



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



RÁDAMIS BARBOSA CASTOR

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS
POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE UM ATERRO DE RESÍDUOS DE
PETRÓLEO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
E MOLECULAR**

JOÃO PESSOA - PB

2022



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



RÁDAMIS BARBOSA CASTOR

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS
POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE UM ATERRO DE RESÍDUOS DE
PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

Orientadora: Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira

JOÃO PESSOA

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C354p Castor, Rádamis Barbosa.

Produção e caracterização de bioemulsificantes produzidos por fungos filamentosos isolados de um aterro de resíduos de petróleo / Rádamis Barbosa Castor. - João Pessoa, 2022.

88 f. : il.

Orientação: Krystyna Gorlach Lira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia celular e molecular. 2. Bioemulsificantes. 3. Fungos filamentosos. 4. Óleo de motor. I. Lira, Krystyna Gorlach. II. Título.

UFPB/BC

CDU 576+577.2(043)



Ata da Sessão Pública da Defesa de Dissertação de Mestrado
do discente **Rádamis Barbosa Castor**, candidato ao Título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular – Área de
Concentração em Biologia Celular e Molecular.

1 Aos cinco dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e dois, às nove horas,
2 reuniram-se, no Auditório do Departamento de Biologia Molecular, os membros da Banca
3 Examinadora, composta pelos Professores Doutores: Krystyna Gorlach Lira (Orientadora /
4 Presidente), Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador interno) e Gabriela Fehn Fiss
5 (Examinador externo) constituída para examinar o candidato **Rádamis Barbosa Castor** ao
6 grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e
7 Molecular. Iniciando a sessão, na qualidade de Presidente, a Professora Krystyna Gorlach
8 Lira comunicou aos presentes a finalidade da reunião. A seguir, concedeu a palavra para que o
9 candidato fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado "*Produção e Caracterização*
10 *de Bioemulsificantes Produzidos por Fungos Filamentosos Isolados de um Aterro de*
11 *Resíduos de Petróleo*". Concluída a exposição, o candidato foi arguido pela Banca
12 Examinadora, que avaliou, julgou e proferiu o seguinte parecer: "**aprovado**". Ao final da
13 sessão, o orientador preencheu a Ficha de Avaliação e emitiu o Relatório Final, para serem
14 encaminhados ao Colegiado deste Programa para homologação. E, para constar, eu, Maria do
15 Socorro de Oliveira Souza, Assistente em Administração, lavrei a presente ata, que assino
16 junto com os membros da Banca Examinadora.

Prof.^a Dra. Krystyna Gorlach Lira
Orientadora / Presidente

Coorientador

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Examinador Externo

Prof.^a Dra. Gabriela Fehn Fiss
Examinador Interno

Maria do Socorro de Oliveira Souza
Assistente em Administração

Rádamis Barbosa Castor
Discente

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o amor e dedicação.

“Cada livro, cada volume que vês, tem alma. A alma de quem o escreveu e a alma dos que o leram e viveram e sonharam com ele. Cada vez que um livro muda de mãos, cada vez que alguém desliza o olhar pelas suas páginas, o seu espírito cresce e torna-se forte.”

Carlos Ruiz Zafón.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, por estar vivo e poder desfrutar de todo o amor e beleza que me rodeiam. Agradeço também a mim mesmo, por ter me salvado, por ter escolhido viver, ainda que, por vezes, minha mente me fizesse acreditar no contrário.

Aos meus pais, Maria José e Odívio, por todo o amor e compreensão que tiveram todos esses anos, por todos os ensinamentos e renúncias. Vocês são os meus maiores motivos de orgulho e este trabalho também é de vocês.

Ao meu irmão Rafael, por todo o apoio ao longo da minha trajetória. Você é minha fonte de inspiração.

Ao meu companheiro, Mariano, o melhor presente que a vida me deu e com quem aprendi a ser eu mesmo, sem medos nem julgamentos. Sou muito grato por tê-lo ao meu lado.

À professora Krystyna, a melhor orientadora que eu poderia ter. A quem serei eternamente grato pelos ensinamentos, paciência e comprometimento durante todos esses anos e que mesmo durante a pandemia de COVID-19, não deixou de me orientar e fornecer as condições necessárias para realização deste trabalho. A senhora acolheu os meus erros e celebrou os acertos. Muito obrigado!

À Maria Helena, minha companheira de mestrado e uma das minhas fontes de inspiração por sua dedicação e perseverança.

À Camila e Matheus, meus melhores amigos e apoiadores.

Aos meus colegas de laboratório, Doug, Fernando, Davi e Bárbara, por toda a ajuda que recebi e por todos os momentos felizes e tristes que passamos juntos.

À Isabel, técnica do Laboratório de Química de Proteínas e Peptídeos (LQPP) por todas as (incontáveis) vezes que centrifugou e liofilizou minhas amostras.

Ao Helivaldo, pela realização das análises no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier.

E à professora Gabriela Fehn Fiss, com quem aprendi os fundamentos da cromatografia em camada delgada e por toda a dedicação e paciência que teve comigo em nossos encontros.

RESUMO

Emulsificantes estão presentes em uma grande variedade de produtos e processos industriais e são, em sua maioria, derivados do petróleo. Bioemulsificantes, por outro lado, são polímeros microbianos que oferecem desempenho superior e menor impacto ambiental, estando aptos a substituir seus homônimos sintéticos. Dentre os microrganismos produtores, bactérias e leveduras são os mais estudados, enquanto poucos bioemulsificantes produzidos por fungos filamentosos são conhecidos. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de bioemulsificantes por fungos filamentosos isolados de um aterro de resíduos da produção de petróleo. Foram estudados dezenove isolados de fungos, os quais foram cultivados em meio mineral contendo óleo de motor e foram testados quanto à presença de bioemulsificantes utilizando os testes de tensão superficial, dispersão do óleo diesel e emulsificação do óleo de motor. Em seguida, dois isolados promissores foram submetidos à extração de bioemulsificantes utilizando o método de precipitação etanólica. Os extratos de bioemulsificantes foram caracterizados com relação a sua atividade emulsificante em diferentes condições, e em relação a sua composição química pelas técnicas de difusão dupla em ágar, cromatografia em camada delgada e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Todos os isolados produziram bioemulsificantes utilizando óleo de motor como substrato e dezoito deles emulsionaram o óleo de motor com $E_{24} > 90\%$ e formaram emulsões estáveis por até 3 meses. Os extratos de bioemulsificantes dos isolados *Aspergillus flavus* A85b e *Trichoderma koningii* A96b mostraram eficiência no processo de emulsificação em condições de elevada salinidade (até 30% de NaCl) e temperatura (121 °C). O extrato do bioemulsificante de *A. flavus* A85b emulsionou eficientemente os óleos cru, de motor e diesel, enquanto o extrato do bioemulsificante de *T. koningii* A96b formou emulsões estáveis com os óleos cru e de motor. Determinou-se ainda que os bioemulsificantes testados formaram emulsões estáveis na concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ e apresentaram natureza aniônica, sendo constituídos por ácidos graxos, carboidratos e proteínas. Em virtude dos dados levantados, os bioemulsificantes produzidos por *A. flavus* A85b e *T. koningii* A96b possuem grande potencial de utilização nas indústrias de petróleo e em eventos de biorremediação.

Palavras-chave: Bioemulsificantes; fungos filamentosos; óleo de motor.

ABSTRACT

Emulsifiers are present in a wide variety of products and industrial processes and are mostly petroleum-based. Bioemulsifiers, on the other hand, are microbial polymers that offer superior performance and lower environmental impact, and are able to replace their synthetic counterparts. Among the producing microorganisms, bacteria and yeasts are the most studied, while few bioemulsifiers produced by filamentous fungi are known. In view of this, the objective of this work was to evaluate the production of bioemulsifiers by filamentous fungi isolated from an oil production waste landfill. Nineteen fungal isolates were studied, which were cultivated in mineral medium containing motor oil and were tested for the presence of bioemulsifiers using surface tension, diesel oil dispersion and motor oil emulsification tests. Then, two promising isolates were subjected to extraction of bioemulsifiers using the ethanolic precipitation method. The bioemulsifiers extracts were characterized with respect to their emulsifying activity under different conditions, and with respect to their chemical composition by the techniques of double diffusion on agar, thin layer chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy. All isolates produced bioemulsifiers using motor oil as substrate and eighteen of them emulsified motor oil with $E_{24} > 90\%$ and formed stable emulsions for up to 3 months. The bioemulsifier extracts from *Aspergillus flavus* A85b and *Trichoderma koningii* A96b isolates showed efficiency in the emulsification process under conditions of high salinity (up to 30% NaCl) and temperature (121 °C). The bioemulsifier extract from *A. flavus* A85b efficiently emulsified crude, engine and diesel oils, while the bioemulsifier extract from *T. koningii* A96b formed stable emulsions with crude and engine oils. It was also determined that the tested bioemulsifiers form stable emulsions at a concentration of $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ and present anionic nature and are constituted by fatty acids, carbohydrates and proteins in their composition. Due to the data collected, the bioemulsifiers produced by *Aspergillus flavus* A85b and *Trichoderma koningii* A96b have great potential for use in the oil industry and in bioremediation events.

Keywords: Bioemulsifiers; fungi; motor oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de uma molécula tensoativa	18
Figura 2 – Comportamento dos tensoativos em um sistema líquido-líquido	19
Figura 3 – Diferença de forças coesivas entre moléculas de água na superfície e no interior de uma gota de água	21
Figura 4 – A tensão superficial de um sistema pode ser afetada de 3 formas diferentes: presença de eletrólitos, compostos orgânicos e moléculas tensoativas	23
Figura 5 – As forças de atração entre as moléculas de água na superfície são reduzidas pela adição de surfactantes	23
Figura 6 – Ilustração de uma micela de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água	24
Figura 7 – Características gerais e vantagens dos surfactantes microbianos frente aos surfactantes de origem petroquímica	28
Figura 8 – Estrutura esquemática das manoproteínas estruturais e enzimáticas presentes na parede celular de <i>Saccharomyces</i> spp.	36
Figura 9 – Esquematização do método de difusão dupla em ágar para determinação da carga dos bioemulsificantes, tendo como exemplo surfactante catiônico CTAB	47
Figura 10 - Culturas dos fungos pertencentes ao gênero <i>Aspergillus</i> em meio Ágar Batata Dextrose	50
Figura 11 - Culturas dos fungos pertencentes aos gêneros <i>Paecilomyces</i> e <i>Trichoderma</i> em meio Ágar Batata Dextrose	50
Figura 12 - Biomassa dos fungos em meio M2 acrescido de 0,5% de óleo de motor	51
Figura 13 – Emulsões de óleo de motor produzidas pelos isolados fúngicos observadas após 24 h (A) e 90 dias (B)	56
Figura 14 – Efeito de diferentes concentrações de óleo de motor na biomassa (g.L^{-1}) de <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b no meio M2	60
Figura 15 – Extratos de bioemulsificantes das culturas de <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b extraídos com precipitação etanólica, antes (A) e após liofilização (B)	61
Figura 16 – Emulsões de óleo de motor formadas pelos extratos de bioemulsificantes dos fungos <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b	64
Figura 17 – Emulsões de óleo de motor formadas pelos surfactantes SDS, CTAB e Tween 80	64
Figura 18 – Emulsificação do óleo de motor (E24) por diferentes concentrações dos extratos de BE produzidos por <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b	67

Figura 19 – Estabilidade das emulsões de óleo de motor formadas mediante diferentes concentrações dos extratos de BE de <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b	67
Figura 20 – Emulsificação do óleo de motor (E24) pelos extratos de BE produzidos por <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b em diferentes concentrações de NaCl	69
Figura 21 – Emulsificação do óleo de motor (E24) pelos extratos de BE produzidos por <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b, submetidos a um ciclo de autoclavação (121 °C) por 15 min ...	69
Figura 22 – Teste de difusão dupla em ágar para determinação da carga iônica dos bioemulsificantes produzidos por de <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b	71
Figura 23 – Compostos detectados no extrato do bioemulsificante produzido por <i>A. flavus</i> 85b pela cromatografia em camada delgada	73
Figura 24 – Compostos detectados no extrato do bioemulsificante produzido por <i>T. koningii</i> 96b pela cromatografia em camada delgada	73
Figura 25 – Espectro do extrato de bioemulsificante produzido por <i>Aspergillus flavus</i> 85b obtido através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	74
Figura 26 – Espectro do extrato de bioemulsificante produzido por <i>T. koningii</i> 96b obtido através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de tensão superficial para alguns líquidos a 25 °C	22
Tabela 2 – Principais biossurfactantes produzidos por leveduras e fungos filamentosos	32
Tabela 3 – Principais bioemulsificantes produzidos por leveduras e fungos filamentosos	33
Tabela 4 - Espécies de fungos isoladas do solo do aterro de resíduos contaminados por petróleo em Icapuí-CE	49
Tabela 5 - Resultados dos testes de tensão superficial, dispersão do óleo diesel e emulsificação do óleo de motor do filtrado das culturas de fungos em meio M2 acrescido de 0,5% de óleo de motor	53
Tabela 6 - Estabilidade das emulsões de óleo de motor produzidas pelas linhagens fúngicas após 24 h e 90 dias	55
Tabela 7 – Efeitos do pH e da concentração do óleo de motor na biomassa (g.L ⁻¹) de <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b no meio M2 com 1% e 2% de óleo de motor	59
Tabela 8 – Índices de emulsificação de diferentes substratos hidrofóbicos e estabilidade das emulsões formadas por extratos de bioemulsificantes produzidos por <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b	62
Tabela 9 – Índices de emulsificação do óleo de motor e estabilidade das emulsões formadas pelos extratos de bioemulsificantes dos fungos <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b e pelos surfactantes sintéticos SDS, CTAB e Tween 80	63

