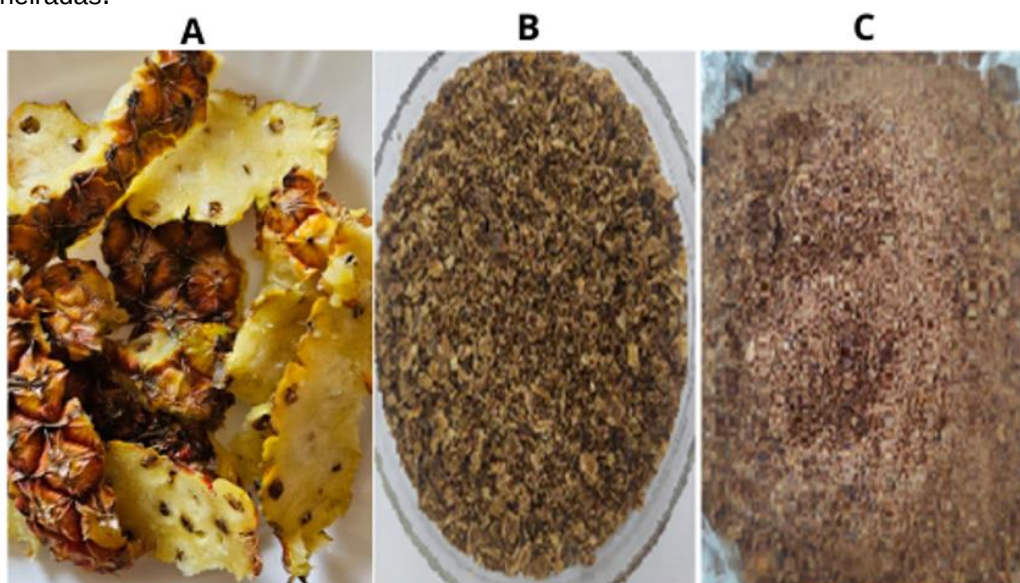
O *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* isolados de outras culturas no NUPEA (Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As culturas mantidas em meio Ágar Sabouraud a 5 °C e para renovação celular e produção de novos esporos fúngicos foram realizados repiques a cada 15 dias.

### 4.2 Resíduos agroindustriais/Substratos

Na formulação dos meios de produção foi utilizado cascas de abacaxi (*Ananas comosus*) resultante do consumo diário residencial de moradores da cidade de Campina Grande-PB, óleo pós-fritura proveniente de estabelecimentos comerciais do localizados no Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Seguindo a metodologia relatado por Santos et al. (2017) com adaptações, as cascas de abacaxi foram higienizadas, cortadas e secas em estufa a 45°C por 24h. Em seguida, foram trituradas em moinho de facas e peneiradas no smash 04 do conjunto de peneiras para obter partículas menores e aumentar a área de contato conforme Figura 5.

**Figura 5** - Representação das etapas de preparação das cascas de abacaxi (A) cascas de abacaxi cortadas, (B) cascas de abacaxi trituradas após secagem, (C) cascas peneiradas.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

### 4.3 Planejamento Experimental

O planejamento fatorial Box Behnken Desing foi desenvolvido pelo Statistica® 12 (StatSoft Inc., USA) com 12 ensaios e três pontos centrais. Foi executado para investigar a influência das variáveis independentes, sendo óleo pós-fritura, casca de abacaxi e glicose, com variáveis respostas: tensão superficial e índice de emulsificação. As variáveis codificadas conforme mostra a Tabela 7, da seguinte maneira: Óleo Pós-fritura ( -1 ) 1mL, ( 0 ) 1,5mL, ( 1 ) 2mL, Casca de Abacaxi ( -1 ) 0,75g, ( 0 ) 1g, ( 1 ) 1,25g, Glicose ( -1 ) 0,5g, ( 0 ) 1g, ( 1 ) 1,5g.

**Tabela 7-** Matrix do planejamento Box Behnken Desing.

| Condições | Fator A          | Fator B          | Fator C |
|-----------|------------------|------------------|---------|
|           | Óleo Pós-fritura | Casca de Abacaxi | Glicose |
| 1         | -1               | -1               | 0       |
| 2         | 1                | -1               | 0       |
| 3         | -1               | 1                | 0       |
| 4         | 1                | 1                | 0       |
| 5         | -1               | 0                | -1      |
| 6         | 1                | 0                | -1      |
| 7         | -1               | 0                | 1       |
| 8         | 1                | 0                | 1       |
| 9         | 0                | -1               | -1      |
| 10        | 0                | 1                | -1      |
| 11        | 0                | -1               | 1       |
| 12        | 0                | 1                | 1       |
| 13        | 0                | 0                | 0       |
| 14        | 0                | 0                | 0       |
| 15        | 0                | 0                | 0       |

Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

### 4.4 Produção do biossurfactante/bioemulsificante

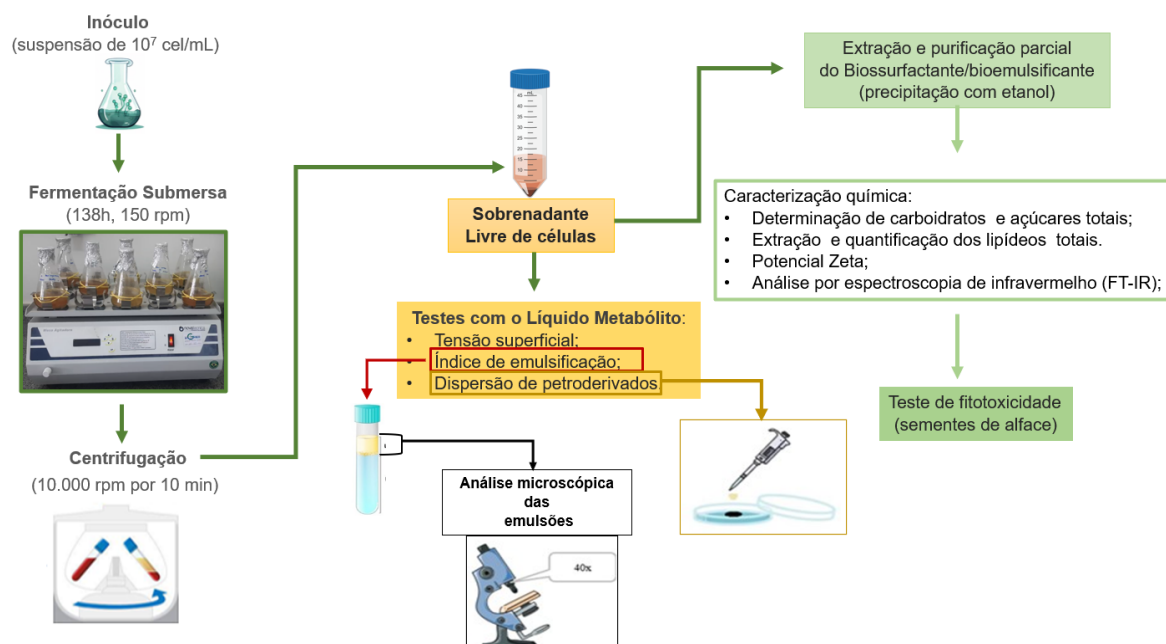
#### 4.4.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com esporos fúngicos jovens do *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* em erlenmeyer contendo 100 mL de água estéril. Foi realizada a contagem até atingir uma suspensão de  $10^7$  cel/mL, 10% (v/v) foi utilizado para cada ensaio do planejamento experimental. O pH foi determinado por meio de potenciômetro em alíquotas coletadas dos meios de produção livre de células.

#### 4.4.2 Fermentação

A produção de biossurfactante/bioemulsificante (BS/BE) foi realizada por fermentação submersa. De acordo com o fluxograma da Figura 6, em frascos de Erlenmeyers de 125 mL, foram acrescidos os substratos em concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial (Tabela 7), e água para atingir o volume final de 50mL, incubados a 28°C durante 138 h, sob agitação orbital de 150 rpm. A biomassa foi separada do líquido metabólico, seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 25°C, seguido de filtragem em papel Wathmann Nº1. A partir do líquido metabólito livre de células foram realizadas a determinação do pH, tensão superficial, índice e atividade de emulsificação e dispersão de óleo em água.

**Figura 6** - Fluxograma da produção e caracterização do biossurfactante/bioemulsificante.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

#### 4.5 Tensão superficial

Segundo a metodologia Behring et al,(2004), a tensão superficial foi medida pelo método do peso da gota, empregando o uso de uma bureta de 25mL e becker de 50mL. Foi realizado o peso do antes e depois das 20 gotas reunidas, calculado pela Lei de Tate na equação 1.

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot f} \quad (1)$$

#### 4.6 Índice de emulsificação

Para formação das emulsões, foi adicionado 1mL do líquido metabólito livre de células de cada condição do planejamento descrito na Tabela 5, em tubos separados contendo 1mL de substratos hifrofóbicos, sendo óleo de motor e óleo pós-fritura. Estes foram homogenizados por 2min no vortex, segundo a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987). Após 24h, foi realizada a leitura da emulsão com auxílio do paquímetro manual. O percentual foi determinado pela equação 2 do índice de emulsificação.

$$IE(\%) = \frac{He}{Ht} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.7 Análise microscópica da emulsão

Conforme Maia et al, 2018 com adaptação, para visualização das emulsões formadas após 24h nas melhores condições, uma gota foi retirada com auxílio de um pipeta de 10µL e sobreposto em lâmina, posteriormente observado em microscópio óptico com aumento de 40X, e realizado a captura da imagem com câmera digital.

#### 4.8 Extração e purificação parcial do biossurfactante/ bioemulsificante

O biossurfactante/bioemulsificante produzido conforme o planejamento fatorial com melhor resposta do I.E%, sendo respectivamente o *Penicillium sp.* na condição 9 e *Chrysosporim sp.* na condição 2, ambos extraídos com adaptações segundo Kharangate-Lad et al. (2022) por via precipitação com etanol 96%, em mistura com o líquido metabólito na proporção de 3:1 de volume, seguido de resfriamento a temperatura de 4°C durante 24h. Após centrifugado a 5.000g durante 15min a 8°C. Os precipitados foram solubilizados em água destilada para retirada do etanol e em seguida liofilizado e armazenados em temperatura ambiente.

#### 4.9 Caracterização química do biossurfactante/bioemulsificante

##### 4.9.1 Determinação de carboidratos e açúcares totais

A determinação bioquímica de carboidratos partiu de soluções do material liofilizado com as respectivas concentrações, *Penicillium sp.* (1,2 mg/ml), *Chrysosporium sp.* (1,03 mg/ml).

O teste de biorremocão de petroderivados será realizado utilizando amostra de



solo arenoso e em água. O teor de carboidratos/açúcares totais foi estabelecido pelo método ácido fenol-sulfúrico conforme Dubois et al., (1956), sendo o padrão a D-glicose e a curva de calibração construída a partir de uma solução com concentração de 0,1 mg/ml com variação para os pontos de 20,40,60,80,100 µg/ml. Para análise, 0,5ml de água destilada (sendo o branco), 0,5 ml de solução de fenol a 5% e 2,5ml de ácido sulfúrico P.A foram adicionados em tubos de ensaio. O procedimento foi repetido com os biossurfactante/ bioemulsificantes nas condições de diluição de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . O cálculo realizado pela equação da reta do gráfico de Absorbância v/s concentrações.

#### 4.9.2 Extração e quantificação dos lipídeos totais

Para quantificação de lipídeos extrações sucessivas com clorofórmio: metanol (2: 1, 1: 1, 1: 2 v/v), executadas nos bioemulsificantes do *Penicillium sp* (43,4mg) e *Chrysosporim sp.* (41 mg) sobre agitação em vórtex durante 5 minutos a cada fase de extração, em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 3min. O extrato lipídico presente no sobrenadante, foi evaporado em estufa de circulação por 30 min a 105°C (Manocha et al., 1980). A determinação do percentual de lipídeos totais no BS/BE foi realizada utilizando o método gravimétrico, conforme a equação 3 apresentada a seguir.

$$\text{Lipídeos Totais(\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)}}{\text{Biomassa (g)}} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.10 Potencial Zeta

A carga iônica do biossurfactante/ bioemulsificante foi analisada por meio de um potenciômetro Zeta, modelo ZetaPlus, da Brookhaven Instruments.

#### 4.11 Análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR)

A Os grupos funcionais do biossurfactante/bioemulsificante foram realizados analisados por FTIR. O espectro de modelo Vertex 70 da BRUKER, com varredura de 200 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.12 Avaliação do índice de emulsificação do biossurfactante/ bioemulsificante extraído

Para avaliação das amostras, foram preparados duas soluções de cada biossurfactante/bioemulsificante do *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* nas

concentrações de 0,1 mg/mL e 1mg/mL. O índice de emulsificação e análise microscópica foram realizados conforme a seção 4.6 e 4.7, para ambas concentrações e o substrato hidrofóbico foi o óleo de motor queimado sendo o agente poluente.

#### 4.13 Teste de fitotoxicidade

Seguindo Hofstätter et al., 2024 os testes de fitotoxicidade em sementes de alface americana (*Lactuca sativa*) da marca Feltrin, passaram por uma lavagem em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 0,1% em agitação leve durante 3 min para retirada de contaminantes microbianos. Em seguida as sementes foram separadas da solução por filtração e lavadas novamente com água estéril. Para o ambiente de germinação, as 10 sementes de alface distribuídas em Placas de Petri (9,5 cm de diâmetro) com papel filtro qualitativo (devidamente estéreis) embebidos com 2 ml com as respectivas soluções: água (controle), *Chrysosporium sp* (0,1mg/ml) e (1mg/ml), *Penicillium sp.* (0,1mg/ml) e (1mg/ml). As placas foram incubadas por 120h em ambiente com pouca luminosidade em temperatura ambiente, os ensaios realizados em duplicatas, o crescimento radicular vou medido com uso de régua.

A fitotoxicidade pode ser determinada pela germinação das sementes (G), crescimento da raiz (CR) e índice de germinação (IG) de acordo com as equações 4, 5 e 6 (Tiquia et al., 1996).

$$\%G = \frac{\text{média de sementes teste germinadas}}{\text{média de sementes no controle}} \times 100 \quad (4)$$

$$\%CR = \frac{\text{média de sementes teste germinadas}}{\text{média de sementes no controle}} \times 100 \quad (5)$$

$$IG = \frac{\%G \times \%CR}{100} \quad (6)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de biossurfactante

Neste estudo, os resíduos agroindustriais de interesse foram a casca de abacaxi e óleo pós-fritura como fonte de carbono e nitrogênio. A glicose foi introduzida aos substratos com o intuito de disponibilizar fonte de carbono de fácil metabolização inicial, para auxiliar a produção do biossurfactante/ bioemulsificante (BS/BE) pelo *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*. Para triagem e avaliação do comportamento dos fungos filamentosos na produção do biossurfactante, as três variáveis com 3 níveis resultou na matriz do planejamento experimental Box Behnken, com 12 ensaios e 3 pontos centrais conforme Tabela 8.

**Tabela 8-** Matrix do planejamento com os fatores de influência na tensão superficial para *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*.

| Condições | Fator A          | Fator B          | Fator C | <i>Penicillium sp</i> | <i>Chrysosporium sp</i> |
|-----------|------------------|------------------|---------|-----------------------|-------------------------|
|           | Óleo Pós-fritura | Casca de Abacaxi | Glicose | Tensão (mN/m)         | Tensão (mN/m)           |
| 1         | -1               | -1               | 0       | 65,45                 | 61,58                   |
| 2         | 1                | -1               | 0       | 55,74                 | 62,63                   |
| 3         | -1               | 1                | 0       | 59,15                 | 57,28                   |
| 4         | 1                | 1                | 0       | 56,03                 | 59,63                   |
| 5         | -1               | 0                | -1      | 58,55                 | 57,65                   |
| 6         | 1                | 0                | -1      | 57,91                 | 60,76                   |
| 7         | -1               | 0                | 1       | 58,41                 | 57,69                   |
| 8         | 1                | 0                | 1       | 58,28                 | 61,29                   |
| 9         | 0                | -1               | -1      | 60,18                 | 59,99                   |
| 10        | 0                | 1                | -1      | 58,64                 | 58,11                   |
| 11        | 0                | -1               | 1       | 58,36                 | 53,22                   |
| 12        | 0                | 1                | 1       | 56,89                 | 56,31                   |
| 13        | 0                | 0                | 0       | 62,85                 | 57,94                   |
| 14        | 0                | 0                | 0       | 61,44                 | 55,05                   |
| 15        | 0                | 0                | 0       | 67,33                 | 58,74                   |

Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

A tensão superficial apresentou comportamento similar para ambas as culturas, com resultados do *Penicillium sp* de 55,74 mN/m no ensaio 2 com pH variando de 4,5 inicial e 5,5 final. O *Chrysosporium sp* e 53,22 mN/m no ensaio 11 com pH se manteve em 4, com característica mais ácida até o final das 138h de fermentação.

Em comparação com o valor de referência da água, sendo aproximadamente 72mN/m, os valores obtidos apresentam considerável redução da tensão superficial, que reforça o potencial do BS/BE de maneira positiva.

Freitas, (2022) com o *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), obteve tensão superficial de 53,68 mN/m com resíduos de óleo pós-fritura e milhocina. Lima et al.(2016) S31 *Phoma sp.* apresentou tensão 51,03 mN/m, corroborando com os valores obtidos.

Ferreira et al. (2020), apenas disponibilizando o substrato de óleo pós-fritura na presença de *Mucor hiemalis*, alcançou 32mN/m. Demonstrou que é possível potencializar a produção do BS/BE e se equiparar as bactérias, visto que tendem a se destacar com maior aproveitamento com relação a redução da tensão superficial. Vieira et al. (2021), fazendo uso da casca de abacaxi *Bacillus subtilis*, obteve 30, 31 mN/m. Porém, Carmerini et al. (2019) disponibilizou fontes de carbono, glicose, sacarose, manitol e caldo de cana usando *Bacillus pumilus* como biotransformado, que resultou em valores de 56,0 mN/m e 57,8 mN/m, valores superiores aos resultados observados ao *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*.

## 5.2 Produção de bioemulsificante

O bioemulsificante corresponde à biomolécula, assim como o biossurfactante, no qual a principal propriedade é a redução da tensão interfacial entre líquidos imiscíveis. A Tabela 9 apresenta o percentual do índice de emulsificação após 24h do líquido metabólito na presença de óleo pós-fritura e óleo de motor sendo os substratos hidrofóbicos, ambos são resíduos. O ensaio que obteve maior percentual de 81,82% foi o 9 do *Penicillium sp* para o óleo de motor, o *Chrysosporium sp* no ensaio 2 alcançou 45,16% na presença do óleo pós-fritura.

Segundo Willumsen e Karlson (1996), valores acima de 50% podem ser considerados relevantes, assim além da condição 9 as condições 1, 2,3,4,5,6 e 11 do *Penicillium sp* atende o esperado. A Figura 7 mostra o perfil das emulsões o *Penicillium sp* no óleo de motor com o ponto máximo de 81,82% e mínimo de 40,91% o que contribui para o processo de biorremediação, visto que o maior %IE<sub>24</sub> foi com um poluente o óleo de motor. Entretanto, o *Chrysosporium sp* na presença do óleo pós-fritura e óleo de motor, tem comportamento semelhante ao *Penicillium sp* no óleo pós-fritura, com pontos bem próximos de convergência no ensaio 4 e 11. Isso implica

numa possível produção de biossurfactantes diferentes, visto que, isoladamente, o *Chrysosporium sp* nas duas respostas segue um faixa próxima de 28,40% até 45,16%.

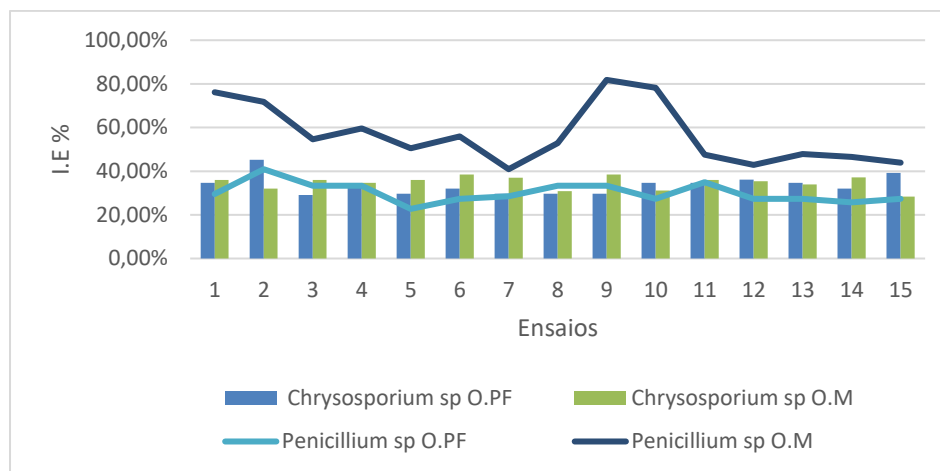
**Tabela 9-** Resultados do índice de emulsificação do *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* de acordo com o planejamento.