SUMÁRIO

1 SURFACTANTES	16
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	17
1.2 CLASSIFICAÇÃO	19
1.3 PROPRIEDADES INTERFACIAIS	20
1.3.1 Redução das Tensões Superficial e Interfacial	20
1.3.2 Micelização	24
1.3.2.1 Solubilização	25
1.3.2.2 Emulsificação	25
1.3.2.3 Detergência	25
1.4 ASPECTOS AMBIENTAIS DOS SURFACTANTES	26
2 SURFACTANTES MICROBIANOS	27
2.1 BIOSSURFACTANTES	29
2.2 BIOEMULSIFICANTES	29
3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES E BIOEMULSIFICANTES	30
4 BIOEMULSIFICANTES FÚNGICOS	34
4.1 LIPOSAN	34
4.2 YANSAN	35
4.3 MANOPROTEÍNAS	35
5 APLICAÇÕES DOS BIOEMULSIFICANTES	37
5.1 BIOEMULSIFICANTES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	37
5.2 BIOEMULSIFICANTES NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO	38
5.3 BIOEMULSIFICANTES NA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO	40
6 OBJETIVOS	41
6.1 OBJETIVO GERAL	41
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
7 MATERIAIS E MÉTODO	42
7.1 MICRORGANISMOS	42
7.2 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES PELOS FUNGOS	42
7.2.1 Condições de Cultivo	42
7.2.2 Detecção de Bioemulsificantes	43

7.2.2.1 Tensão superficial	43
7.2.2.2 Teste de dispersão do óleo diesel	44
7.2.2.3 Teste de emulsificação	44
7.3 EXTRAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS PELOS FUNGOS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE	44
7.3.1 Cultivo em Meios com Diferentes pHs e Concentrações de Óleo de Motor	45
7.3.2 Recuperação dos Bioemulsificantes	45
7.3.3 Emulsificação de Hidrocarbonetos e Óleos Vegetais	45
7.3.4 Efeito da Concentração na Atividade Emulsificante	46
7.3.5 Efeito da Salinidade e Temperatura na Atividade Emulsificante	46
7.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA IÔNICA DOS BIOEMULSIFICANTES	46
7.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR DOS BIOEMULSIFICANTES	47
7.5.1 Cromatografia em Camada Delgada	47
7.5.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	48
7.6 Análise de Dados	48
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
8.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS.....	49
8.2. BIOMASSA DAS LINHAGENS NO MEIO M2 COM ÓLEO DE MOTOR	51
8.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES PELOS FUNGOS	52
8.3.1 Tensão Superficial e Dispersão do Óleo Diesel a Partir do Filtrado das Culturas de Fungos	52
8.3.2 Emulsificação do Óleo de Motor pelo Filtrado das Culturas de Fungos	54
8.4 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES POR <i>Aspergillus flavus</i> 85 b E <i>Trichoderma koningii</i> 96b	58
8.4.1 Crescimento dos Isolados em Diferentes Condições de Cultivo	58
8.4.2 Rendimento dos Extratos de Bioemulsificantes	60
8.4.3 Emulsificação de Diferentes Substratos pelos Extratos de Bioemulsificantes	61
8.4.4 Emulsificação do Óleo de Motor pelos Extratos de Bioemulsificantes	66
8.4.4.1 Efeito da concentração dos extratos de bioemulsificantes	66
8.4.4.2 Efeitos da salinidade e temperatura na atividade dos bioemulsificantes	68
8.5 DETERMINAÇÃO DA CARGA IÔNICA DOS BIOEMULSIFICANTES DE <i>A. FLAVUS</i> 85B E <i>T. KONINGII</i> 96B	70

8.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BIOEMULSIFICANTES DE <i>A. flavus</i> 85b e <i>T. koningii</i> 96b	72
8.6.1 Compostos Detectados pela Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	72
8.6.2 Funções orgânicas detectadas pela espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	74
9 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78

1 SURFACTANTES

Surfactantes, também chamados de tensoativos, são compostos ativos de superfície extensivamente usados na indústria por conta de sua natureza anfifílica, apresentando uma parte polar ligada a outra com característica apolar. Desta forma, tais moléculas possuem afinidade pela água, por óleos e pelas superfícies das soluções com sólidos, líquidos ou gases, atuando como agentes conciliadores dessas fases imiscíveis, o que lhes confere múltiplas propriedades, como redução da tensão superficial e formação de emulsões (DALTIM, 2011).

Por esse motivo, existe uma alta demanda por surfactantes em quase todos os setores da indústria moderna, estando presentes em diversos produtos e sendo particularmente importantes para as indústrias de sabões e detergentes, farmacêuticas e de cosméticos, alimentos e bebidas, químicas e agroquímicas, têxteis e petroquímicas. Em vista disso, o mercado mundial de surfactantes movimentou mais de 39 bilhões de dólares e se espera que ultrapasse os 57 bilhões até 2028 (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021b; SALEK; EUSTON; JANEK, 2022).

No entanto, a maioria dos surfactantes utilizados na indústria é de origem petroquímica, gerando processos pouco sustentáveis e ambientalmente incorretos, além de que, muitos deles são recalcitrantes na natureza e citotóxicos a muitas formas de vida (BEYER *et al.*, 2016; FARIAS *et al.*, 2021; JACKSON *et al.*, 2015). Associado a isso, uma demanda crescente da sociedade por produtos naturais que apresentem baixo impacto ambiental tem estimulado a busca por alternativas mais sustentáveis, como a substituição dos surfactantes por biopolímeros (LUFT *et al.*, 2020; SALEK; EUSTON; JANEK, 2022).

Nesse ínterim, os surfactantes microbianos vêm se destacando por uma série de benefícios, entre os quais, biocompatibilidade, menor toxicidade, melhor biodegradabilidade, desempenho superior e maior estabilidade em condições extremas de temperatura, salinidade e pH que os tensoativos sintéticos. Além disso, apresentam-se em uma grande variedade de estruturas, garantindo-lhes seletividade e especificidade químicas que possibilitam seu uso em diferentes aplicações (VARJANI, UPASANI, 2017; VIEIRA *et al.*, 2021).

Surfactantes microbianos podem ser classificados quanto a sua estrutura, mecanismos de ação e propriedades em biossurfactantes e bioemulsificantes, em que os primeiros atuam reduzindo as tensões superficial e interfacial e os segundos estão mais aptos a formar e estabilizar emulsões (UZOIGWE *et al.*, 2015). A grande maioria dos biossurfactantes e bioemulsificantes conhecidos é produzida por bactérias, enquanto aqueles produzidos por leveduras são encontrados em menor proporção (DA SILVA *et al.*, 2021).

Registros de biossurfactantes e, em especial, bioemulsificantes sintetizados por fungos filamentosos são raros, de modo que pouco se conhece sobre eles enquanto seus homólogos bacterianos e leveduriformes já são produzidos e utilizados. Em decorrência da alta demanda desses polímeros, que já ultrapassam 4 bilhões de dólares em valor de mercado mundial, a bioprospecção de biossurfactantes e bioemulsificantes por fungos filamentosos apresenta elevado apelo acadêmico e industrial (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021a).

Nesse contexto, o presente trabalho teve o intuito de investigar a produção de bioemulsificantes por linhagens de fungos filamentosos isoladas de um aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo, buscando dessa forma, contribuir para a pesquisa de bioprodutos que possam ser utilizados na indústria petroquímica e na biorremediação de ambientes contaminados por petróleo.

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Surfactantes são produtos da indústria química especialmente versáteis devido à variedade de aplicações diferentes que podem apresentar. O registro mais antigo do uso de surfactantes remonta à produção de sabão pelos sumérios, há 2.700 anos a.C. Egípcios, babilônios, judeus e outros povos também fabricavam seu próprio sabão a partir de gordura animal, óleos vegetais, água e álcalis e o usavam sobretudo para higiene pessoal e fins medicinais (BAJPAI; TYAGI, 2007; FARIAS *et al.*, 2021; SCHEIBEL, 2004).

A reação de saponificação, processo no qual triglicerídeos reagem com uma base sob aquecimento, gerando sais de ácidos graxos (sabão) e glicerina permaneceu inalterada até o século XX, quando a escassez de óleos e gorduras, atrelada ao acúmulo de olefinas, subprodutos de baixo custo oriundos do craqueamento do petróleo para produção de combustíveis durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), impulsionou a produção em larga escala dos surfactantes de origem petroquímica (BAJPAI; TYAGI, 2007; FARIAS *et al.*, 2021; SCHEIBEL, 2004).

A palavra surfactante advém da expressão *surface-active agent* e denota qualquer molécula, sintética ou biológica, que possua a propriedade de se adsorver na superfície de um sistema e alterar sua energia livre (FARIAS *et al.*, 2021; ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 1). Superfície ou interface, segundo Daltin (2011, p. 101), é a região de transição entre duas fases imiscíveis. No entanto, convencionou-se a usar o termo superfície para indicar a transição de uma fase condensada, líquida ou sólida, para uma fase gasosa ou vácuo. Interface, por outro

lado, evoca a transição entre duas fases condensadas (líquido-líquido ou sólido-líquido), em que uma interfere na organização das moléculas da fase vizinha e vice-versa.

Tal particularidade se deve à estrutura dos surfactantes, que apresentam uma parte apolar, originada de uma cadeia hidrocarbônica, ligada a um grupo polar, característica que os torna anfifílicos (anfipáticos). Desse modo, a parte apolar (lipofílica ou oleofílica) é responsável pela solubilidade do tensoativo em óleo, enquanto a porção polar (hidrofílica), garante sua solubilidade em água (DALTIM, 2011, p. 12; FENIBO *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2021). Costuma-se representar uma molécula de surfactante através da figura de uma barra (parte apolar) e um círculo (parte polar), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática de uma molécula tensoativa.



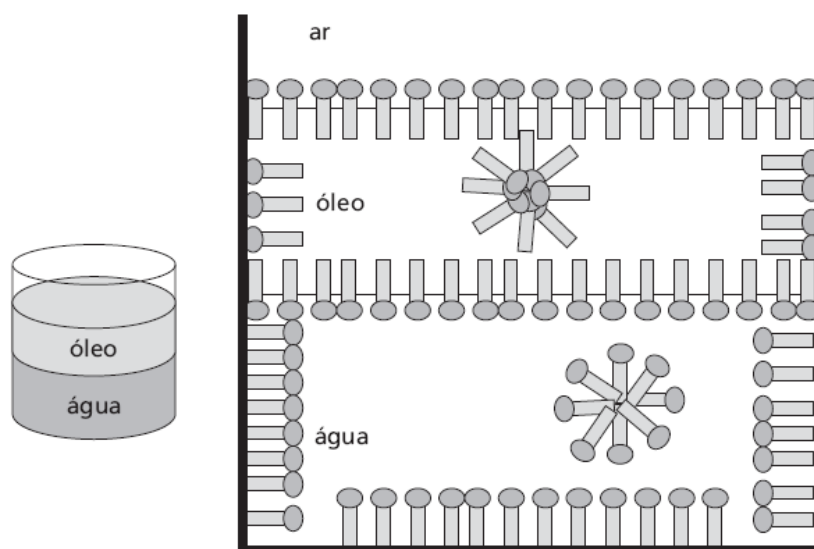
Fonte: Autoria própria (2022).

Quando moléculas de surfactante são dissolvidas em meio aquoso, seus grupos hidrofóbicos interferem na estrutura das moléculas de água ao quebrar as ligações de hidrogênio entre elas. Em resposta, os tensoativos são forçados pelo solvente a ocupar a superfície do sistema, de modo a minimizar o contato de suas partes apolares com a água. Assim, a superfície do líquido é recoberta por uma camada de surfactantes, com seus grupos hidrofóbicos orientados para o ar (acima da superfície), uma vez que as moléculas que compõem o ar são essencialmente apolares. Desse modo, a estrutura anfipática dos tensoativos promove sua adsorção e estabilização nessas zonas de transição, reduzindo a tensão superficial e interfacial, como explicado posteriormente. É por esse motivo que tais compostos são denominados moléculas ativas de superfície (ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 2-3).

No caso de um sistema com líquidos de polaridades diferentes (Figura 2), as moléculas de tensoativo são expulsas para interface água-óleo (zona mais estável) e posteriormente para a superfície óleo-ar. Na sequência, os surfactantes tendem a ocupar as interfaces líquido-sólido, como forma de minimizar o contato de suas contrapartes insolúveis na fase óleo (porção polar) e na fase água (porção apolar). Quando todas essas regiões se encontram saturadas, os

tensoativos começam a se agregar, formando micelas, responsáveis por propriedades como emulsificação e detergência (DALTIM, 2011, p. 28).