| Condições | Índice de Emulsificação (%IE <sub>24</sub> ) |               |                         |               |
|-----------|----------------------------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
|           | <i>Penicillium sp</i>                        |               | <i>Chrysosporium sp</i> |               |
|           | Óleo Pós-fritura                             | Óleo de Motor | Óleo Pós-fritura        | Óleo de Motor |
| 1         | 29,52                                        | 76,19         | 34,62                   | 36,00         |
| 2         | 40,91                                        | 71,82         | 45,16                   | 32,00         |
| 3         | 33,33                                        | 54,55         | 29,03                   | 36,00         |
| 4         | 33,33                                        | 59,52         | 33,33                   | 34,62         |
| 5         | 22,73                                        | 50,45         | 29,63                   | 36,00         |
| 6         | 27,27                                        | 56,00         | 32,00                   | 38,46         |
| 7         | 28,57                                        | 40,91         | 29,63                   | 37,04         |
| 8         | 33,33                                        | 52,86         | 29,63                   | 30,80         |
| 9         | 33,33                                        | 81,82         | 29,63                   | 38,46         |
| 10        | 35,00                                        | 47,62         | 34,62                   | 31,15         |
| 11        | 27,27                                        | 78,26         | 34,62                   | 36,00         |
| 12        | 27,27                                        | 42,86         | 36,15                   | 35,38         |
| 13        | 27,27                                        | 47,83         | 34,62                   | 34,00         |
| 14        | 25,65                                        | 46,59         | 32,00                   | 37,20         |
| 15        | 27,27                                        | 43,90         | 39,20                   | 28,40         |

Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

Entretanto, o *Chrysosporium sp* na presença do óleo pós-fritura e óleo de motor, tem comportamento semelhante ao *Penicillium sp* no óleo pós-fritura, com pontos bem próximos de convergência no ensaio 4 e 11. Isso implica numa possível produção de biossurfactantes diferentes, visto que, isoladamente, o *Chrysosporium sp* nas duas respostas segue um faixa próxima de 28,40% até 45,16%. A Figura 7 mostra o perfil das emulsões o *Penicillium sp* no óleo de motor com o ponto máximo de 81,82% e mínimo de 40,91%.

**Figura 7**-Gráfico dos índices de emulsificação (IE%) com o óleo pós-fritura e óleo de motor para o *Penicillium* sp e *Chrysosporium* sp.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

Neste contexto, o *Penicillium* sp foi promissor quando comparado a outros fungos para o mesmo substrato hidrofóbico óleo de motor. *Mucor circinelloides* UCP 0005 (IE 98%), com casca de jatobá e milhocina (Santiago et al. 2021), *Absidia* sp UCP 1144 (IE 92,31%)( Mendonça et al. 2019) *Absidia* sp com óleo pós fritura 52,63% e óleo de motor 92,31, *Penicillium sclerotiorum* UCP1361 (IE 68%) com substratos soro de leite e cevada (Oliveira et al., 2020). Ambos os fungos produziram bioemulsificante em condições diferentes de menor tensão superficial, ressaltando que a tensão superficial não está ligada diretamente a produção de emulsão.

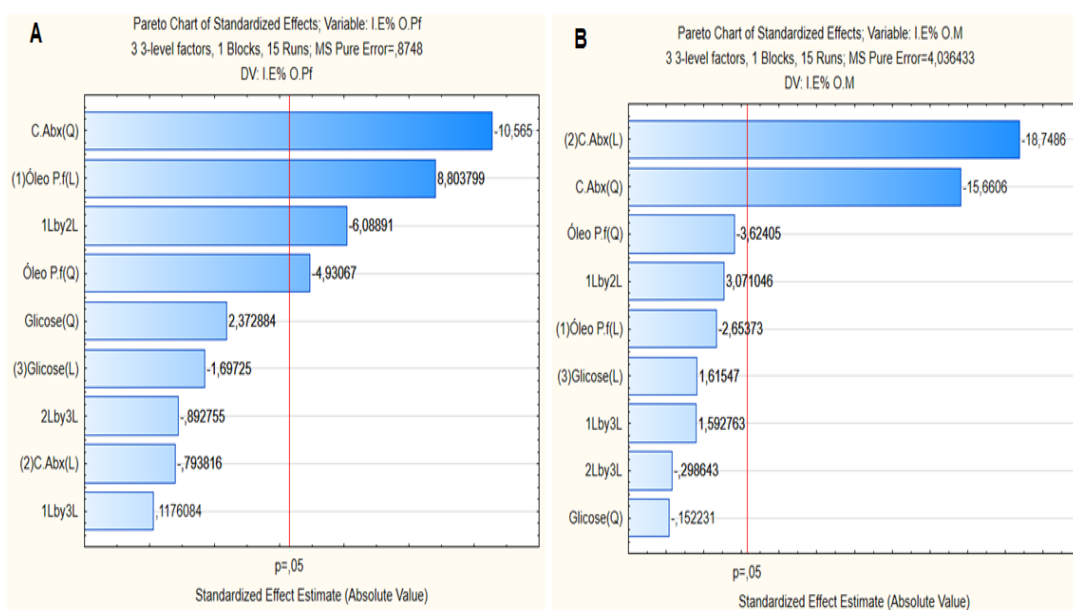
Conforme análise estatística para o índice de emulsificação dos líquidos metabólitos do *Penicillium* sp após 24h na Figura 8 o Diagrama de Pareto com nível de 95% de confiança. Na Figura 8A, o Diagrama de Pareto para o I.E%O.Pf mostra que o óleo pós-fritura usado como substrato e fonte de carbono para *Penicillium* sp foi estatisticamente representativo para o aumento do índice de emulsificação. A casca de abacaxi de maneira quadrática contribuiu de forma negativa para o aumento do índice de emulsificação, assim com a interação da casca de abacaxi com o óleo pós-fritura.

O índice de emulsificação com o substrato hidrofóbico óleo de motor, obteve influência significativa da casca de abacaxi linear e quadrática para o nível baixo do planejamento, resultando na elevação do percentual de resposta (I.E% O.M) apresentado na Figura 8B.

Com o gráfico de superfícies de respostas possibilita-se a visualização da influência das variáveis independentes OPF e cascas de abacaxi em relação às

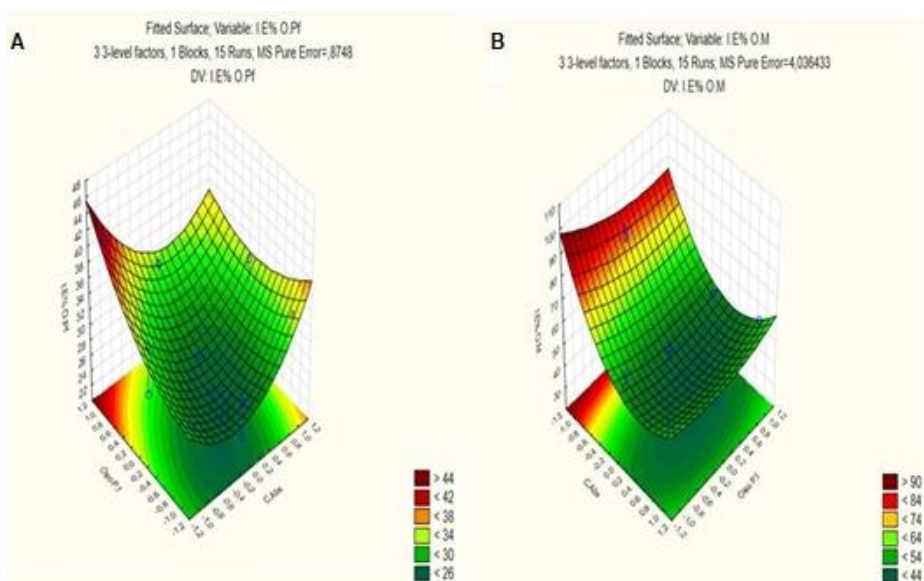
variáveis dependentes IE%O.Pf e IE% O.M. A Figura 9A mostra que, para o aumento do IE%O.Pf, o substrato hidrofóbico óleo pós-fritura contribuiu aumentando em seu nível positivo e a casca de abacaxi no nível negativo. Para o IE% O.M, a casca de abacaxi e o óleo pós-fritura, em seus níveis negativos, favoreceram a maximização conforme a Figura 9B.

**Figura 8-**Diagrama de Pareto para a influência das variáveis independentes na resposta do índice de emulsificação do *Penicillium* sp (A) IE% O.Pf (B) IE% O.M.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

**Figura 9-** Superfícies de resposta para índice de emulsificação 24h do *Penicillium* sp (A) IE% O.Pf óleo pós-fritura versus casca de abacaxi (B) IE% O.M óleo pós-fritura versus casca de abacaxi



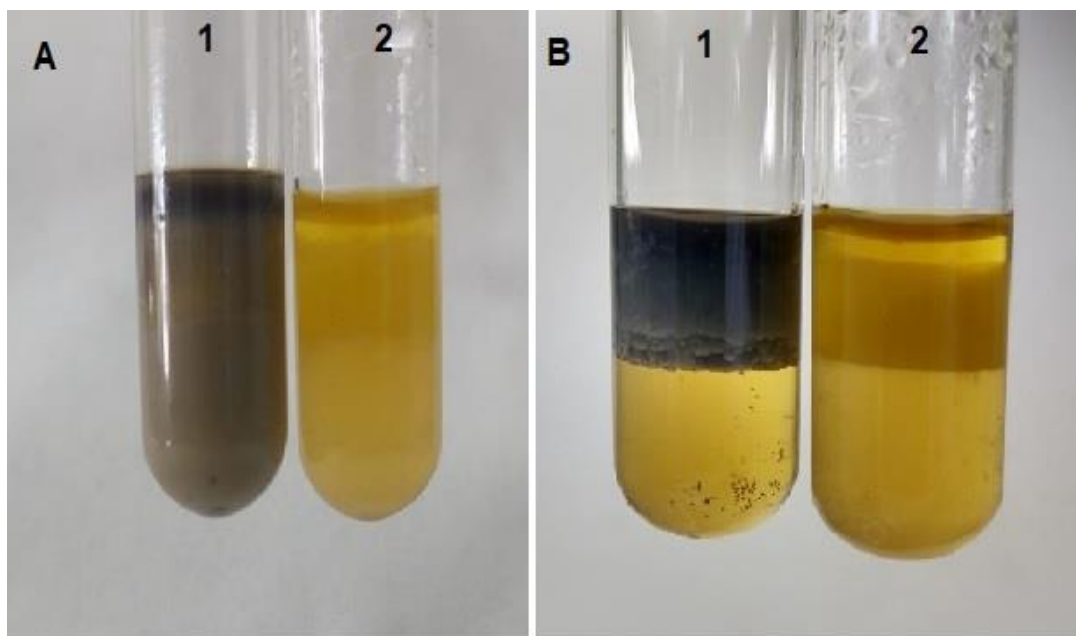
Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

### 5.2.1 Caracterização macroscópica e microscópica da emulsão do *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*

A emulsão proveniente dos líquidos metabólitos é perceptível de maneira macroscópica devido a formação de uma terceira fase. Na Figura 10 (A1), a emulsão do bioemulsificante do *Penicillium sp* foi quase completa no óleo de motor queimado, apresentando uma alteração de coloração mais clara em relação ao mesmo e textura uniforme sem formação de gotas isoladas. Entretanto, na Figura 10 (B1) o *Chrysosporium sp* em contato com óleo do motor forma emulsão com aspecto globular entre os líquidos, assim como gotas de tamanhos distintos ao fundo do tubo e dispersas.