Figura 2 – Comportamento dos tensoativos em um sistema líquido-líquido.



Fonte: Daltin (2011).

Legenda: Os surfactantes monoméricos ocupam, inicialmente, a superfície e interfaces do sistema e, após sua saturação, passam a se organizar na forma de micelas. No meio aquoso, os grupos hidrofílicos das micelas estão voltados para fora, em contato com as moléculas de água circundantes, enquanto no meio oleoso, são as cadeias hidrocarbônicas que se encontram em contato com o óleo.

1.2 CLASSIFICAÇÃO

Os surfactantes se apresentam sob múltiplas formas, visto que, as cadeias hidrocarbônicas de seus grupos hidrofóbicos podem ser saturadas ou insaturadas, lineares, ramificadas, cíclicas, aromáticas e variam entre 8 e 22 átomos de carbono. Entretanto, a classificação mais comum de surfactantes se baseia na carga de seu grupo polar, podendo ser aniônico, catiônico, não iônico, anfótero ou zwitteriônico (DALTIM, 2011; LINKE, 2009). Os surfactantes aniônicos e não iônicos são os mais utilizados, em virtude de suas propriedades, baixo custo, menor toxicidade e melhor biodegradabilidade quando comparados aos catiônicos e anfóteros (FARIAS *et al.*, 2021).

Surfactantes aniônicos representam o maior volume de mercado e abrangem os sabões, alquil benzeno sulfonatos lineares, álcoois sulfatados e álcoois etoxilados sulfatados como principais representantes. Devido às suas excelentes propriedades detergentes, emulsionantes e espumantes, são usados na maioria dos produtos de limpeza pessoal e do lar, como sabões líquidos e em pó, sabonetes, detergentes de louça e xampus. Os não iônicos, por sua vez, não apresentam cargas verdadeiras e são normalmente usados como adjuvantes em formulações cosméticas com surfactantes aniônicos ou catiônicos, em razão de sua baixa irritabilidade dérmica e ocular, além de boas atividades emulsionante e solubilizante. Os álcoois graxos etoxilados são o principal representante dessa classe (BAIN & COMPANY, 2014; BAJPAI; TYAGI, 2007; DALTIM, 2011, p. 47-67; NAKAMA *et al.*, 2017, p. 231; FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021b; JACKSON *et al.*, 2016).

Surfactantes catiônicos, por outro lado, não oferecem boas propriedades detergentes, mas apresentam elevada capacidade adsorptiva, em virtude de sua carga positiva e do fato de a maioria dos substratos naturais, como cabelo, fibras têxteis e membrana das células, ser negativamente carregada. Por esse motivo, são amplamente usados em condicionadores de cabelo, amaciantes de roupa, agentes lubrificantes, anticorrosivos e bactericidas. Já os anfóteros (zwitteriônicos) representam a classe menos utilizada de tensoativos por conta do alto custo de produção. Apresentam dois grupos polares, aniônico e catiônico, na mesma molécula, podendo se comportar como qualquer um dos dois, dependendo do pH do meio. Tal qual os não iônicos, atuam como adjuvantes, haja visto suas excelentes propriedades dérmicas (BAIN & COMPANY, 2014; BAJPAI; TYAGI, 2007; DALTIM, 2011, p. 67-81).

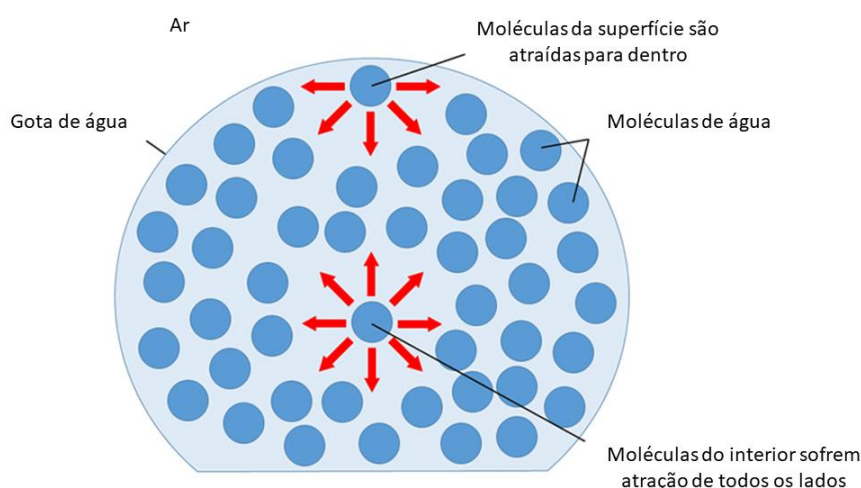
1.3 PROPRIEDADES INTERFACIAIS

1.3.1 Redução das Tensões Superficial e Interfacial

A tensão superficial de um líquido está relacionada com as forças atrativas entre suas moléculas. São elas que permitem a condensação do vapor em água líquida, por exemplo, e se originam das interações dipolo-dipolo, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Retomando o exemplo do sistema aquoso, moléculas do interior do líquido interagem com outras moléculas de água em todas as direções, enquanto aquelas localizadas na superfície sofrem atração apenas das moléculas ao lado e abaixo delas (Figura 3), gerando um desbalanço que é a origem da tensão superficial e se manifesta como uma força perpendicular à superfície que está constantemente puxando as moléculas desta para o interior do líquido. É por isso que

gotas de líquidos polares, como a água, não se espalham sobre uma superfície, assumindo um formato esférico (KRONBERG; HOLMBERG; LINDMAN, 2014, p. 231-232).

Figura 3 – Diferença de forças coesivas entre moléculas de água na superfície e no interior de uma gota de água.



Fonte: Adaptado de <<https://www.quora.com/What-is-surface-tension-What-experiments-related-to-it-can-be-performed>>. Acesso em: 01 mar. 2022.

Legenda: Em uma gota d'água, a tensão superficial, gerada pelo desbalanço no número de interações intermoleculares entre as moléculas de água do seio do líquido e as da superfície, impede o espalhamento da gota pela superfície, o que explica sua forma esférica.

Assim, a tensão superficial pode ser definida como o trabalho (energia mecânica) necessário para se aumentar a área de uma superfície líquida e resulta da assimetria de interações intermoleculares entre as moléculas da superfície e do interior do líquido, sendo expressa em milinewtons por metro (mN.m^{-1}) ou dinas por centímetro (dyn.cm^{-1}) (FARIAS *et al.*, 2021; KONTOGEORGIS; KIIL, 2016, p. 34). A Tabela 1 apresenta os valores de tensão superficial para alguns líquidos. A tensão interfacial, por sua vez, é a tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis e seu valor está, normalmente, entre os valores individuais desses líquidos. Dessa forma, para aumentar a área superficial de um líquido e, com isso, reduzir sua tensão superficial, deve-se aplicar uma força de maior magnitude, de modo que as moléculas do interior migrem para criar uma nova unidade de área na superfície (ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 235).

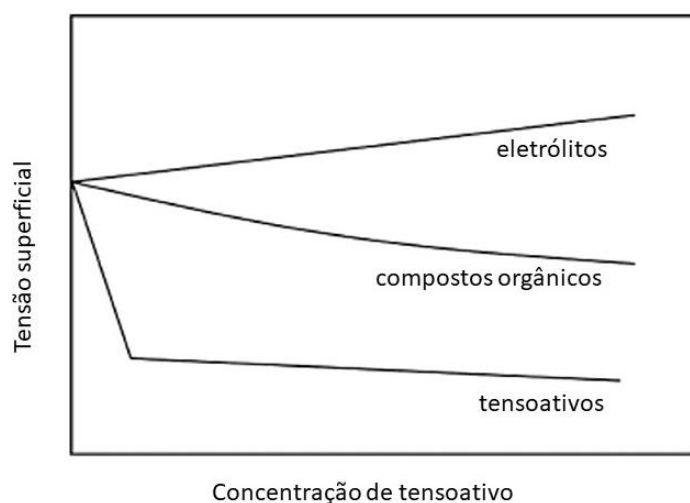
Tabela 1 – Valores de tensão superficial para alguns líquidos à 25 °C.

Líquidos	Tensão superficial (mN/m⁻¹)
Mercúrio	480
Água	72
Glicerol	63
Bromofórmio	45
Clorofórmio	27
<i>n</i> -Octanol	27
<i>n</i> -Hexadecano	27
<i>n</i> -Dodecano	25
<i>n</i> -Octano	22
<i>n</i> -Hexano	18
Éter	17

Fonte: Adaptado de Kontogeorgis; Kiil (2016); Kronberg; Holmberg; Lindman (2014).

Tensões superficiais elevadas, como a da água, no entanto, podem ser facilmente reduzidas pela adição de surfactantes ao meio, como mostra a Figura 4 (KONTOGEORGIS; KIIL, 2016, p. 36). Isso acontece porque quando um tensoativo é dissolvido em um meio aquoso, migra para as superfícies e separa as moléculas de água vizinhas, anulando as forças de atração nas diagonais e reduzindo a força de atração para o seio do líquido (Figura 5). Portanto, quanto maior a concentração de tensoativos na superfície/interface, maior será a redução da tensão superficial/interfacial. A dispersão de fases, molhabilidade e umectação são propriedades dos surfactantes que dependem da redução da tensão superficial (DALVIN, 2011, p. 25).

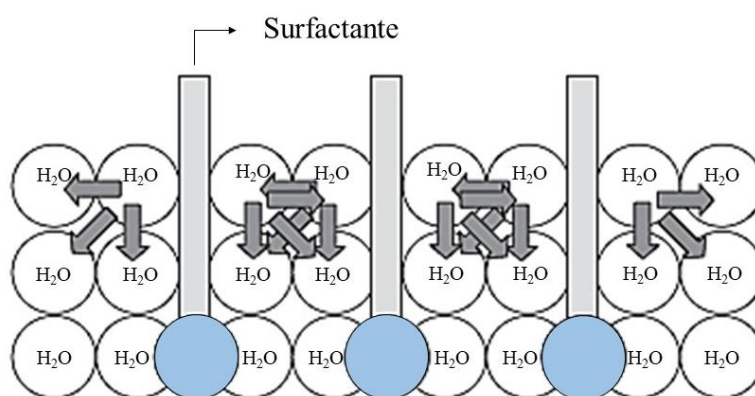
Figura 4 – A tensão superficial de um sistema pode ser afetada de 3 formas diferentes: presença de eletrólitos, compostos orgânicos e moléculas tensoativas.



Fonte: Adaptado de Kronberg; Holmberg; Lindman (2014).

Legenda: A presença de eletrólitos aumenta a tensão superficial porque os íons interagem com as moléculas de água por meio de interações eletrostáticas, aumentando as forças coesivas do sistema. Alguns compostos orgânicos solúveis em água, como o etanol, concentram-se preferencialmente na superfície líquido-ar, reduzindo a tensão superficial.

Figura 5 – As forças de atração entre as moléculas de água na superfície são reduzidas pela adição de surfactantes.

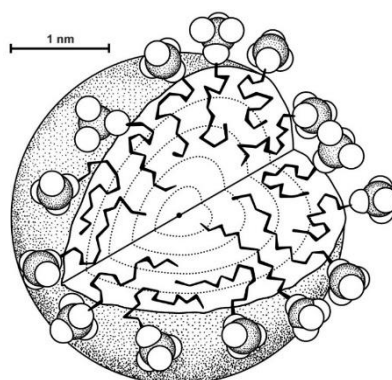


Fonte: Adaptado de Daltin (2011).

1.3.2 Micelização

Como mencionado anteriormente, à medida que a concentração de tensoativos aumenta e as regiões de maior estabilidade são saturadas por moléculas individuais, um mecanismo alternativo de remoção dos grupos hidrofóbicos em contato com a água substitui a adsorção de superfícies, reduzindo a energia livre do sistema (ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 125). Esse fenômeno, conhecido como micelização, é uma das características mais notáveis dos surfactantes e decorre do excesso de moléculas livres em solução, que tendem a se encontrar, de tal modo que suas partes hidrofóbicas, sem afinidade pela água, mas com afinidade entre si, agrupem-se formando micelas (Figura 6), estruturas termodinamicamente mais estáveis que os monômeros livres em solução (DALTIM, 2011, p. 24).

Figura 6 – Ilustração de uma micela de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água.



Fonte: Israelachvili (2011).

Tais estruturas podem ser definidas como partículas coloidais em que as caudas lipofílicas estão posicionadas em direção ao núcleo da micela, enquanto as cabeças polares interagem com a água circundante (VARJANI; UPASANI, 2017). A concentração na qual surfactantes formam micelas é chamada concentração micelar crítica (CMC) e é considerada a característica físico-química mais importante de um tensoativo, porque representa a barreira de concentrações na qual essas moléculas apresentam comportamentos diferentes. A partir da CMC, então, a adição de mais tensoativos não interfere na ocupação das superfícies e consequentemente na redução da tensão superficial, mas aumenta o número de micelas, e delas advêm as propriedades de solubilização, emulsificação e detergência (DALTIM, 2011, p. 258; KRONBERG; HOLMBERG; LINDMAN, 2014, p. 234; NAKAMA, 2017, p. 233).