Os bioemulsificantes produzidos por ambos os fungos filamentosos, utilizando substrato hidrofóbico o óleo pós-fritura, apresentam características similares observadas na Figura 10 (A2) e Figura 10 (B2), sendo perceptível uma camada homogênea bem mais compacta com o *Chrysosporium sp*.

**Figura 10**-Emulsões formadas após 24h (A) *Penicillium sp* (B) *Chrysosporium sp*: (1) óleo de motor queimado; (2) óleo pós-fritura



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023

De acordo com Luna et al. (2013), a formação de emulsão depende da afinidade do bioemulsificante com os hidrocarbonetos presentes nos substratos, na qual vai definir se é água em óleo ou óleo em água. As emulsões analisadas no

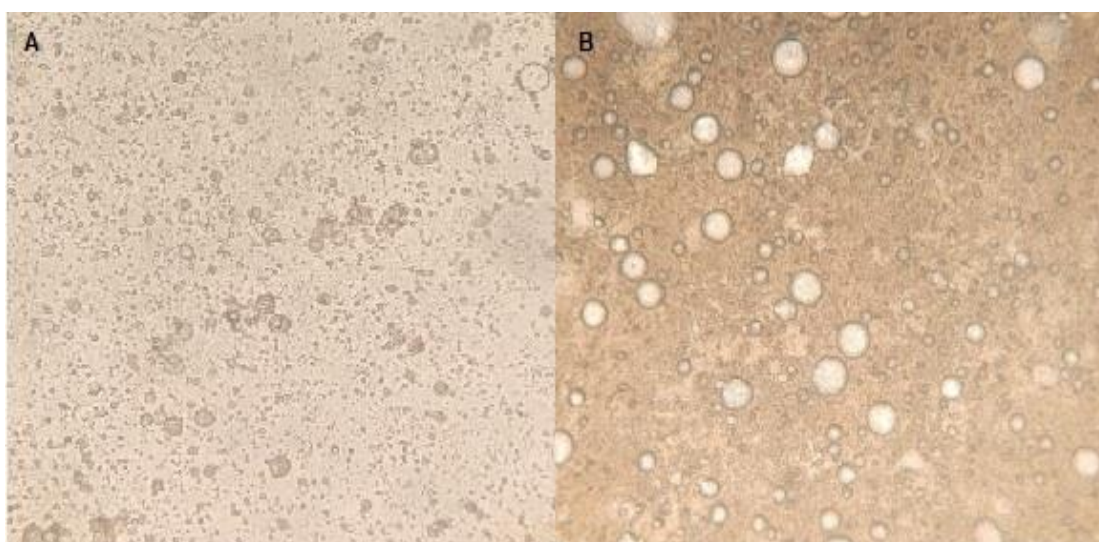


microscópio com aumento de 40x foram de melhor resposta do *Penicillium sp* sendo para o óleo de motor o ensaio 9 do planejamento experimental Box Behnken (2% óleo pós-fritura, 2,5% de casca de abacaxi e 1% de glicose) para o óleo de motor queimado o ensaio 2 ( 3% de óleo pós-fritura, 2,5% de casca de abacaxi e 2% de glicose) para o óleo pós-fritura.

Emulsões produzidas com o *Chrysosporium sp* também foram analisadas nas mesmas condições do planejamento Box Behnken Desing já citado anteriormente, visto que resultou no maior percentual. A Figura 11A mostra as emulsões formadas pelo líquido metabólito do *Penicillium sp* livres de células com 24h, as gotículas diformes e heterogêneas de água-em-óleo e óleo-em-água com espaços livres corroborando para instabilidade e IE% baixo.

Cândido et al (2022) relata aspectos similares para *Rhizopus arrizus* UCP 1609 e o *Mucor circinelloides* UCP 0005 e *Mucor circinelloides* UCP 0006 emulsões apenas água-em-óleo, sendo equivalentes a Figura 11B do *Penicillium sp*. Mesmo com tamanhos diferentes, as gotículas formadas apresentam uniformidade, no qual as menores têm predominância e camada envoltória da fase oleosa, propiciando estabilidade e aumentando o IE%.

**Figura 11-** Formação das emulsões formadas pelo *Penicillium sp* 24h vizualizadas microscopicamente(40x), (A) Óleo pós-fritura; (B) Óleo de motor queimado.

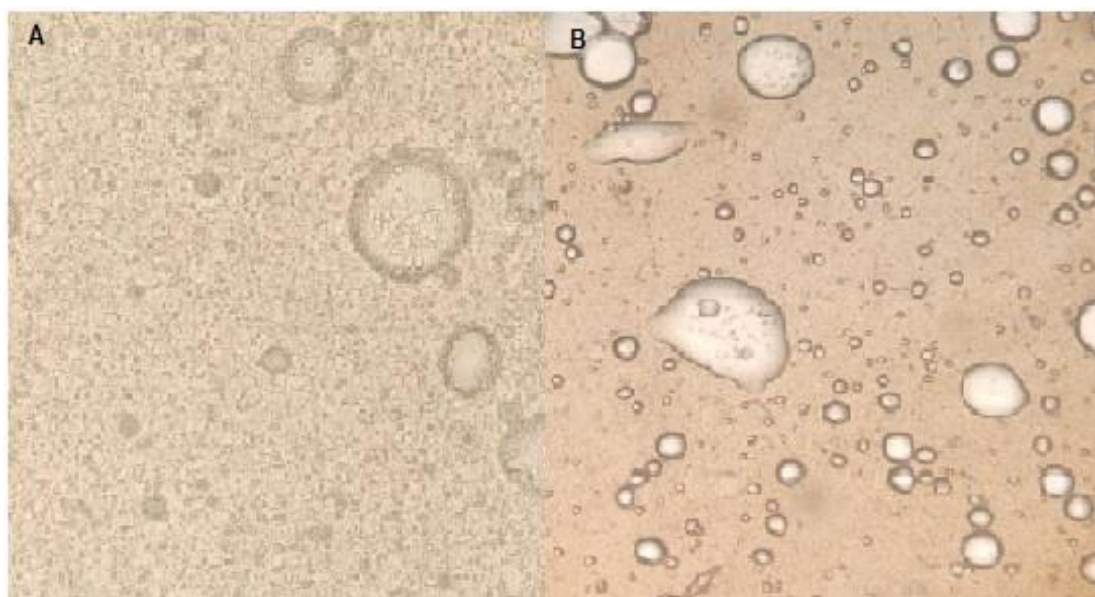


Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

A Figura 12B e Figura 11B mostram emulsões do tipo água-em-óleo para ambos os substratos hidrofóbicos testados. Na Figura 12A, o *Chrysosporium sp* tem

formação de gotículas pequenas com predominância levando a estabilidade, porém não apresenta camada de filme oleosa como na Figura 11B. Na Figura 12B, as gotas exibem características de formato heterogêneo, sendo de tamanho consideráveis grandes e termodinamicamente instáveis e predominância de espaços vazios, possibilitando a coalescência, que resultada em IE% abaixo de 50%.

**Figura 12-** Formação das emulsões formadas pelo *Chrysosporium* sp após 24h visualizadas microscopicamente(40x), (A) Óleo pós-fritura; (B) Óleo de motor queimado



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

Maia et al., (2016) relataram resultados similares com *Bacillus subtilis* UCP 0146 e Souza et al., (2016) com *Candida lipolytica* UCP0988. De acordo com Langervin et al., (2004), uma emulsão é considerada estável quando suas gotículas permanecem dispersas na fase contínua por um período significativo, sem ocorrer a separação de fases. É importante observar que concentrações mais elevadas de bioemulsificante contribuem para o aumento da estabilidade, diminuindo a coalescência das gotículas. Deste modo, as emulsões analisadas apontam a produção de biossurfactante com propriedade de bioemulsificante pelas culturas, ainda que o *Penicillium* sp tenha se destacado em relação ao *Chrysosporium* sp, ressaltando que as concentrações reajustadas de resíduos como substratos podem levar ao aumento da produção da biomolécula.

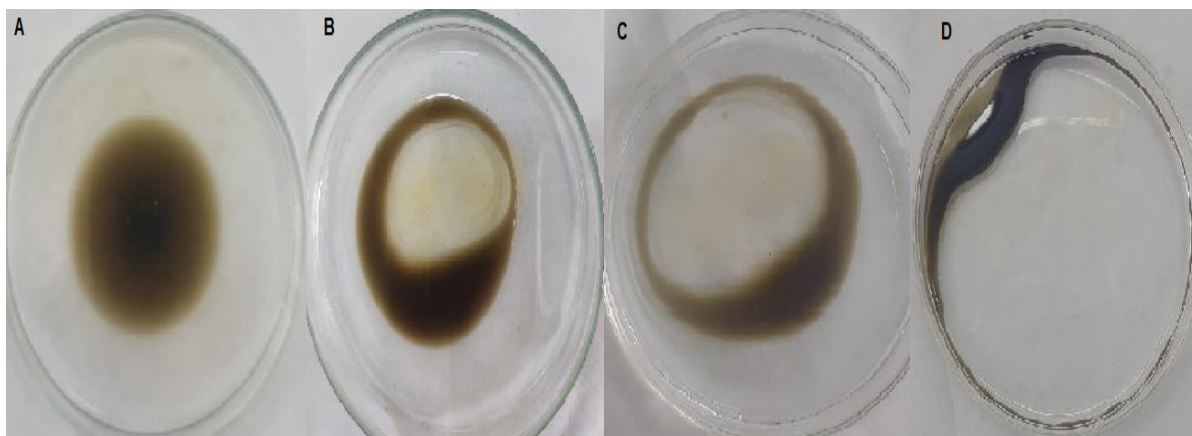
### 5.3 Potencial do biossurfactante/bioemulsificantes na dispersão de petroderivados em água

A capacidade de dispersão entre os fungos analisados apresenta área de valores próximos, sendo de 5cm ou 19,62 cm<sup>2</sup> para o *Chrysosporium sp* conforme mostra a figura 13B e o *Penicillium sp* 6cm ou 28,26 cm<sup>2</sup> exibido na Figura 13C. As Figuras 13A e 13D respectivamente ilustram a prova em branco com apenas óleo de motor e placa com o óleo disperso por um surfactante comercial. A ação do surfactante sintético é extremamente rápida em comparação com os produzidos pelos fungos investigados, porém o deslocamento acontece significativamente, visto que o halo formado pelo deslocamento se torna perceptível visualmente em conformidade com a Figura 13.

Gautam et al., ( 2014) relataram experimentos com *Penicillium chrysogenum* SNP5 utilizando gordura, farelo de trigo, óleo residual como substrato, apresentando área máxima de deslocamento de 5cm, corroborando para o potencial do biosurfactante produzido por ambos os fungos.

Segundo Hamed et al., (2021), o óleo residual de fritura e de girassol cooperou para estimular o *Aspergillus wentii* Wehmer NRCB10, pois obteve deslocamento com área de 8,5 cm. Além de Oliveira et al., ( 2020), o *Penicillium sclerotiorum* (33,15 cm<sup>2</sup>), *Mucor circinelloides* UCP0001 ( 37,36 cm<sup>2</sup>) (Marques et al. 2019) utilizando em meio contendo óleo de soja e licor de maceração de milho. A literatura demonstra que substratos com fontes de carbono monossaturado, polisaturado apresentado na Tabela 4 do item 3.7.2 reinteram a relevância do reaproveitamento dos resíduos agroindustriais.

**Figura 13-** Dispersão do óleo de motor em água (A) prova em branco (B) *Chrysosporium sp* ( C) *Penicillium sp* (D) Surfactante comercial



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2023.

#### 5.4 Caracterização do biossurfactante/ bioemulsificante

Para o processo de extração do bioemulsificante fez-se necessário realização de vários testes com solventes e sais, visto que os microrganismos, sejam bactérias ou fungos, podem produzir diversos tipos de biossurfactante e bioemulsificante.

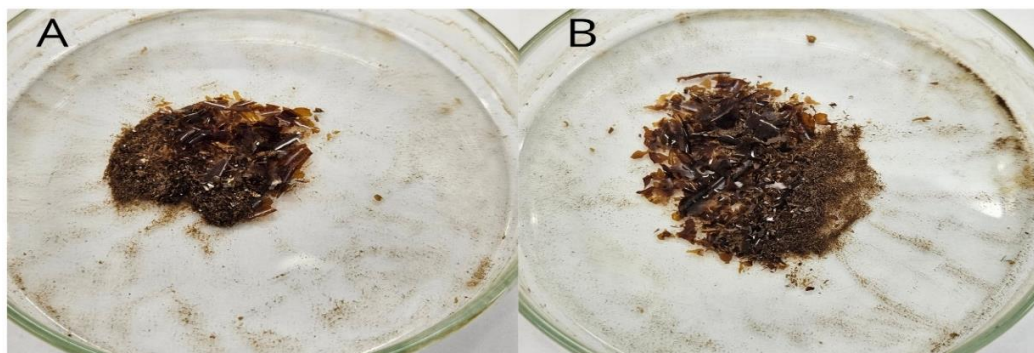
A mistura de clorofórmio: metanol foi usada para extração dos bioemulsificante produzidos pelas cepas fúngicas *F. solani* (MUT 4426) e *F. solani* (MUT 6181) por Pitocchi et al., (2024). O método com acetona, aplicado no biossurfactante e bioemulsificante é proveniente do *Mucor hemialis* utilizado por Ferreira et al., (2020).

Devido ao custo dos reagentes, acessibilidade e rendimento, o etanol é comumente utilizado em várias proporções e para diversas culturas microbianas. Elsaygh et al., (2023) faz uso de etanol 50% para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa MYN04. Já estudos desenvolvidos por Monteiro et al., (2010) com leveduras *Trichosporon loubieri* CLV20, *Geotrichum* sp. CLOA40 e *T. montevidense* CLOA70, o etanol foi o agente para precipitação.

Os líquidos metabólitos de ambas as cepas, *Penicillium* sp e *Chrysosporium* sp em contato com o etanol, formaram uma turvação e precipitado coloidal, após liofilização o BS/ BE parcialmente purificado apresentou aspecto bem cristalino quase vítreo e coloração marrom intensa conforme Figura 14. O rendimento final foi de 0,76g/L (*Penicillium* sp) e 0,60g/L (*Chrysosporium* sp).

Na literatura é possível observar valores diversos, segundo Kulkarni et al., (2020), o *P.Islandicum* apresentou rendimento de 1,075 mg/ml, em contrapartida o fungo patogênico *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 estudado por Xu et al., (2019) obteve 0,93 mg/L, Alimadadi et al.,(2018) alcançou de 32g/L com a *Sporisorium* sp. aff. *sorghi* SAM20.

**Figura 14-** Biossurfactante/bioemulsificantes liofilizados (A) *Penicillium* sp (B) *Chrysosporium* sp



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024.

Devido a diversidade de gênero e espécie de microrganismos, a resposta metabólica aos substratos disponíveis influencia diretamente na obtenção do biossurfactante ou bioemulsificante. Para o gênero *Chrysosporium* ainda não é possível encontrar valores para comparativos, visto que esse fungo não tem estudos para aplicação de produção de bioemulsificante. O gênero *Penicillium* já vem sendo usado para obtenção deste tipo de biomolécula, mas ainda são necessárias mais investigações sobre as espécies.

### 5.5 Análise química e carga iônica do biossurfactante/ bioemulsificante

Os BS/BE parcialmente purificados apresentam potencial Zeta respectivamente de -17,59mV com o *Penicillium sp* e -14,38mV para o *Chrysosporium sp* ambos com caráter aniônico. Deste modo, a parte hidrofílica, conhecida como cabeça na molécula, é carregada negativamente. Pele et al., (2019), em seu trabalho, obtem o valor de -31,28mV com o fungo filamentosso *R.arrhizus* UCP 1607 utilizando rejeitos agroindustrias de milho e glicerol bruto.

A composição química dos BS/BE, descrito na Tabela 10, destaca os valores significativos com presença de carboidratos e mínimos para lipídios.

**Tabela 10-** Composição química do biossurfactante/bioemulsificante

| Composição(%) | <i>Penicillium sp.</i> | <i>Chrysosporium sp.</i> |
|---------------|------------------------|--------------------------|
| Carboidratos  | 48,58                  | 41,63                    |
| Lipídios      | 2,99                   | 1,99                     |

Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024.

A caracterização inicial dos BS/BE revela que ambos os fungos foram capazes de produzir biomoléculas da mesma classe, dado que os valores apresentados são percentualmente semelhantes.

O glicolipídeo com 43% de carboidratos, produzido pelo *Penicillium citrinum* estudado por Carmago et al., (2003) se aproxima do BS/BE do *Penicillium sp* com 48,58%, assim como também para o *Chrysosporium sp* com 41,63%. Fungos analisados por Bhaumik et al. (2020) e Oje et al. (2016) apresentaram a presença de

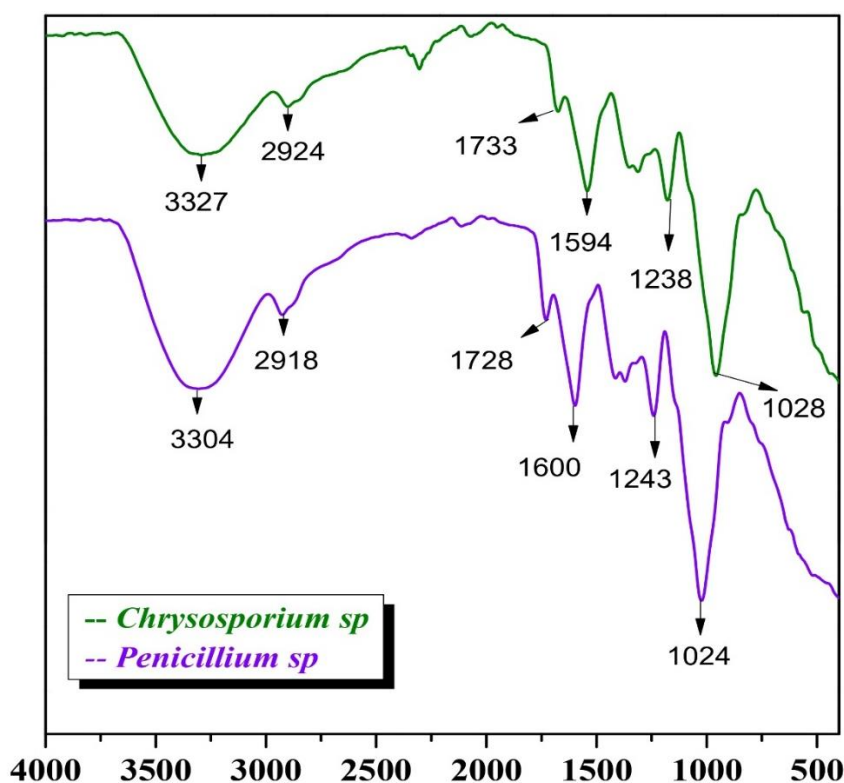


carboidratos que indicam duas possíveis classes de emulsificantes: glicolípídeos e proteoglicanos, as espécies fúngicas foram respectivamente *Meyerozyma caribbica* e *Mucor indicus*. Os autores destacam que a interação entre proteínas, carboidratos e complexos poliméricos desempenha um papel crucial na estabilização de emulsões.

## 5.6 Espectro de infravermelho (FTIR)

Com base nos dados bioquímicos, os BS/BE são complexos poliméricos para comprovação e identificação dos principais grupos funcionais. Foi realizado a espectroscopia de infravermelho (FTIR). Os espectros apresentaram bandas similares para os BS/BE do *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* 3304 cm<sup>-1</sup> 3327 cm<sup>-1</sup>, bandas associadas ao estriamento de hidroxilas (O-H) e grupo amina (-NH) presentes em compostos poliméricos e carboidratos e ocorre uma sobreposição, tem resultados semelhantes para o exopolímero (EPS) que afirma ser uma glicoproteína (Kharangate et al., 2022). A Figura 15 apresenta os espectros e as bandas correspondentes aos grupos funcionais presentes nos bioemulsificantes.

**Figura 15-** Espectros de FTIR *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp*



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024.