1.3.2.1 Solubilização

A solubilização pode ser entendida como a dissolução de uma substância sólida, líquida ou gasosa em um solvente, por meio de sua interação com as micelas de um surfactante, formando uma solução estável. Com isso, materiais insolúveis ou pouco solúveis em um solvente específico podem ser solubilizados. Como exemplo, compostos apolares, como hidrocarbonetos, podem solubilizar em água no interior de micelas, em íntimo contato com suas caudas hidrofóbicas, enquanto moléculas orgânicas serão solubilizadas em suas superfícies, em contato com as cabeças polares. Trocando-se a polaridade do solvente, as micelas se organizarão de modo diferente (ver Figura 2, p. 17) e a forma como as substâncias solubilizarão se inverterá (NAKAMA, 2017, p. 235; ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 202).

1.3.2.2 Emulsificação

Emulsificação, por sua vez, é a formação de emulsões a partir da dispersão de um líquido imiscível em outro, gerando uma mistura heterogênea, diferente da solubilização onde ocorre a formação de uma solução. Assim, para formar uma emulsão entre óleo e água na presença de um agente emulsionante acima de sua CMC, deve-se fornecer agitação ao sistema, de modo que as gotículas de óleo recém-criadas sejam recobertas pelas moléculas de surfactantes que estavam organizadas em micelas, originando uma dispersão coloidal que pode durar de minutos a anos, até a separação das fases (ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 202; VARJANI; UPASANI, 2017).

Se a emulsão contém gotículas de óleo dispersas em água, recebe o nome de emulsão óleo em água (O/A), como ocorre no leite, caso contrário, emulsão água em óleo (A/O), a exemplo da margarina. Sorvetes, cosméticos, tintas e agrotóxicos são exemplos de emulsões presentes no dia a dia. Além das indústrias de alimentos, cosméticos, químicas e agroquímicas, agentes emulsionantes também são muito utilizados na indústria de petróleo para extração do óleo cru (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2018; ROSEN; KUNJAPU, 2012, p. 202; SALEK; EUSTON, 2019; VARJANI; UPASANI, 2017).

1.3.2.3 Detergência

Detergência pode ser definida como a remoção de sujidades sólidas ou líquidas de uma superfície em contato com um líquido. Quando um substrato que apresenta sujidade oleosa

é submerso em solução contendo surfactante acima de sua CMC, tem-se o mesmo fenômeno observado na formação de uma emulsão. Os monômeros do tensoativo em micelas ocupam as superfícies do óleo com a água e do substrato com a água e, à medida que, essas zonas de transição são ocupadas e ainda existem micelas disponíveis, ocorre a tendência de se criar novas superfícies de estabilização. Deste modo, gera-se uma força, conhecida como efeito cunha, que expulsa a sujidade adsorvida ao substrato, formando uma emulsão O/A ou uma dispersão, que devem ser estabilizados no solvente até o momento do enxágue. Outras variáveis que auxiliam na detergência são a agitação ou atrito e o aquecimento (DALTIM, 2011, p. 33-34).

1.4 ASPECTOS AMBIENTAIS RELACIONADOS AO USO DOS SURFACTANTES

Surfactantes são utilizados de forma massiva em produtos de higiene pessoal, do lar e na limpeza industrial e um grande volume desses compostos chega ao meio ambiente, seja após o tratamento dos efluentes em estações de tratamento ou de modo indireto, através do despejo de águas não tratadas em rios, lagos e oceanos. Uma vez no ambiente, surfactantes tendem a se adsorver aos sedimentos, depositando-se no fundo do leito, o que dificulta sua biodegradação e aumenta o tempo de persistência desses contaminantes no ambiente, alguns dos quais considerados tóxicos (FORTUNE BUSINESS INSIGHTS, 2021a; JACKSON *et al.*, 2016; MERRETTIG-BRUNS; JELEN, 2009).

A taxa de biodegradação dos surfactantes é ainda menor nos ambientes marinhos, uma vez que esses compostos formam complexos com íons de cálcio e magnésio, diminuindo sua biodisponibilidade aos microrganismos. Os alquil benzeno sulfonatos lineares, por exemplo, que correspondem à classe de tensoativos mais utilizada, se adsorvem de forma irreversível aos sedimentos marinhos, acumulando-se no fundo do oceano (JACKSON *et al.*, 2016).

A biodegradação pode ser definida como o processo natural no qual microrganismos presentes no ambiente consomem a matéria orgânica disponível através da quebra de suas ligações químicas, gerando subprodutos assimiláveis (WHITE, RUSSEL, 1995, p. 28). Segundo Daltin (2011, p. 93-95), surfactantes que resistem à biodegradação são estáveis e, portanto, recalcitrantes, a exemplo dos tensoativos que possuem ramificações em suas cadeias hidrocarbônicas, como o alquilbenzeno sulfonato ramificado.

Surfactantes catiônicos também são extremamente recalcitrantes em virtude de seu alto poder adsortivo, aderindo-se aos microrganismos que promovem a biodegradação e alterando dessa forma, sua capacidade de assimilar nutrientes, levando-os à morte. Um exemplo é o cloreto de didecil dimetil amônio, que apesar de ter sido substituído há quase 3 décadas por

outros tensoativos catiônicos mais biodegradáveis, ainda pode ser detectado em ambientes costeiros e marinhos (BRYCKI; WALIGÓRSKA; SZULC, 2014; DALTIM, 2011, p. 95; JACKSON *et al.*, 2016).

Uma segunda via de entrada de surfactantes no ambiente decorre do uso de toneladas de surfactantes em acidentes ambientais envolvendo derramamentos ou vazamentos de petróleo no oceano, onde atuam como agentes dispersantes e emulsificantes. Contudo, além de recalitrantes, alguns surfactantes, como o dioctil sulfosuccinato de sódio, utilizado na remediação do óleo derramado pela plataforma Deepwater Horizon, em 2010, é citotóxico a diversas formas de vida marinha, incluindo invertebrados, algas, ovos de peixe e comunidades microbianas (ALMEDA *et al.*, 2014; BARRON *et al.*, 2003; BEYER *et al.*, 2016).

Em virtude dos fatos mencionados e tendo em vista a importância dos surfactantes para a sociedade moderna, o desenvolvimento de novos tensoativos deve priorizar o uso de matérias-primas renováveis como forma de diminuir o seu impacto no ambiente. A exemplo disso, os biopolímeros representam o expoente de uma transição para processos industriais mais sustentáveis, com uso de recursos renováveis em sua produção e geração de produtos ambientalmente corretos (SANTOS *et al.*, 2016).

2 SURFACTANTES MICROBIANOS

Moléculas com propriedades surfactantes também são encontradas na natureza, sendo produzidas por animais, plantas e microrganismos. Dentre os surfactantes de origem natural com aplicações biotecnológicas em potencial, aqueles produzidos por microrganismos são os mais estudados (FARIAS *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2021), o que se reflete no grande número de dissertações, teses, artigos científicos, livros e patentes publicados.

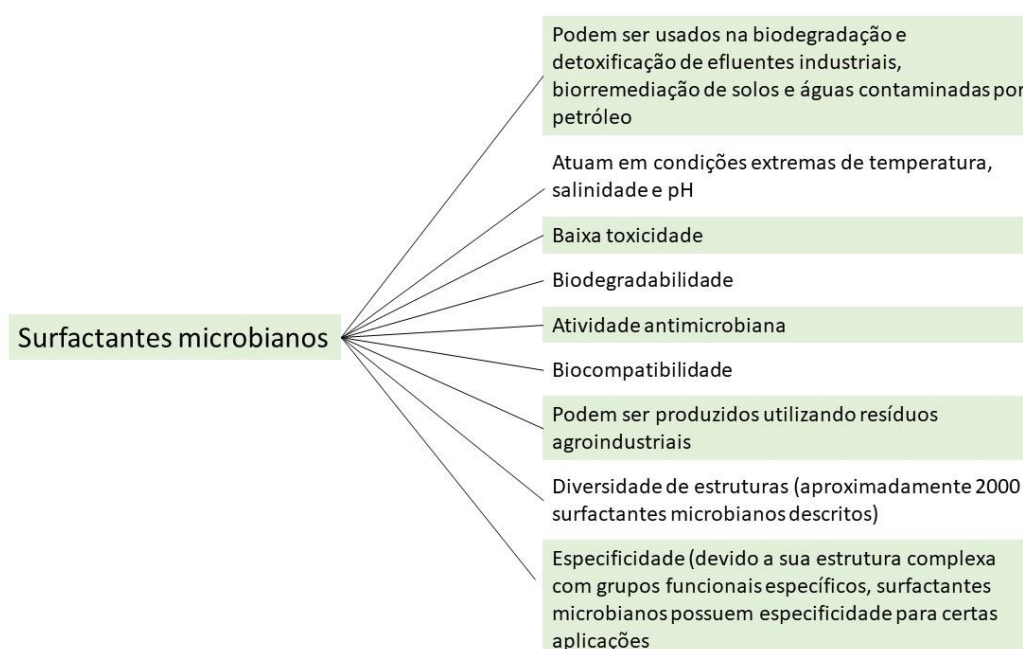
Surfactantes microbianos são um grupo estruturalmente diverso de moléculas produzidas, em sua maioria, por bactérias, leveduras e fungos filamentosos e que assim como suas contrapartes sintéticas, possuem natureza anfifílica, sendo dotados de um grupo hidrofílico ligado a uma cadeia hidrofóbica, possuindo, portanto, características e propriedades superficiais como redução das tensões superficial e interfacial e micelização, descritas anteriormente. (BANAT *et al.*, 2010; BJERK *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021; MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; SANTOS *et al.*, 2016).

Tais compostos têm despertado o interesse da academia e indústria nas últimas décadas por conta de uma série de vantagens frente aos surfactantes de origem sintética (Figura 7). Em primeiro lugar, possuem uma grande diversidade química e funcional e são tolerantes a

condições extremas de temperatura, pH (2—12) e salinidade, o que lhes garante aplicabilidade em diferentes processos industriais. Ademais, por conta de sua origem biológica, são menos tóxicos e mais biodegradáveis que os tensoativos sintéticos, tornando-se adequados para uso na agricultura e nas indústrias de alimentos, cosméticos, sabões e detergentes, farmacêutica, entre outras (BJERK *et al.*, 2021; ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021; FARIAS *et al.*, 2021; JOHNSON *et al.*, 2021; PRADHAN; BHATTACHARYYA, 2017).

Os surfactantes de origem microbiana são comumente divididos em duas classes principais: moléculas de baixa massa molecular, chamadas biossurfactantes e moléculas de alta massa molecular, conhecidas como bioemulsificantes (ROSENBERG, RON, 1999), mas também são frequentemente classificados de acordo com a sua composição química. Outras formas de categorizar esses compostos incluem a carga de seu grupo polar (iônico, não-iônico e anfótero), propriedades físico-químicas e microrganismos produtores (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; FARIAS *et al.*, 2021; MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; SANTOS *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Figura 7 – Características gerais e vantagens dos surfactantes microbianos frente aos surfactantes de origem petroquímica.



Fonte: Adaptado de Vieira *et al.* (2021).

2.1 BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes (BSs) possuem massa molecular entre 0.5 e 1.5 quilodáltons (KDa) e podem apresentar em seu grupo polar mono, di ou oligossacarídeos, aminoácidos, grupos fosfato e funções orgânicas como éster, ácido carboxílico e álcool. Em contrapartida, sua parte apolar é formada por ácidos graxos de cadeia linear, ramificada, saturada, insaturada ou ainda hidroxilada. Os glicolipídeos e lipopeptídeos são os principais representantes dessa classe, que também inclui os ácidos graxos, fosfolipídeos, lipídeos neutros e proteínas (BJERK *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021; FARIAS *et al.*, 2021; JAHAN *et al.*, 2020; UZOIGWE *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2021).

Com relação as suas propriedades, BSs possuem excelente atividade superficial, reduzindo as tensões superficial e interfacial de sistemas e formando emulsões. Ademais, possuem baixa CMC, pré-requisito de um bom tensoativo. Diante disso, podem atuar como agentes adsortivos, solubilizantes, dispersantes, umectantes, detergentes, espumantes e emulsionantes em vários processos industriais (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; BANAT *et al.*, 2010; UZOIGWE *et al.*, 2015).

2.2 BIOEMULSIFICANTES

Bioemulsificantes (BEs), por outro lado, são moléculas de alta massa molecular, podendo se apresentar na forma de polissacarídeos, lipopolissacarídeos, glicoproteínas, lipoproteínas, proteínas ou ainda, como complexos de carboidratos, lipídeos e proteínas, alcançando até 1 megadáltons (MDa). Por conta de seu tamanho avantajado, não reduzem a tensão superficial, mas podem formar e estabilizar emulsões de forma eficiente, mesmo em baixas concentrações. A estabilização das emulsões pelos BEs se deve à presença de grupos reativos expostos em sua estrutura, o que diminui o choque entre as micelas e consequentemente reduz a chance de rompimento das mesmas (DA SILVA *et al.*, 2021; ROSENBERG, RON, 1999; UZOIGWE *et al.*, 2015; THRAEIB *et al.*, 2022).