Os sinais em  $2918\text{ cm}^{-1}$ ,  $2924\text{ cm}^{-1}$ ,  $1369\text{ cm}^{-1}$ ,  $1376\text{ cm}^{-1}$ ,  $1243\text{ cm}^{-1}$ ,  $1238\text{ cm}^{-1}$  respectivamente representam a presença de cadeias alifáticas (-CH), (-CH<sub>2</sub>) e (-CH<sub>3</sub>), confirmados por Jain et al., (2013) com espectros de biossurfactante de natureza glicolipopeptídica. Além  $1728\text{ cm}^{-1}$  e  $1733\text{ cm}^{-1}$  bandas referentes a carbonila C=O associado aos esteres lipídicos,  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $1594\text{ cm}^{-1}$  as bandas representam partes protéicas pelas vibrações das ligações C=C e alongamento C=O e amidas. O sinal mais expressivo em  $1024\text{ cm}^{-1}$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$  é característico de ligação glicosídica presentem em glicolipídios, Barbosa et al., (2022) com *levedura Scheffersomyces shehatae* 16-BR6-2AI em meio de cultura com óleo de soja e bagaço de cana-de-açúcar, apresenta espectro similar que produziu um bioemulsificante polimérico com características dos Glicolipideos, mas não confirma de fato o tipo, mesmo com outras análises realizadas, visto que o tipo exopoliméro (EPS), possui banda bastantes similares.

Os bioemulsificantes apresentam características de glicolipideos, mas outros métodos analíticos fazem-se necessário para confirmação, considerando que Kathiravan et al., (2024) consegue produzir com *Penicillium* sp. biossurfactante glicolipidico que corrobora com os resultados obtido, as banda em  $3240\text{ cm}^{-1}$  indicando presença de hidroxilas (-OH) e  $1010\text{ cm}^{-1}$  (estriamento C-O) indica presença de açúcares, mas o tipo ramnolipídios apenas foi possível confirmar por cromatografia gasosa acoplado com o espectro de massas.

## 5.7 Teste da eficiência do biossurfactante/ bioemulsificante extraído

### 5.7.1 Índice de emulsificação em hidrofóbico poluente

O BS/BE extraído e parcialmente purificado exibiu resultados de acordo com a Tabela 11. O I.E% na presença do óleo de motor queimado no qual é um poluente, apresentou percentuais menores que o líquido metabólito inicial, apesar disso, são valores relevantes, visto que a concentração é pequena. Assim evidencia a eficiência do BS/BE. A estabilidade das emulsões é significativa em relação ao percentual reduzido ao longo do tempo, para ambos microrganismos na concentração 0,1mg/mL, o IE% ficou em 30%, mesmo abaixo de 50%, que é considerado significativo de acordo com Willumsen e Karlson (1996). Entretanto, na concentração 1mg/mL corresponderam valores consideráveis, em particular o *Chrysosporium* sp, visto que o índice de emulsão do líquido metabólito apresentou valor de 32%, evidenciando a extração

do BS/BE como bem sucedida, sendo possível obter uma melhor resposta perante petroderivados.

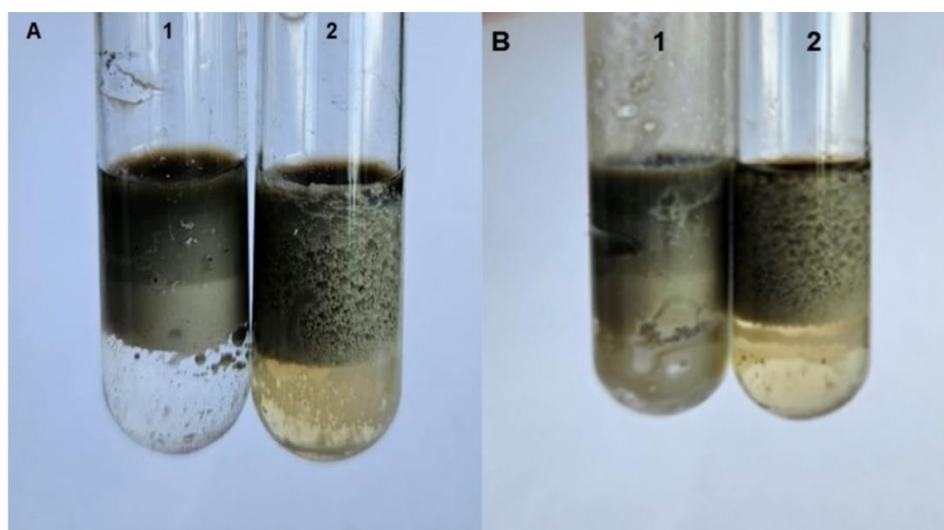
**Tabela 11-** Valores do I.E% do biossurfactante/ bioemulsificante extraído.

| Índice de Emulsificação                                   |                       |                      |                         |                      |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
| Concentração de biossurfactante/ bioemulsificante (mg/mL) | <i>Penicillium sp</i> |                      | <i>Chrysosporium sp</i> |                      |
|                                                           | Óleo de Motor (24h)   | Óleo de Motor (144h) | Óleo de Motor (24h)     | Óleo de Motor (144h) |
| 0,1                                                       | 38,10 %               | 33,33%               | 31,82%                  | 30,00%               |
| 1                                                         | 60,00%                | 52,38%               | 59,09%                  | 55,00%               |

Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024.

As emulsões ficam perceptíveis na Figura 16 por formar uma terceira fase entre a água e o componente hidrofóbico de tonalidade mais clara e mais denso. Na Figura 16 (A1) e (B2), referente a concentração de 0,1mg/mL, surgiu uma nova camada entre o óleo de motor queimado e a emulsão, correlacionada à emulsão instável e aos valores reduzidos do IE%. O que não acontece na Figura 16 (A2) e (B2), uma vez que a proporção do BS/ BE foi maximizado para concentração de 1mg/mL.

**Figura 16-** Emulsões formadas pelo biossurfactante/bioemulsificante com óleo de motor após 24h, (A) *Penicillium sp* (B) *Chrysosporium sp*: (1) 0,1mg/ mL; (2) 1mg/mL



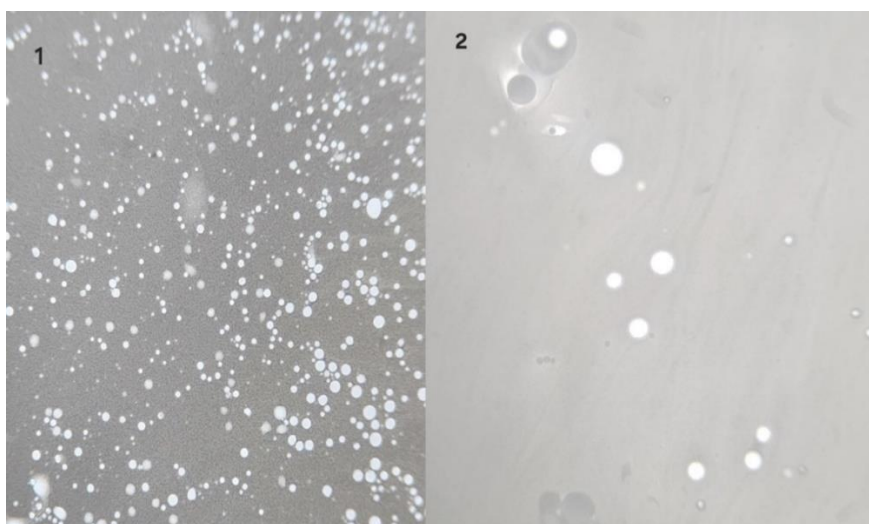
Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024

A observação microscópica nas Figuras 17 e 18 exibe perfis de emulsões água-em-óleo. A Figura 17 (1) apresenta muitas gotículas heterogêneas que



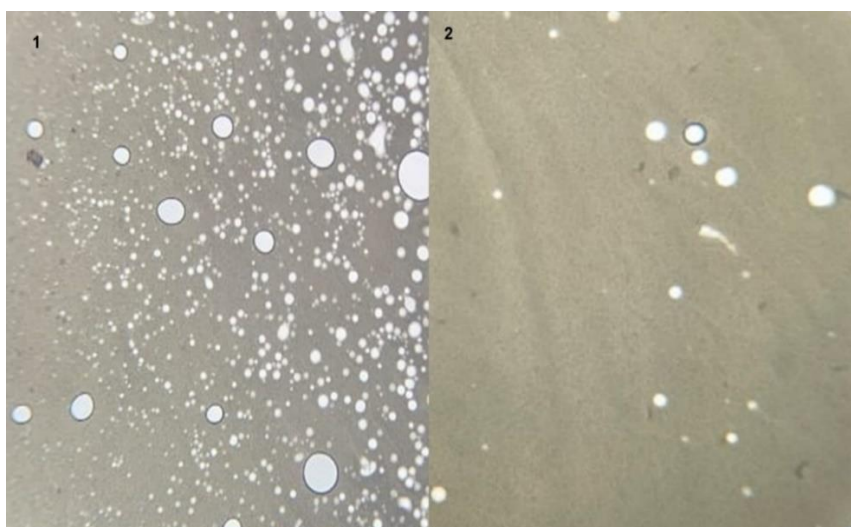
colaboram para a coalescência, em conformidade com Burgos-Díaz et al., (2024), que afirma que a baixa concentração de emulsificante não recobre a interface completa entre os líquidos, o mesmo acontece na Figura 18 (1). A uniformidade e redução de gotículas exposta nas Figuras 17 (2) e 18 (2) mostra as emulsões com concentração de 1mg/mL dos BS/BE, o comportamento aniônico em ambos implica na estabilidade das emulsões, devido a força de repulsão que evita a fundição das gotículas. Daltin, (2011) resalta a importância do potencial Zeta para compreensão da química de superfície.

**Figura 17-** Emulsões formadas pelo *Penicillium* sp com óleo de motor após 24h visualizadas microscopicamente(40x), (1) 0,1mg/mL; (2) 1mg/mL.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024

**Figura 18-** Emulsões formadas pelo *Chrysosporium* sp com óleo de motor após 24h visualizadas microscopicamente(40x), (1) 0,1mg/mL; (2) 1mg/mL.



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024

### 5.8 Teste de fitotoxicidade

Conforme Done et al, (2018) um índice de crescimento (IG) acima de 100% denota um efeito estimulante nas plantas, enquanto um (IG) na faixa de 50% a 80% indica uma fitotoxicidade moderada, porém superior a 80% sugere que o material em questão não é fitotóxico. No entanto, um IG inferior a 50% revela um efeito expressivo de fitotoxicidade.

Os resultados dos valores médios dos experimentos em duplicata, apresentados na Tabela 12, obtidos do índice de germinação após 7 dias de incubação das sementes de alface (*Lactuca sativa*) com o BS/ BE, mostrou que o *Penicillium sp* nas concentrações (0,1 e 1 mg/mL) e *Chrysosporium sp* (0,1mg/mL) indicam que não inibem o crescimento. Para os indicadores, os resultados foram iguais ou superiores a 90%, assim sendo atóxico. Em contra partida, o *Chrysosporium sp* (1mg/mL) para o percentual de crescimento das raízes (%CR) e índice de germinação (IG) apontam efeito tóxico intermediário nas sementes. De acordo com Tiquia et al., 1996, o %CR e IG são indicadores mais sensíveis, confirmando os dados obtidos.