Segundo Calvo *et al.* (2009) e Uzoigwe *et al.* (2015), a combinação de polissacarídeos, ácidos graxos e proteínas na molécula do BE, potencializa suas propriedades emulsificantes e estabilizantes. Além disso, BEs também participam da solubilização de substratos com elevada hidrofobicidade, sendo úteis em eventos de biorremediação envolvendo vazamento ou derramamento de petróleo ou derivados em ambientes marinhos e terrestres, como também nas indústrias farmacêutica, de cosméticos, alimentos, bebidas, petroquímica, entre outras.

3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES E BIOEMULSIFICANTES

Microrganismos produtores de biossurfactantes e bioemulsificantes são onipresentes na natureza, habitando ambientes aquáticos (água doce e salgada), terrestres (solo, sedimentos e lodo) e aqueles com condições extremas de temperatura, salinidade, pressão e pH (PERFUMO *et al.*, 2010, p. 1503; PITOCCHI *et al.*, 2020). A diversidade ecológica e fisiológica dos microrganismos favorece a produção de uma miríade de surfactantes com elevado grau de complexidade e heterogeneidade químicas que estão diretamente relacionados aos papéis biológicos que desempenham na natureza, e que, por conseguinte, suscitam possíveis aplicações biotecnológicas (DA SILVA *et al.*, 2021; UZOIGWE *et al.*, 2015).

Diversas espécies de bactérias (incluindo cianobactérias e actinobactérias), leveduras, fungos filamentosos e cogumelos das classes Ascomycetos e Basidiomycetos, algas e algumas arqueias produzem surfactantes microbianos a partir de substratos variados, solúveis ou insolúveis em água, tais como açúcares, óleos vegetais, resíduos agroindustriais e hidrocarbonetos (LOURENÇO *et al.*, 2018; LUNA-VELASCO *et al.*, 2007; MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; VELIOGLU; UREK, 2015; VIEIRA *et al.*, 2021). Segundo Thraeib *et al.* (2022), enquanto alguns microrganismos sintetizam BSs e BEs exclusivamente de hidrocarbonetos ou de substratos hidrofílicos, outros podem utilizar as duas fontes de carbono, o que resulta em moléculas com grande diversidade de estruturas e funções.

Não obstante, uma mesma linhagem pode produzir surfactantes diferentes de acordo com o tipo de substrato fornecido. Isso acontece porque diferentes fontes de carbono alteram a estrutura dos BSs/BEs e consequentemente suas propriedades. Essas mudanças são benéficas do ponto de vista industrial, quando funcionalidades específicas são desejadas para uma certa aplicação, mas suscitam um rigor maior durante a produção em larga escala (FARIAS *et al.*, 2021; JOHNSON *et al.*, 2021).

Bactérias são consideradas as principais produtoras de surfactantes microbianos, uma vez que a maioria dos BSs e BEs descritos na literatura tem origem bacteriana, com predominância dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia* e *Halomonas* (CERESA *et al.*, 2021; FENIBO *et al.*, 2019; SHEKAR *et al.*, 2015).

Os ramnolipídeos, produzidos por *P. aeruginosa* (JARVIS; JOHNSON, 1949) e a surfactina, produzida por *Bacillus* sp. (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968), foram os primeiros BS descobertos e são até hoje os mais estudados por conta de suas atividades

antimicrobiana, antiviral, imunossupressora, anticoagulante e antitumoral (BJERK *et al.*, 2021; RAAIJMAKERS *et al.*, 2010).

Surfactantes fúngicos, em comparação, foram descritos em apenas 19% do total de publicações na área. Entretanto, leveduras e fungos filamentosos secretam biossurfactantes e bioemulsificantes com uma grande diversidade de estruturas, alguns dos quais, de produção exclusiva por esses microrganismos, como os soforolipídeos, lipídeos de manosileritritol, celobiolipídeos, lipídeos de polioliol, xilolipídeos, hidrofobinas e cerato-plataninas (DA SILVA *et al.*, 2021; PITOCCHI *et al.*, 2020).

Outra característica notável das leveduras e fungos filamentosos se deve ao *status* GRAS (“Geralmente Reconhecido Como Seguro”) de uma série de bioprodutos produzidos por esses microrganismos, ao contrário daqueles originados de bactérias patogênicas como *Bacillus* e *Pseudomonas*, que possuem uso restrito (AMARAL *et al.*, 2010). O acrônimo GRAS foi criado pela Food & Drug Administration, órgão de controle norte americano, para designar organismos não-patogênicos cujos produtos podem ser usados nas indústrias farmacêutica e de alimentos, sem oferecer risco ao consumidor (FDA, 2022).

A maioria dos biossurfactantes e bioemulsificantes leveduriformes é produzida por fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Starmerella*, *Yarrowia*, *Pseudozyma* e *Saccharomyces* (Tabelas 2 e 3). Dentre os BSs leveduriformes de maior importância acadêmica e comercial, estão os soforolipídeos e os lipídeos de manosileritritol, glicolipídeos produzidos, respectivamente, por *S. bombicola* e espécies do gênero *Pseudozyma*, que apresentam excelentes propriedades superficiais e biomédicas. Já em relação aos BEs, Liposan e Yansan, ambos produzidos por *Y. lipolytica*, são os mais bem descritos até o momento e apresentam elevados índices de emulsificação (AMARAL *et al.*, 2010; CERESA *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021).

A pesquisa com fungos filamentosos, por sua vez, ainda é incipiente e os trabalhos disponíveis na literatura envolvendo a bioprospecção de biossurfactantes e bioemulsificantes produzidos por esses organismos são raros, o que representa um potencial desperdiçado, visto que fungos filamentosos são conhecidos por produzirem uma variedade de biopolímeros utilizados na indústria, como polissacarídeos, exopolissacarídeos, enzimas hidrolíticas e agentes antimicrobianos (LUFT *et al.*, 2020; TUPE *et al.*, 2022).

Uma das razões levantadas por Silva *et al.* (2018) para a menor exploração dos fungos filamentosos nessa área se deve ao seu crescimento mais lento em relação às bactérias e leveduras. Todavia, fungos filamentosos têm demonstrado um grande potencial de produção de BSs e BEs, apresentando, rendimentos superiores aos encontrados por muitas leveduras e

principalmente por bactérias (LUFT *et al.*, 2020), como pode ser observado nas Tabela 2 e 3, onde estão registrados os principais biossurfactantes e bioemulsificantes fúngicos conhecidos até o momento.

Nota-se ao observar as tabelas supracitadas que enquanto leveduras produzem glicolipídeos, glicoproteínas, lipoproteínas e complexos de carboidrato, lipídeo e proteína, fungos filamentosos sintetizam uma gama maior de biossurfactantes e bioemulsificantes: glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, proteínas, lipoproteínas e complexos de carboidrato, lipídeo e proteína. Além disso, observa-se que o número de BSs descobertos é maior que o de BEs, o que também é visto em bactérias, e dadas as propriedades e potenciais aplicações dos BEs, discutidas posteriormente, a caracterização de novos bioemulsificantes apresenta grande importância acadêmica e industrial.

Tabela 2 – Principais biossurfactantes produzidos por leveduras e fungos filamentosos.

(Continua)		
Classes	Biossurfactantes	Microrganismos
Glicolipídeos	Soforolipídeos	<i>Candida</i> sp. ³
		<i>Rhodotorula</i> sp. ¹
		<i>Starmerella bombicola</i> ¹
		<i>Torulopsis</i> sp. ¹
		<i>Wickerhamiella domericqiae</i> ¹
	Trealolipídeos	<i>Fusarium fujikuroi</i> ²
	Lipídeos de manosileritritol	<i>Candida</i> sp. ³
		<i>Pseudozyma</i> sp. ¹
		<i>Schizonella melanogramma</i> ¹
	Xilolipídeos	<i>Ustilago</i> sp. ³
Fosfolipídeos	Celobiolipídeos	<i>Pichia caribbica</i> ¹
		<i>Cryptococcus humicola</i> ¹
		<i>Pseudozyma</i> sp. ¹
		<i>Sympodiomyces paphiopedili</i> ¹
	Lipídeos de poliol	<i>Ustilago maydis</i> ³
		<i>Aureobasidium</i> sp. ³
		<i>Rhodotorula</i> sp. ¹
Ácidos graxos	Uzmaq	<i>Aspergillus flavus</i> AF612 ²
	Ácido espiculispórico	<i>Penicillium spiculisporum</i> ²
	Malpininas/malpipaldinas	<i>Talaromyces trachyspermus</i> ²
		<i>Mortierella alpina</i> ²

(Conclusão)		
Classes	Biossurfactantes	Microrganismos
Proteínas	Hidrofobinas	<i>Schizophyllum commune</i> ² <i>Trichoderma reesei</i> ² <i>A. terreus</i> ² <i>T. atroviride</i> ²
	Cerato-plataninas	<i>Trichoderma harzianum</i> ²

Fonte: Adetunji; Olaniran, (2021); Baldeweg *et al.*, (2019); Da Silva *et al.*, (2021); Ishaq *et al.*, (2015); Luft *et al.* (2020); Pitocchi *et al.* (2020); Sharma; Sundar; Srivastava, (2021).

Tabela 3 – Principais bioemulsificantes produzidos por leveduras e fungos filamentosos.

Classes	Bioemulsificantes	Microrganismos
Glicoproteínas	Liposan/Yansan	<i>Yarrowia lipolytica</i> ¹ <i>Kluyveromyces marxianus</i> ¹ <i>Saccharomyces sp.</i> ¹ <i>S. bombicola</i> ¹ <i>Wickerhamomyces anomalus</i> ¹
	Manoproteínas	
	N/d ⁴	<i>Curvularia lunata</i> ² <i>Aspergillus mulundensis</i> ² <i>Fusarium sp.</i> ²
	N/d	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>SNP5</i> ²
		<i>Yarrowia lipolytica</i> <i>MTCC9520</i> ¹ <i>Candida sp.</i> ³ <i>Galactomyces pseudocandidum</i> ³ <i>Geotrichum candidum</i> ³ <i>M. circinelloides</i> UCP0001 ² <i>Mucor hiemalis</i> ² <i>Penicillium citrinum</i> ² <i>Penicillium sp.</i> ²
Complexo Carboidrato-Lipídeo-Proteína	N/d	

Fonte: Adetunji; Olaniran, (2021); Da Silva *et al.*, (2021); Ferreira *et al.* (2020); Luft *et al.* (2020); Marques *et al.* (2020); Paraszkievicz; Kanwal; Długoński (2002); Sharma; Sundar; Srivastava, (2021).

Legenda: 1 – Leveduras; 2 – Fungos filamentosos; 3 – Fungos dimórficos; 4 – Não disponível.

Entre os gêneros de fungos filamentosos com maior número de BSs e BEs descritos na literatura, estão *Aspergillus*, *Fusarium*, *Ustilago*, *Penicillium* e *Trichoderma* (ISHAQ *et al.*, 2015; LUNA-VELASCO *et al.*, 2007; PIEGZA *et al.*, 2021; SENA *et al.*, 2018).

Um levantamento feito por Markande, Patel e Varjani (2021) mostrou que fungos filamentosos produzem, sobretudo, BSs e BEs contendo mono ou oligossacarídeos (31%), lipídeos (27,6%), proteínas (13,8%), carboidratos (10,3%), aminoácidos ou peptídeos (3,4%) e outros componentes em menor quantidade.

4 BIOEMULSIFICANTES FÚNGICOS

Várias espécies de leveduras e alguns fungos filamentosos produzem biossurfactantes e bioemulsificantes com propriedades emulsionantes e estabilizantes. Contudo, nesta seção serão abordados apenas os bioemulsificantes propriamente ditos, que segundo mencionado anteriormente, diferenciam-se dos primeiros pela maior massa molecular e por não apresentarem a capacidade de reduzir as tensões superficial e interfacial, mas de formar emulsões estáveis entre dois ou mais líquidos imiscíveis, além da solubilização de substratos pouco solúveis.

4.1 LIPOSAN

Leveduras produzem uma variedade de surfactantes microbianos e a espécie *Yarrowia lipolytica* se destaca pela produção de diferentes bioemulsificantes (AMARAL *et al.*, 2010). Liposan foi o primeiro BE de *Y. lipolytica* a ser isolado e dentre os de origem leveduriforme é o mais estudado (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984; PESSÔA *et al.*, 2019). Em sua composição predominam os carboidratos (glicose, galactose, galactosamina e ácido galacturônico), que compõem 83% da molécula, seguidos por proteínas, que somam 17%, sendo considerado, portanto, uma glicoproteína (THRAEIB *et al.*, 2022).

Sua produção está atrelada ao uso de hidrocarbonetos como o *n*-Hexadecano no meio de fermentação e é inibida na presença de glicose. Em relação a sua atividade emulsificante, liposan apresenta elevados índices de emulsificação de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa, como *n*-Dodecano, *n*-Tetradecano e *n*-Hexadecano e também emulsiona e estabiliza emulsões de óleos vegetais (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984; THRAEIB *et al.*, 2022).