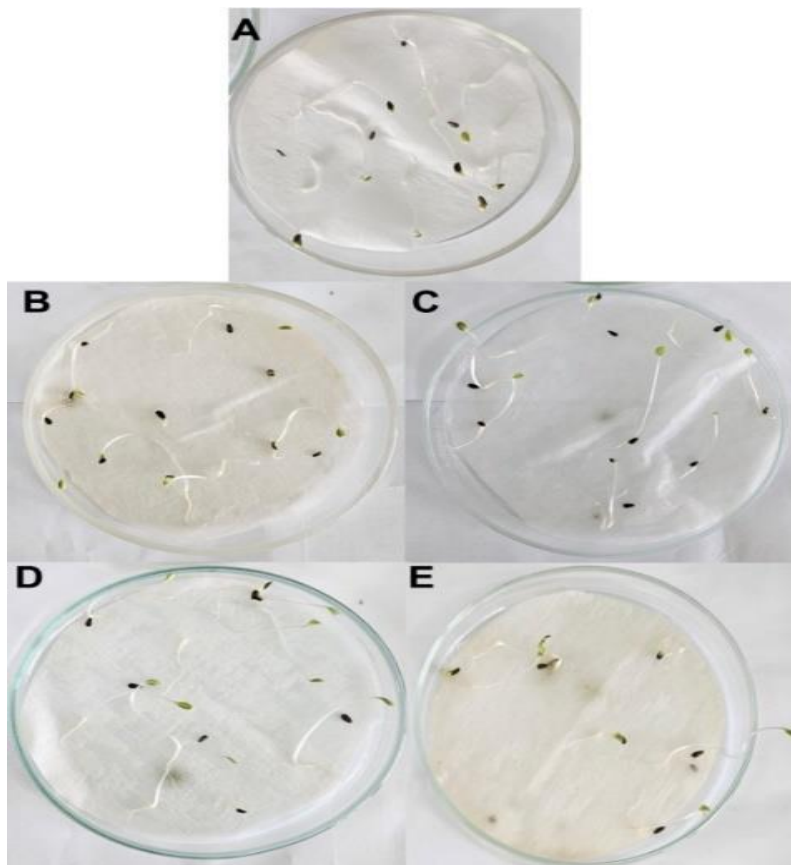
**Tabela 12-** Fitotoxicidade do biossurfactante/bioemulsificante isolado de *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* em sementes de *Lactuca sativa*.

| Percentual de crescimento das sementes |                       |          |                         |          |
|----------------------------------------|-----------------------|----------|-------------------------|----------|
| Índices                                | <i>Penicillium sp</i> |          | <i>Chrysosporium sp</i> |          |
|                                        | 0,1(mg/mL)            | 1(mg/mL) | 0,1(mg/mL)              | 1(mg/mL) |
| %G                                     | 90                    | 95       | 95                      | 95       |
| %CR                                    | 108,9                 | 138,4    | 113,7                   | 76       |
| IG                                     | 98                    | 131,4    | 108                     | 72,2     |

Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024

A Figura 20 mostra as sementes germinadas e as raízes com um bom crescimento, que validam a Tabela 12. Fatores bioquímicos são variáveis que influenciam diretamente no crescimento e germinação das sementes, assim o %CR e IC acima de 100% indicam que a própria composição dos BS/BE de carboidratos e lipídios pode estimular o desenvolvimento das sementes.

**Figura 19-** Placas com sementes de *Lactuca sativa* após 7 dias umedecidas: (A) água; (B) *Penicillium* sp 0,1mg/mL; (C) *Penicillium* sp 1mg/mL; (D) *Chrysosporium* sp 0,1mg/mL; (E) *Chrysosporium* sp 1mg/mL



Fonte: Elaboradora pelo autor, 2024

Estudos desenvolvidos por Patel et al., (2020) usando biossurfactantes produzindo *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 para tratamento de águas residuais contaminadas com petroderivados no uso das sementes de feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), apresentou (IG) de 80%. Pele et al., (2019) realizou teste com sementes de *Lactuca sativa* e *Brassica oleracea* (repolho) em concentrações de 1, 1,7, 2,5 g/L de biossurfactante, proveniente do *Rhizopus arrhizus* UCP 1607. Em ambas as sementes, todos os indicadores corresponderam acima de 95%, a composição química em termos de carboidratos (35,4%) e lipídios (5,5%) são semelhantes ao trabalho em questão.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos apresentados demonstraram que:

- O *Penicillium sp* e *Chrysosporium sp* foram capazes de realizar a biotransformação dos substratos óleo pós-fritura e casca de abacaxi para produção de biossurfactante/bioemulsificante, haja vista, que a tensão superficial foi abaixo da água, com propriedades de formação de emulsões assim como dispersão de petroderivados;
- O *Penicillium sp* demonstrou realizar produção de biossurfactante/bioemulsificante com potencial maior de emulsificação com IE% O.M de 81,82% onde o substrato casca de abacaxi contribuiu negativamente, sendo superior ao *Chrysosporium sp* que alcançou o IE% O.Pf de 45,16% em condições distintas do planejamento, em concentrações diferentes após extraído manteve a formação de emulsões no óleo de motor variando de 30 a 60%;
- A caracterização das emulsões segue o mesmo perfil de afinidade nos substratos hidrofóbicos, demonstrando que os fungos tem a produzir biossurfactante/bioemulsificante de mesma classe dentro da classificação geral, porém é necessário aprofundamento na pesquisa;
- O *Chrysosporium sp* apresentou um potencial biotecnológico assim como o *Penicillium sp*, ainda que necessário ajuste das concentrações dos substratos ou até mesmo substituição para maximizar a produção do biossurfactante/bioemulsificante, mas o rendimento (0,76g/L (*Penicillium sp*) e 0,60g/L (*Chrysosporium sp*)) de ambos foi similar demonstrando assim que podem produzir em condições similares;
- O teste preliminar de fitototoxicidade indicou que o biossurfactante/bioemulsificante produzido pelos fungos *Penicillium sp* não apresentou efeito inibitório sobre a germinação das sementes, entretanto o *Chrysosporim sp* em concentrações de 1mg/mL apresentou moderada toxicidade;
- As análises químicas indicaram que os biossurfactante/bioemulsificante são complexo poliméricos de caráter aniônico, provavelmente pertencentes ao grupo dos glicolípido, mas são necessário métodos avançados que comprovem a estrutura da biomolécula.

## REFERÊNCIAS

- ABUHASEL, Khaled et al. Oily wastewater treatment: Overview of conventional and modern methods, challenges, and future opportunities. **Water**, v. 13, n. 7, p. 980, 2021.
- AHMAD, Jamilah et al. Integrating phytoremediation and mycoremediation with biosurfactant-producing fungi for hydrocarbon removal and the potential production of secondary resources. **Chemosphere**, p. 140881, 2023.
- AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, BV26701360. Exploração de pigmentos industrialmente importantes de fungos do solo. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 100, n. 4, p. 1631-1643, 2016.
- ALWAKEEL, Suaad S. et al. Keratinases produced by *Aspergillus stelliformis*, *Aspergillus sydowii*, and *Fusarium brachygibbosum* isolated from human hair: yield and activity. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 6, p. 471, 2021.
- ALIMADADI, Nayyereh; SOUDI, M. R.; TALEBPOUR, Z. Efficient production of tri-acetylated mono-acylated mannosylerythritol lipids by *Sporisorium* sp. aff. *sorghii* SAM20. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 457-468, 2018.
- AMBAYE, Teklit Gebregiorgis et al. Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. **Environmental Technology & Innovation**, v. 24, p. 102090, 2021..
- AMBAYE, Teklit Gebregiorgis et al. Ex-situ bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil using mixed stimulants: Response and dynamics of bacterial community and phytotoxicity. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 6, p. 108814, 2022.
- ANDRADE, Rosileide FS et al. Promising biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 using renewable resources and its application in cotton fabric cleaning process. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2018, n. 1, p. 1624573, 2018.
- ARUN, K. B. et al. Filamentous fungi for pharmaceutical compounds degradation in the environment: A sustainable approach. **Environmental Technology & Innovation**, v. 31, p. 103182, 2023
- AZMAN, N. R. et al. Pineapple waste biosurfactant: sustainable soil clean up via optimization, characterization and sorption kinetics. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-18, 2024.
- BHAUMIK, Moumita et al. Production, partial purification and characterization of a proteoglycan bioemulsifier from an oleaginous yeast. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 43, p. 1747-1759, 2020.

BANANI, Houda et al. Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. **BMC genomics**, v. 17, p. 1-14, 2016.

BARBOSA, Fernanda Gonçalves et al. Production, physicochemical and structural characterization of a bioemulsifier produced in a culture medium composed of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate and soybean oil in the context of biorefineries. **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 618, 2022.

BARANGER, Claire et al. A compartmentalized microsystem helps understanding the uptake of benzo [a] pyrene by fungi during soil bioremediation processes. **Science of The Total Environment**, v. 784, p. 147151, 2021..

BEZERRA, Káren Gercyane O. et al. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 6, p. 1482-1493, 2018.

BŁYSKAL, Barbara. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 631-653, 2009.

BRAKHAGE, Axel A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BURGOS-DÍAZ, César et al. Enhancing the Retention and Oxidative Stability of Volatile Flavors: A Novel Approach Utilizing O/W Pickering Emulsions Based on Agri-Food Byproducts and Spray-Drying. **Foods**, v. 13, n. 9, p. 1326, 2024.

CAIRNS, Timothy C. et al. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 77, 2019.

CALVO, C. et al. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1493-1501, 2008.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M. et al. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 191-194, 2003.

CAMERINI, Felipe Vieira et al. Biosurfactant production by *Phialemonium* sp. using agroindustrial wastes: influence of culture conditions. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, p. 43484, 2019.

CARMEN, Feby; FRANCES, Christine; BARTHE, Laurie. Trends on valorization of pitaya fruit biomass through value-added and green extraction technology—A critical review of advancements and processes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 138, p. 339-354, 2023..

DE SOUZA MENDONÇA, Rafael et al. Bioemulsificante produzido por um fungo promissor *Absidia* sp. UCP 1144 isolado de solo da Caatinga no Nordeste do

Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 25402-25414, 2019..

DAMASCENO, F. R. C.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Assessing a mixture of biosurfactant and enzyme pools in the anaerobic biological treatment of wastewater with a high-fat content. **Environmental technology**, v. 35, n. 16, p. 2035-2045, 2014.

DALTIN, Decio. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. Editora Blucher, 2011.

DA SILVA CÂNDIDO, Thayná Rhomana et al. Production of biosurfactants by Mucoralean fungi isolated from Caatinga bioma soil using industrial waste as renewable substrates. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e13411225332-e13411225332, 2022..

DA SILVA MARINHO, Patrícia Suzanne; DA SILVA, Renata Raianny; DE LUNA, Juliana Moura. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e103111234123-e103111234123, 2022.

DONI, Serena et al. Combination of sediment washing and bioactivators as a potential strategy for dredged marine sediment recovery. **Ecological Engineering**, v. 125, p. 26-37, 2018.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DZUREDOVÁ, Simona et al. Assessment of biotechnologically important filamentous fungal biomass by Fourier transform Raman spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6710, 2021.

ESPARZA, Irene et al. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. **Journal of environmental management**, v. 265, p. 110510, 2020.

ELSAYGH, Yasmina A. et al. Production and structural characterization of eco-friendly bioemulsifier SC04 from *Saccharomyces cerevisiae* strain MYN04 with potential applications. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 176, 2023.

FERREIRA, Gislaine Ribeiro et al. Composição química e degradabilidade ruminal de coprodutos de frutas tropicais. 2018.

FERREIRA, Isabela Natália Silva et al. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 51-58, 2020.

FERREIRA, Irlon M. et al. Ene-reductases: Contribution from Brazilian fungi in organic synthesis. **Results in Chemistry**, v. 5, p. 100965, 2023.

FREITAS, Lucas Cantão et al. From waste to sustainable industry: How can agro-

industrial wastes help in the development of new products?. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 169, p. 105466, 2021.

FREITAS, Elizandro Lima. Biotransformação de resíduos agroindustriais por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na síntese de biossurfactante aplicados na biodeterioração de petroderivados. 2022..

GAUTAM, Gunjan et al. Uma estratégia econômica para produção de biossurfactante a partir de *Penicillium chrysogenum* SNP5 isolado localmente e suas aplicações. **Journal of Bioprocessing & Biotécnicas**, v. 4, n. 6, pág. 1º de janeiro de 2014.

GAUTAM, Krishna et al. Oily waste to biosurfactant: A path towards carbon neutrality and environmental sustainability. **Environmental Technology & Innovation**, v. 30, p. 103095, 2023.

GABRIEL, Raphael et al. Development of genetic tools for the thermophilic filamentous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, p. 1-15, 2020.

HAMED, Shimaa R.; AL-WASIFY, Raed S.; RAGAB, Samar. Production of biosurfactants using Egyptian soil fungi. 2021.

HASSAN, Auwalu et al. Enhanced bioremediation of heavy metal contaminated landfill soil using filamentous fungi consortia: a demonstration of bioaugmentation potential. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 230, p. 1-20, 2019.

HAYAKAWA, Yoichi et al. Adenopeptin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Chrysosporium* sp. **Tetrahedron**, v. 54, n. 52, p. 15871-15878, 1998.

HOFSTÄTTER, K. et al. Water quality, pesticides, and phytotoxicity in seeds of *Lactuca sativa*, *Solanum lycopersicum*, and *Eruca sativa*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 21, n. 7, p. 5971-5980, 2024.

JACQUELINE, P. Jennita; VELVIZHI, G. Co-fermentation exploiting glucose and xylose utilizing thermotolerant *S. cerevisiae* of highly lignified biomass for biofuel production: Statistical optimization and kinetic models. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103197, 2024.

JAIN, Rakeshkumar M. et al. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 199-204, 2013.

JAGTAP, Shweta et al. Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* species isolated from healthy human skin. 2010.

KÄPPELI, Othmar et al. Structure of the cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. **Archives of microbiology**, v. 138, p. 279-282, 1984.



KELLY, S. et al. Investigations of the morphogenesis of filamentous microorganisms. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, n. 5, p. 475-480, 2006.

KIM, Jong Shik; LEE, In Kyoung; YUN, Bong Sik. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122917, 2015.

KULKARNI, Shraddha S.; NENE, Sanjay N.; JOSHI, Kalpana S. Exploring malted barley waste for fungi producing surface active proteins like hydrophobins. **SN Applied Sciences**, v. 2, p. 1-14, 2020.

KHARANGATE-LAD, Amrita; BHOSLE, Saroj. Characterization of bioemulsifying EPS from *Halobacillus trueperi* MXM-16, a halophilic adhered bacterial isolate from the mangrove ecosystem. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 1446-1456, 2022.

FERNANDES, Keysson Vieira et al. Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. **Industrial crops and products**, v. 116, p. 90-96, 2018.

FERREIRA, Isabela Natália Silva et al. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 51-58, 2020.

LANGEVIN, D. et al. Crude oil emulsion properties and their application to heavy oil transportation. **Oil & gas science and technology**, v. 59, n. 5, p. 511-521, 2004.

LIMA, João Marcelo Silva. Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do Rio Negro contaminados por petróleo. 2016.

LUNA-VELASCO, M. Antonia et al. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 310-314, 2007.

MADDELA, Naga Raju et al. Efficiency of indigenous filamentous fungi for biodegradation of petroleum hydrocarbons in medium and soil: Laboratory study from Ecuador. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, p. 385-394, 2015.

MAIA, Patrícia CVS et al. An efficient bioemulsifier-producing *Bacillus subtilis* UCP 0146 isolated from mangrove sediments. **Colloids and Interfaces**, v. 2, n. 4, p. 58, 2018.

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, Sonia. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980.

MEDEIROS, Alexandre D.'Lamare Maia de et al. Oily wastewater treatment:

methods, challenges, and trends. **Processes**, v. 10, n. 4, p. 743, 2022.

MORIKAWA, Masaaki; HIRATA, Yoshihiko; IMANAKA, Tadayuki. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

NASERI, Ali et al. Use of Chrysosporium/carbon nanotubes for preconcentration of ultra-trace cadmium levels from various samples after extensive studies on its adsorption properties. **Chemosphere**, v. 335, p. 139168, 2023.

NAZIR, Muhammad Tahir et al. Production of filamentous fungal biomass with increased oil content using olive oil as a carbon source. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 2626-2635, 2022..

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

OJE, Obinna A. et al. Effect of acid and alkaline pretreatment on the production of biosurfactant from rice husk using *Mucor indicus*. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 60, 2016.

OLIVEIRA, Laura T. et al. Sustainable Biotransformation of Barley and Milk Whey for Biosurfactant Production by *Penicillium sclerotiorum* UCP1361. **CET Journal-Chemical Engineering Transactions**, v. 79, 2020.

PARASZKIEWICZ, Katarzyna; KANWAL, Anita; DŁUGOŃSKI, Jerzy. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 287-294, 2002.

PATHANIA, Shivali; KAUR, Narinder. Utilization of fruits and vegetable by-products for isolation of dietary fibres and its potential application as functional ingredients. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 27, p. 100295, 2022.

PATEL, Kartik; PATEL, Mitesh. Improving bioremediation process of petroleum wastewater using biosurfactants producing *Stenotrophomonas* sp. S1VKR-26 and assessment of phytotoxicity. **Bioresource technology**, v. 315, p. 123861, 2020.

PELE, Milagre A., et al. "Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil." **Electronic Journal of Biotechnology** 38 (2019): 40-48.

PERERA, Madhavi et al. Bioprocess development for biolubricant production using non-edible oils, agro-industrial byproducts and wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 357, p. 131956, 2022.

PITOCCHI, Rossana et al. The essential role of aggregation for the emulsifying ability of a fungal CYS-rich protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 358, 2024.

PUNT, Peter J. et al. Fungal protein production: design and production of chimeric

proteins. **Annual review of microbiology**, v. 65, n. 1, p. 57-69, 2011.

QAMAR, Sarmad Ahmad; PACIFICO, Severina. Cleaner production of biosurfactants via bio-waste valorization: a comprehensive review of characteristics, challenges, and opportunities in bio-sector applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 111555, 2023.

REN, Xianfeng et al. Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. **Toxins**, v. 12, n. 1, p. 24, 2020..

ROJAS, Luisa Fernanda; ZAPATA, Paola; RUIZ-TIRADO, Laura. Agro-industrial waste enzymes: Perspectives in circular economy. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 34, p. 100585, 2022.

RODRÍGUEZ, Alejandra et al. Agro-wastes and Inert Materials as Supports for the Production of Biosurfactants by Solid-state Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 1963-1976, 2021.

RODRIGUES, Beatriz Gomes et al. Isolamento de fungos filamentosos a partir de distintas amostras: análise das características macromorfológicas e potencial de produção de amilases. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 22, n. 12, p. e8066-e8066, 2024.

ROSLI, Nur Ayshah et al. Pineapple peel–derived carbon for adsorptive removal of dyes. **Materials Chemistry and Physics**, p. 128094, 2023.

SADEGHIAN, Nayereh; MOHAMMADI-SICHANI, Maryam. Mycoremediation of Iranian Crude Oil Contaminated Soil by Indigenous Fungi Isolates and the Evaluation of Their Bioremediation Ability. **Geomicrobiology Journal**, v. 40, n. 7, p. 699-705, 2023.

SALA, Arnau et al. Scanning agro-industrial wastes as substrates for fungal biopesticide production: Use of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 295, p. 113113, 2021.

SANTOS, Eloyza; ANDRADE, Raissa; GOUVEIA, Ester. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food bioscience**, v. 20, p. 56-61, 2017.

SARANGI, Prakash Kumar et al. Food and fruit waste valorisation for pectin recovery: Recent process technologies and future prospects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 235, p. 123929, 2023.

SARANGI, Prakash Kumar et al. Sustainable utilization of pineapple wastes for production of bioenergy, biochemicals and value-added products: A review. **Bioresource technology**, v. 351, p. 127085, 2022.

SARUBBO, Leonie A. et al. Biosurfactants: Production, properties, applications,

trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108377, 2022.

SOUZA, Adriana Ferreira et al. Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1608, 2016.

SHARMA, Satish Kumar et al. Utilization of food processing by-products as dietary, functional, and novel fiber: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1647-1661, 2016.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental pollution**, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996.

TIRADO-KULIEVA, Vicente Amirpasha et al. Research trends on mango by-products: a literature review with bibliometric analysis. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 4, p. 2760-2771, 2022.

TOGHUEO, Rufin Marie Kouipou; BOYOM, Fabrice Fekam. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, v. 10, n. 3, p. 107, 2020.

VASCO, María F. et al. Recovery of mitosporic fungi actively growing in soils after bacterial bioremediation of oily sludge and their potential for removing recalcitrant hydrocarbons. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 4, p. 649-655, 2011.

VIEIRA, Isabela Maria Monteiro et al. Potential of pineapple peel in the alternative composition of culture media for biosurfactant production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 68957-68971, 2021.

XU, Zhaolin et al. Dirhamnolipid produced by the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 and its herbicidal activity. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2969, 2019.

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