Quanto a sua estabilidade em condições variadas de pH e temperatura, liposan exibe máxima atividade emulsificante em pH ácido (2 – 5) e na faixa entre 30 e 90 °C, perdendo 60%

de sua atividade na temperatura de 100 °C (CIRIGLIANO; CARMAN, 1984). Por fim, em virtude de sua baixa produtividade, o foco dos estudos atuais está voltado à otimização das condições de produção do liposan, como forma de aumentar seu rendimento e assim, competir com os bioemulsificantes bacterianos e com o baixo custo dos emulsionantes sintéticos (SAJNA *et al.*, 2015).

4.2 YANSAN

Outro bioemulsificante fúngico de destaque é o yansan, produzido por uma linhagem de *Y. lipolytica* isolada da Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro. Diferentemente do liposan, o yansan é produzido em meio de fermentação contendo glicose como única fonte de carbono, mas possui uma composição bioquímica semelhante, estimada em 84% de carboidratos (manose, glicose, galactose e arabinose), 15% de proteínas e 1% de lipídeos (ácidos palmítico, esteárico, láurico e oleico) (AMARAL *et al.*, 2006).

A concentração micelar crítica do Yansan é de 500 mg.L⁻¹, ficando abaixo de outros emulsionantes utilizados na indústria. É importante salientar que quanto menor a CMC de um bioemulsificante, menor a quantidade necessária para solubilizar e/ou emulsificar substratos imiscíveis, gerando uma economia nos processos industriais. Em relação as suas propriedades, o yansan é capaz de emulsionar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de tamanhos variados em uma faixa de pHs de 3 a 9 (AMARAL *et al.*, 2006).

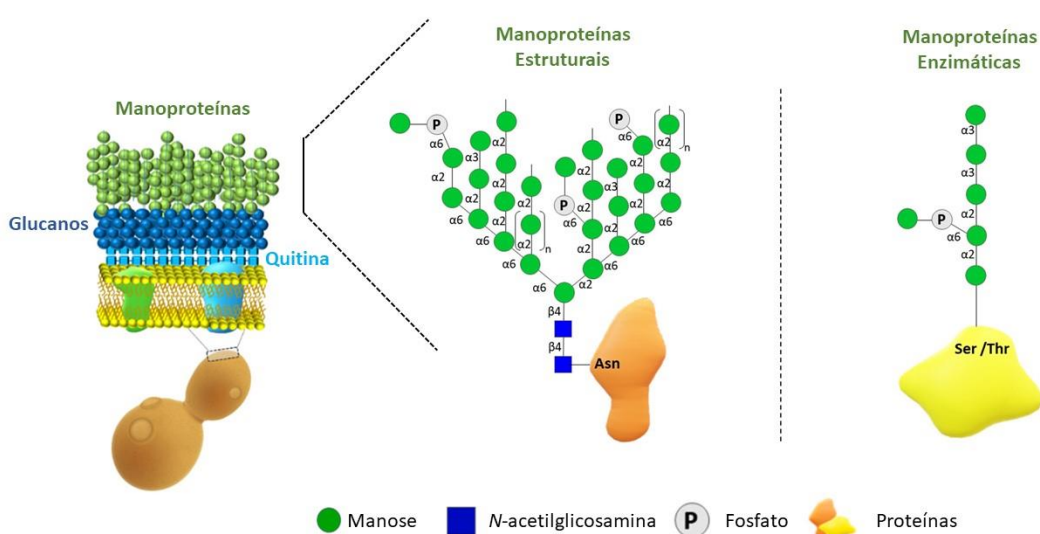
4.3 MANOPROTEÍNAS

Manoproteínas constituem um grupo de glicoproteínas que juntamente aos β -glucanos e a quitina compõem a parede celular de muitas leveduras. De acordo com sua composição química, podem ser classificadas em manoproteínas estruturais ou enzimáticas (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; SNYMAN *et al.*, 2021). O primeiro tipo é o mais abundante na natureza e contém 10% de proteínas e 90% de carboidratos, no qual os resíduos de manose se conectam entre si por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$), ($\alpha 1 \rightarrow 2$) e ($\alpha 1 \rightarrow 3$), formando um polímero de manose que, por sua vez, liga-se ao polipeptídeo por meio de uma ligação *N*-glicosídica entre dois resíduos de *N*-acetilglicosamina e o nitrogênio amídico de um resíduo de asparagina, como mostrado na Figura 8 (BASTOS *et al.*, 2022).

Manoproteínas enzimáticas, por sua vez, contém um conteúdo proteico maior (30 – 50%) e são caracterizadas pela presença de cadeias curtas de manose, com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 2$) e

($\alpha 1 \rightarrow 3$), nas quais um resíduo de manose faz uma ligação *O*-glicosídica com a hidroxila de um resíduo de serina ou treonina (Figura 8) (BASTOS *et al.*, 2022; SNYMAN *et al.*, 2021). Resíduos adicionais de manosilfosfato podem aparecer em ambas as classes, aumentando a solubilidade em água e a depender da classe da manoproteína e do gênero da levedura, o peso molecular desses polímeros pode variar entre 50 – 800 kDa (SNYMAN *et al.*, 2021).

Figura 8 – Estrutura esquemática das manoproteínas estruturais e enzimáticas presentes na parede celular de *Saccharomyces* spp.



Fonte: Adaptado de Bastos *et al.* (2022).

Cameron, Cooper e Neufeld (1988) foram os primeiros a determinar a atividade emulsificante das manoproteínas extraídas da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que emulsionam eficientemente uma série de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, misturas, solventes orgânicos e óleos vegetais, além de serem estáveis em uma ampla faixa de pHs, temperaturas de 121 °C e concentrações de NaCl de até 10% (ALCANTARA *et al.*, 2013). Por fim, são excelentes agentes estabilizantes, como demonstrado por Lukondeh, Ashbolt e Rogers (2003), que isolaram uma manoproteína de *Kluyveromyces marxianus* com propriedade de estabilizar emulsões de óleo de milho por até 3 meses.

5 APLICAÇÕES DOS BIOEMULSIFICANTES

Uma elevada demanda por agentes emulsionantes nos mais diversos setores industriais impulsiona o mercado mundial de emulsificantes, que deve alcançar 17 bilhões de dólares em valor de mercado até 2027 (COHERENT MARKET INSIGHTS, 2020). Emulsificantes são utilizados na indústria de alimentos e bebidas como agentes emulsionantes e estabilizantes conferindo-lhes melhores características sensoriais, como aroma, textura e sabor. Nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e cuidado pessoal, são usados no preparo de xaropes, comprimidos, cremes e géis. Na indústria agroquímica, atuam na estabilização dos princípios ativos de defensivos agrícolas e na indústria petroquímica, auxiliam na extração do óleo dos reservatórios de petróleo, bem como na limpeza de dutos (OPENPR, 2020).

Contudo, a maioria dos emulsificantes utilizados na indústria é sintética, alguns dos quais podendo oferecer riscos ao meio ambiente (ver seção 1.4) e à saúde humana. Diversos estudos vêm demonstrando o papel-chave que emulsificantes sintéticos, como o polisorbato 80 (Tween 80) e a carboximetilcelulose, amplamente utilizados em alimentos processados, desempenham na gênese de processos inflamatórios intestinais, como a síndrome do intestino irritável e a síndrome metabólica (NAIMI *et al.*, 2021; SIENA *et al.*, 2022).

Associado a isso, a crescente conscientização da sociedade quanto à segurança dos produtos que consome tem aumentado a demanda por itens naturais, orgânicos, veganos e sustentáveis e os bioemulsificantes se encaixam bem nessa dinâmica, sendo fortes candidatos à substituição parcial ou total dos seus equivalentes sintéticos (MARKANDE, PATEL, VARJANI, 2021; SALEK *et al.*, 2022). Em vista dos fatos mencionados, serão apresentadas três áreas estratégicas nas quais bioemulsificantes fúngicos podem ser empregados, agregando valor aos produtos e serviços gerados.

5.1 BIOEMULSIFICANTES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A emulsificação desempenha um papel importante na consistência e textura de muitos alimentos naturais e industrializados, de modo que os bioemulsificantes podem ser usados em formulações que contenham sistemas polifásicos, como óleos ou gorduras em água e vice-versa, promovendo sua homogeneização (ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; DALTIM, 2011, p. 309). Além do emulscionamento eficiente, bioemulsificantes também podem atuar em sua estabilização, visto que emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e tendem a se desfazer ao longo do tempo, o que somado às misturas complexas de ingredientes, pH, teor de

sal e elevadas temperaturas de preparo, podem diminuir sua estabilidade e, assim, o tempo de prateleira do produto (GUDIÑA; RODRIGUES, 2019, p. 127; SALEK; EUSTON, 2019).

Além de apresentarem performances equivalentes ou superiores aos emulsionantes comumente utilizados na indústria de alimentos, bioemulsificantes também se destacam por sua maior estabilidade em condições extremas de temperatura, salinidade e pH, além de ausência de toxicidade. Assim, diversos trabalhos têm demonstrado o potencial de utilização de bioemulsificantes fúngicos na indústria de alimentos (ALCANTARA *et al.*, 2013; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2010), podendo compor formulações de maionese (CAMPOS *et al.*, 2015; TORABIZADEH; SHOJAOSADATI; TEHRANI, 1996), molhos (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2019; SHEPHERD *et al.*, 1995), margarina, biscoitos, bolos, sorvetes e salsichas (LUKONDEH; ASHBOLT; ROGERS, 2003).

Bioemulsificantes também podem ser usados na indústria de panificação, uma vez que melhoram a reologia da massa através do aumento da capacidade de retenção de água, aliada à homogeneização eficiente dos ingredientes e incremento da elasticidade e volume da mesma contribuindo para o sabor e aparência do produto (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2018; ADETUNJI; OLANIRAN, 2021; MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021).

No mais, em virtude de sua atividade antimicrobiana, bioemulsificantes podem ser utilizados como ferramentas poderosas na segurança de alimentos e bebidas industrializados, que são passíveis de contaminação por microrganismos patogênicos, constituindo um grave problema de saúde pública (GUDIÑA; RODRIGUES, 2019, p. 129). A exemplo disso, uma manoproteína isolada de *S. cerevisiae* inibiu o crescimento de patógenos comuns em alimentos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (KADHEM; ESSA; MAHMOOD, 2019).

5.2 BIOEMULSIFICANTES NA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO

O petróleo representa um recurso econômico estratégico no panorama geopolítico mundial, sendo a principal fonte energética utilizada pelo homem em suas atividades. Contudo, os métodos tradicionais de extração de petróleo possuem uma eficiência limitada, de modo que apenas o óleo próximo à superfície do poço é extraído nas etapas iniciais, enquanto mais de 50% permanecem retidos na rocha (DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

Assim, para que a extração continue, são empregadas tecnologias de recuperação melhorada do óleo (do inglês *Enhanced Oil Recovery*), em que processos térmicos e químicos, como a injeção de surfactantes, emulsificantes, ácidos e gases, auxiliam na percolação de 7 a

15% do óleo remanescente através dos poros da rocha até a saída do poço, aumentando, contudo, os custos do processo. Em contrapartida, uma adaptação desse método consegue recuperar até 50% do petróleo restante e vem sendo amplamente discutida na literatura, apresentando resultados promissores em estudos de campo (DE ALMEIDA *et al.*, 2016; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007; NIKOLOVA; GUTIERREZ, 2020).

A recuperação de óleo melhorada por microrganismos (*Microbial Enhanced Oil Recovery*) consiste na utilização de microrganismos ou metabólitos microbianos promissores na extração do petróleo encerrado na rocha e pode funcionar de duas maneiras. Na primeira, populações de microrganismos e nutrientes são injetados no poço junto ao fluido de perfuração e, uma vez no reservatório, esses organismos passam a produzir bioemulsificantes, biossurfactantes, solventes, ácidos orgânicos e gases, que de forma sinérgica, auxiliam na dissolução parcial da rocha, aumentando sua porosidade e, conseqüentemente, a percolação do óleo, que é emulsionado pelos emulsificantes, facilitando sua recuperação. Na segunda abordagem, apenas os metabólitos microbianos são injetados, diminuindo substancialmente o tempo do processo (DE ALMEIDA *et al.*, 2016; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; NIKOLOVA; GUTIERREZ, 2020).

Ao final da recuperação, o petróleo chega à superfície na forma de uma emulsão água em óleo, que precisa ser desfeita antes da refinação para que não se injete teores de água maiores que 1% nas colunas de fracionamento. O processo de desemulsificação pode ser feito pela adição de biodesemulsificantes mais solúveis em água que os bioemulsificantes presentes na emulsão, desestabilizando-a e aumentando a coalescência da água que estava no interior das micelas, podendo então ser separada em uma fase distinta. Trabalhos envolvendo biodesemulsificantes produzidos por leveduras e fungos filamentosos têm apresentado resultados promissores (ROCHA E SILVA *et al.*, 2017; VALLEJO-CARDONA *et al.*, 2017).

Por fim, bioemulsificantes podem ser empregados na limpeza de brocas de perfuração, oleodutos e tanques de armazenamento, uma vez que as frações mais pesadas do petróleo tendem a se acumular nessas estruturas. Dessa forma, atuam diminuindo a viscosidade das mesmas através da formação de emulsões, as quais são descartadas (DE ALMEIDA *et al.*, 2016; DALTIM, 2011, p. 308; FENG *et al.*, 2010; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2018).

5.3 BIOEMULSIFICANTES NA BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

Apesar da importância econômica do petróleo e seus derivados, vazamentos e derramamentos de óleo durante as etapas de extração, armazenamento e refino (XU *et al.*, 2018), podem comprometer seriamente o ecossistema marinho, afetando as formas de vida que ali vivem e a subsistência das comunidades costeiras, cujas atividades dependem diretamente da qualidade da água (LEVY; GOPALAKRISHNAN, 2010; BEYER *et al.*, 2016).

Hidrocarbonetos de petróleo apresentam baixa solubilidade em água, o que dificulta o acesso dos microrganismos ao óleo para que ocorra a biodegradação. Os bioemulsificantes agem aumentando a biodisponibilidade desses poluentes através da sua solubilização em água, que ocorre por meio do encapsulamento de gotículas de óleo no interior de micelas. Essas emulsões facilitam o ataque oxidativo dos microrganismos, o que associado às estratégias de retenção mecânica, com o uso de barreiras físicas de contenção, barcos especializados na remoção do óleo e materiais adsorventes, contribuem para limpeza desses ambientes (CALVO *et al.*, 2009; MNIF; GHRIBI, 2015; IVSHINA *et al.*, 2015; MAPELLI *et al.*, 2017; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2018; PACWA-PŁOCINICZAK *et al.*, 2011; PRINCE, 2015).

Uma vez que microrganismos degradadores de petróleo são onipresentes na natureza, incluindo os oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes (ATLAS, 1991; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Por esse motivo, ferramentas que otimizem esse processo apresentam grande apelo ambiental. Um evento bem-sucedido de biorremediação foi empregado após o derramamento de óleo do petroleiro Exxon Valdez na baía de Prince William, no Alasca, em 1989, que derramou 37.000 toneladas de óleo cru no oceano, permitindo uma diminuição média anual em torno de 28% para o óleo na superfície do mar e 12% para o óleo presente na coluna d'água (SWANNELL *et al.*, 1999; IVSHINA *et al.*, 2015).

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de produção de bioemulsificantes por fungos filamentosos isolados de amostras de solo de um aterro de resíduos da produção de petróleo no município de Icapuí, Ceará.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Utilizar os protocolos de tensão superficial, dispersão do óleo diesel e emulsificação do óleo de motor como parâmetros de detecção de bioemulsificantes produzidos pelos isolados fúngicos no filtrado livre de células;
- b) Extrair os bioemulsificantes produzidos por isolados selecionados;
- c) Avaliar a emulsificação de diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais pelos extratos de bioemulsificantes;
- d) Analisar o efeito da concentração dos extratos de bioemulsificantes e sua estabilidade em condições de elevado estresse salino e térmico;
- e) Determinar a carga iônica dos bioemulsificantes;
- f) Fazer uma caracterização química preliminar dos extratos de bioemulsificantes, utilizando cromatografia em camada delgada e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 MICRORGANISMOS

Foram testados 19 isolados fúngicos provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO), do Departamento de Biologia Molecular (DBM/CCEN) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os fungos foram isolados e identificados por Marques (2004) a partir de amostras de solo de um aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo, na Fazenda Belém, no município de Icapuí, Ceará. Eles foram mantidos em frascos-ampola na forma de discos de cultura em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) imersos em água destilada, à temperatura ambiente.

Para reativação, os fungos foram semeados em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) (caldo do cozimento de 200 g de batata, 20 g de glicose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada), pH 5,5, e incubados em estufa a 30 °C por 120 h. Após o crescimento, as culturas foram transferidas para tubos com meio BDA inclinado, incubadas sob as mesmas condições e, posteriormente usadas como inóculo para os testes. Fez-se, também, um novo estoque dos fungos em água destilada, a partir do qual foram feitos os repiques para cada novo experimento.

Os meios de cultura e materiais utilizados foram esterilizados por autoclavação a 121 °C, 1 atm, por 15 min e as placas de Petri, em estufa de esterilização, a 160 °C por 180 min. A semeadura dos fungos foi realizada em capela de fluxo laminar.

7.2 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES PELOS FUNGOS

7.2.1 Condições de Cultivo

Foi utilizado, com adaptações, o meio de produção de surfactantes microbianos M2, proposto por Bicca, Fleck e Ayub (1999) contendo 0,5g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4); 1g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4); 0,5g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0,1g de cloreto de potássio (KCl); 0,0132g de dicloreto de cálcio (CaCl_2); 7g de nitrato de sódio (NaNO_3); 0,01g de sulfato de ferro (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 2,5g de peptona; 1g de extrato de levedura; 5g de glicose e 1000 mL de água destilada, pH 7.

O ensaio de produção de bioemulsificantes pelas culturas fúngicas foi realizado em duplicata usando frascos erlenmeyer (250 mL) com 150 mL de meio M2 e 0,5% de óleo de motor (v/v) com aditivos (MOTRiO), esterilizado por autoclavação. As culturas foram incubadas em estufa a 30 °C por 120 h, sem agitação. Para padronização do inóculo foi preparada uma suspensão de esporos fúngicos a partir da adição de 1 mL de água destilada estéril em tubos de BDA inclinado contendo a cultura, seguida da raspagem de uma área da superfície das colônias equivalente a 1 cm² com uma alça de platina. Por fim, com auxílio de uma pipeta, a suspensão era transferida para o meio de produção.

As culturas foram filtradas em papel filtro qualitativo (Unifil) e o filtrado utilizado para os ensaios de detecção de bioemulsificantes. O papel filtro contendo a biomassa (úmida) foi transferido para placa de Petri (o peso da placa e do filtro foi aferido previamente e subtraído) e submetidos à secagem em estufa a 50 °C por 96 h. O peso da biomassa (seca) foi então aferido e expresso em g.L⁻¹.

7.2.2 Detecção de Biossurfactantes/Bioemulsificantes

7.2.2.1 Tensão superficial

Determinou-se a tensão superficial dos filtrados através de um tensiômetro de pressão de bolhas Sensadyne (QC6000), a temperatura ambiente. Nesse método, uma bomba de gás nitrogênio, ligada ao equipamento, produz bolhas no filtrado livre de células (90 mL por amostra), por meio de dois capilares de diâmetros diferentes imersos na solução. Um sensor mede, então, a diferença de pressão máxima e mínima das bolhas ao longo do tempo para calcular a tensão superficial da amostra. Isso porque, à medida que a bolha cresce, sua pressão interna aumenta e desloca a água circundante. Ao atingir uma pressão máxima, a bolha se desprende do capilar e se desloca para a superfície da solução (DALTIM, 2011).

Como controle negativo, aferiu-se a tensão superficial do meio M2 estéril e, como controle positivo, uma solução do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1%. A cada nova medição, os capilares do equipamento eram lavados com água destilada. Os resultados foram expressos em mN.m⁻¹.

7.2.2.2 Teste de dispersão do óleo diesel

A metodologia descrita por Youssef *et al.* (2004) foi utilizada para avaliar a capacidade de dispersão do óleo diesel pela presença de biossurfactantes no filtrado livre de células. Para isso, foram adicionados 50 mL de água destilada numa placa de Petri e 100 µL de óleo na superfície da água. Na sequência, 10 µL da amostra foram pipetados na superfície do óleo e a zona clara de dispersão, caso formada, foi medida. Uma solução de SDS a 1% foi usada como controle positivo.

7.2.2.3 Teste de emulsificação

A presença de bioemulsificantes nas amostras foi verificada pela emulsificação do óleo de motor, numa adaptação dos métodos descritos por Gaylarde (2000) e Batista *et al.* (2006). À um tubo de ensaio (100mm x 15mm) foram adicionados 2 mL do filtrado livre de células e 2 mL de óleo de motor, e em seguida os tubos foram agitados no vórtex por 2 min em velocidade máxima. Após 5 min, 24 h e 90 dias de repouso, os índices de emulsificação Ex (%) foram calculados dividindo-se a altura da camada emulsificada (He) pela altura total da coluna (Ht), multiplicado por 100:

$$Ex_{(\%)} = \frac{He}{Ht} \times 100 \quad (1)$$

Em que x representa o tempo de repouso das emulsões. A estabilidade das emulsões foi calculada pela razão entre os índices E_{24} e E_5 .

7.3 EXTRAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE

Após a realização dos testes de produção de bioemulsificantes foram selecionados dois isolados para extração dos bioemulsificantes presentes no filtrado livre de células e sua caracterização.

7.3.1 Cultivo em Meios com Diferentes pHs e Concentrações de Óleo de Motor

Uma vez que, a depender do microrganismo, a produção de bioemulsificantes pode estar relacionada às condições do crescimento celular, avaliou-se duas variáveis que podem interferir diretamente nesse parâmetro. Assim, três condições de pH (5, 6 e 7) e três porcentagens de óleo de motor (1%, 2% e 5%) foram testadas para o cultivo dos fungos em frascos erlenmeyer (250 mL) com 150 mL de meio M2 tamponado. A padronização do inóculo foi feita como descrito na seção 7.2.1. As culturas foram incubadas em estufa a 30 °C por 120 h, sem agitação.

Para obtenção do pH 5, utilizou-se o tampão acetato a 0,1 M, contendo 5,8 mL.L⁻¹ de ácido acético e 8,2 g.L⁻¹ de acetato de sódio. Para os pHs 6 e 7, utilizou-se o tampão fosfato de potássio, 0,1 mol.L⁻¹, feito a partir de soluções de KH₂PO₄ (136,09 g.L⁻¹) e K₂HPO₄ (174,18 g.L⁻¹) a 1 mol.L⁻¹. O volume final dos tampões foi ajustado com água destilada.

7.3.2 Extração dos Bioemulsificantes

Para recuperação dos bioemulsificantes presentes no filtrado livre de células, realizou-se uma precipitação etanólica, descrita por Monteiro *et al.* (2010) e Sena *et al.* (2018), utilizando álcool de cereais (96%). Nesse processo, o filtrado foi precipitado com quatro volumes de etanol gelado (1:4 v/v), mantido a 4 °C em geladeira por 48 h. Na sequência, o precipitado formado foi coletado por centrifugação (6000 rpm, 20 min a 4 °C) e congelado.

As amostras foram liofilizadas em liofilizador Liobras L101 e em seguida pesadas, calculando-se, então, o rendimento dos bioemulsificantes em g.L⁻¹.

7.3.3 Emulsificação de Hidrocarbonetos e Óleos Vegetais

Como forma de avaliar a extensão da atividade emulsificante dos bioemulsificantes recuperados do filtrado, realizou-se o teste de emulsificação utilizando hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (*n*-hexano, tolueno e xileno), misturas (óleos cru, de motor, diesel e querosene) e óleos vegetais (azeite e óleo de soja). O teste de emulsificação foi realizado como descrito na seção 7.2.2.3, mas utilizando uma solução de bioemulsificantes cuja concentração foi calculada com base no rendimento obtido na seção anterior.

A emulsificação do óleo de motor pelos bioemulsificantes também foi comparada a dos surfactantes sintéticos SDS, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), ambos na concentração de 10 g.L⁻¹, e Tween 80.

7.3.4 Efeito da Concentração na Atividade Emulsificante

A atividade dos extratos de bioemulsificantes foi avaliada em sete concentrações diferentes, a fim de se determinar a concentração emulsificante mínima na qual os bioemulsificantes estudados emulsionam eficientemente o óleo de motor. Para isso, foram preparadas soluções de 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 1, 1,5 e 2 mg.L^{-1} do extrato de bioemulsificantes para uso no teste de emulsificação.

7.3.5 Efeito da Salinidade e Temperatura na Atividade Emulsificante

A fim de avaliar a estabilidade dos bioemulsificantes frente a diferentes condições de salinidade e temperatura, submeteu-se-lhes, de forma isolada, a um ciclo de autoclavação de 15 min a 121 °C e a concentrações de 1%, 10%, 20% e 30% de Cloreto de Sódio (NaCl) e em seguida foram realizados os testes de emulsificação do óleo de motor.

7.4 DETERMINAÇÃO DA CARGA IÔNICA DOS BIOEMULSIFICANTES

A carga iônica dos bioemulsificantes foi determinada pela técnica de difusão dupla em ágar, proposta por Meylheuc, Van Oss e Bellon-Fontaine (2001), em que duas fileiras de poços foram perfuradas em placas de Petri contendo ágar de baixa dureza (1%), com o auxílio de uma ponteira de 1 mL. Cada poço na linha inferior foi preenchido com 40 μL de solução do bioemulsificante, solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, enquanto cada poço na linha superior foi preenchido com o mesmo volume de um composto puro de carga iônica conhecida (Figura 10).

Como composto aniônico, utilizou-se o SDS a 20 mM e como composto catiônico, CTAB, a 20 mM. Em até 48 h, observou-se o aparecimento de linhas de precipitação entre os poços, oriundas do encontro das moléculas de bioemulsificantes (caso sejam iônicos) com os surfactantes de carga oposta.

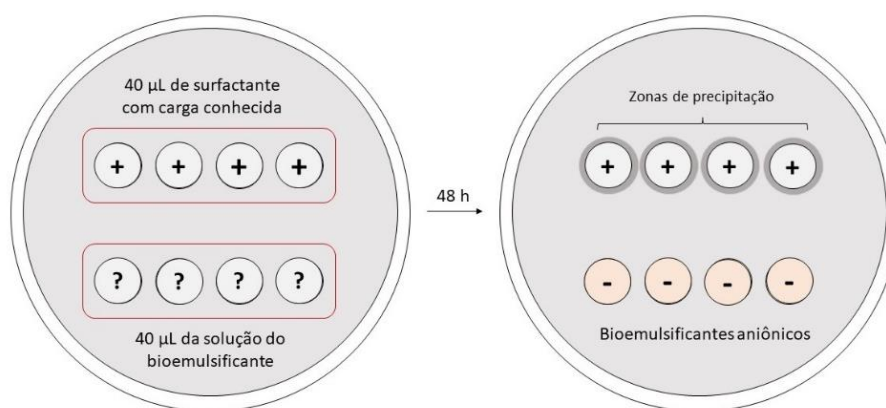
7.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR DOS BIOEMULSIFICANTES

7.5.1 Cromatografia em Camada Delgada

Realizou-se uma caracterização qualitativa do extrato dos bioemulsificantes por

Cromatografia em Camada Delgada (CCD), numa adaptação do método descrito por Piegza *et al.* (2021).

Figura 9 – Esquematização do método de difusão dupla em ágar para determinação da carga dos bioemulsificantes, tendo como exemplo surfactante catiônico CTAB.



Fonte: Autoria própria (2022).

Legenda: As zonas de precipitação formadas ao redor dos poços contendo o surfactante catiônico CTAB após 48 h indicam que o bioemulsificante tem caráter aniônico.

As análises foram feitas com amostras dissolvidas em uma mistura de metanol e acetona, aplicadas em placas de sílica gel por meio de uma pipeta capilar, e então depositadas verticalmente em um béquer com tampa, contendo uma camada rasa de solvente (fase móvel) e forrado lateralmente com papel de filtro. Como fase móvel, utilizou-se o clorofórmio para detecção de lipídeos e proteínas e uma solução de clorofórmio, metanol e acetona para detecção de carboidratos.

Ao final do processo, as placas foram submetidas a três métodos de visualização: (1) exposição a vapores de iodo, em um béquer vedado, para visualização de lipídeos; (2) aplicação de uma solução de ninidrina (0,25%) em acetona, seguida de aquecimento da placa a 105 °C por 10 min, para visualização de peptídeos e proteínas e (3), aplicação de uma solução de orcina, ácido sulfúrico (65%) e água (0.15g; 8.2 mL; 42 mL, respectivamente), também seguida de aquecimento a 105 °C por 10 min, para detecção de carboidratos.

7.5.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Amostras dos extratos de bioemulsificantes foram moídas e misturadas ao brometo de potássio (KBr) seco para confecção de pastilhas, que foram, então, submetidas ao espectrômetro Shimadzu IRPrestige-21 para identificação de grupos funcionais na região entre 400—4000 números de onda (cm^{-1}).

7.6 Análise de dados

Os dados coletados foram analisados no software Excel 365 e expressos em média aritmética e desvio padrão. Para realização da análise de variância Two-way ANOVA e para construção dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism 8.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS

Foram estudados dezenove isolados de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Espécies de fungos isoladas do solo do aterro de resíduos contaminados por petróleo em Icapuí-CE.

Espécies	Nº de linhagens	Linhagens	Cadastro SisGen
<i>Aspergillus flavus</i>	4	A82a; A85a; A85b; A85c	A7EF00C
<i>Aspergillus nidulans</i>	3	A34; A96; A97a	A02AD36
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	A95b	A43B381
<i>Aspergillus sydowii</i>	1	A93a	A68C946
<i>Aspergillus terreus</i>	2	A92; A97	A33A71E
<i>Aspergillus ustus</i>	2	A95a; A21a	A528D1F
<i>Paecilomyces variotii</i>	4	A32; A33a; A35; A36	A7BDBA0
<i>Trichoderma koningii</i>	2	A31; A96b	AAD8B2F

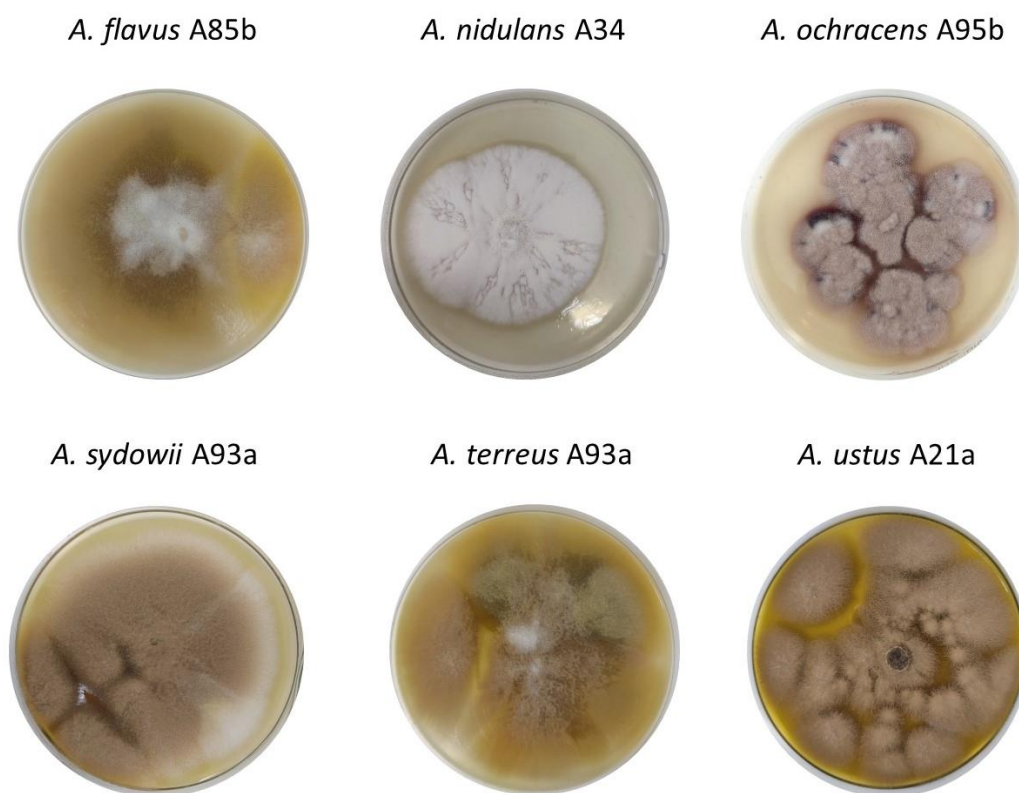
Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ Os isolados foram identificados por Marques (2004) com base em critérios morfológicos segundo manuais de identificação de fungos.

Os isolados fúngicos cresceram bem no meio BDA atestando a viabilidade da coleção de fungos armazenada em água destilada estéril. Nas Figuras 10 e 11 são apresentadas fotos das culturas das 8 espécies de fungos estudadas neste trabalho.

Figura 10 - Culturas dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* em meio Ágar Batata Dextrose.



Fonte: Autoria própria (2022).

Legenda: Fotos do anverso das placas.

Figura 11 - Culturas dos fungos pertencentes aos gêneros *Paecilomyces* e *Trichoderma* em meio Ágar Batata Dextrose.



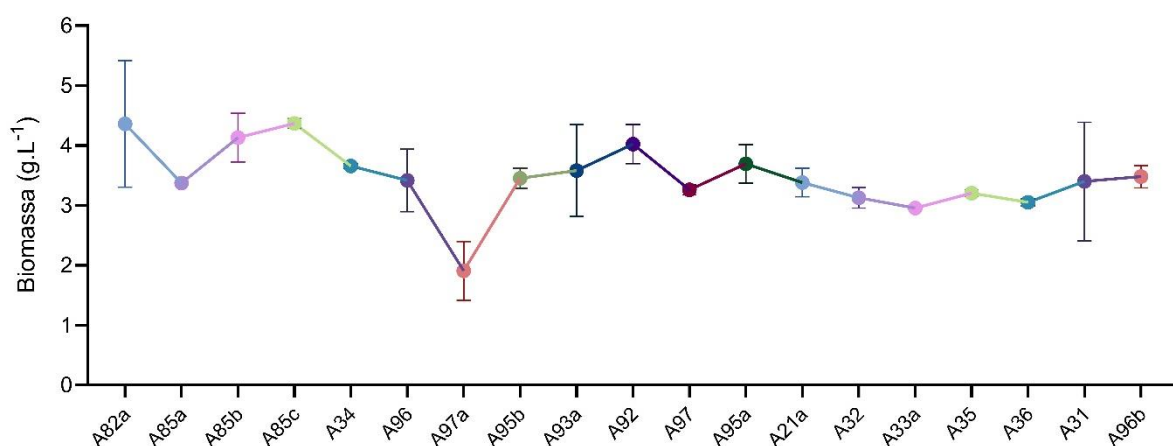
Fonte: Autoria própria (2022).

Legenda: Fotos do anverso das placas.

8.2. BIOMASSA DOS FUNGOS NO MEIO M2 COM ÓLEO DE MOTOR

Todos os isolados cresceram no meio de produção M2 acrescido de 0,5% de óleo de motor. De acordo com os dados gravimétricos expostos na Figura 12, os três gêneros de fungos filamentosos apresentaram uma média de biomassa de 3,4 g.L⁻¹. Os isolados *A. flavus* A82a, A85b, A85c e *A. terreus* A92 obtiveram os melhores rendimentos de biomassa, ultrapassando 4 g.L⁻¹, enquanto *A. nidulans* A97a obteve a menor biomassa entre todos, 1,9 g.L⁻¹.

Figura 12 - Biomassa dos fungos em meio M2 acrescido de 0,5% de óleo de motor.



Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

Durante a filtragem das culturas não foram observados resíduos de óleo no filtro ou na biomassa úmida, indicando sua metabolização pelos fungos. O óleo de motor é um substrato complexo formado por hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de cadeia longa (C₁₅-C₅₀) (VASQUEZ-DUHALT, 1989), sendo uma das principais causas de poluição de solos e corpos d'água, incluindo águas subterrâneas e corpos hídricos superficiais (AKINTUNDE; OLUGBENGA; OLUFEMI, 2015; RAMADASS *et al.*, 2015).

Por esse motivo, microrganismos aptos a degradar poluentes recalcitrantes como o óleo de motor, são de particular interesse da biotecnologia ambiental, podendo ser aplicados em eventos de biorremediação. De modo a corroborar os dados apresentados, outros trabalhos na literatura mostraram que fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* podem utilizar o óleo de motor como única fonte de carbono para crescimento

celular (AMEEN *et al.*, 2015; HUSAINI *et al.*, 2008; SANDIAWO *et al.*, 2022).

8.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES/BIOEMULSIFICANTES PELOS FUNGOS

A produção de biossurfactantes/bioemulsificantes pelos isolados de fungos filamentosos estudados neste trabalho foi verificada a partir dos métodos de tensão superficial, dispersão do óleo diesel e emulsificação do óleo de motor, cujos resultados se encontram na Tabela 5.

8.3.1 Tensão Superficial e Dispersão do Óleo Diesel a Partir do Filtrado das Culturas de Fungos

Não houve redução da tensão superficial nas amostras em relação ao meio M2 (69,5 mN.m⁻¹) em comparação com o surfactante aniônico SDS (10 g.L⁻¹), controle positivo do experimento, o qual reduziu a tensão superficial da água para 37,7 mN.m⁻¹. De modo semelhante, nenhuma das amostras promoveu dispersão do óleo diesel enquanto o SDS formou halos de dispersão de 61,5 mm.

A medição da tensão superficial e a dispersão do óleo a partir do sobrenadante são alguns dos protocolos de detecção de biossurfactantes extracelulares mais utilizados na literatura (DA SILVA *et al.*, 2021; SATPUTE *et al.*, 2010) e um dos mais importantes a nível preliminar (TWIGG *et al.* 2021).

Segundo Mulligan (2005), moléculas com propriedades tensoativas, sintéticas ou biológicas, devem reduzir a tensão superficial da água para valores abaixo de 35 mN.m⁻¹, o que não foi observado neste trabalho para os isolados fúngicos.

Alguns exemplos de biossurfactantes com boas propriedades tensoativas são os soforolipídeos e os ramnolipídeos, produzidos, respectivamente, por leveduras (Tabela 2) e *Pseudomonas* spp., que reduzem a tensão superficial da água para valores entre 31 – 40 mN.m⁻¹ (40 – 100 mg.L⁻¹) e 24 – 35 mN.m⁻¹ (1 – 200 mg.L⁻¹), na devida ordem (ARCHANA *et al.*, 2019; BENINCASA *et al.*, 2004; MAŃKO; ZDZIENNICKA; JAŃCZUK, 2014; SALEK; EUSTON; JANEK, 2022; VAN BOGAERT *et al.*, 2007).

Tabela 5 - Resultados dos testes de tensão superficial, dispersão do óleo diesel e emulsificação do óleo de motor do filtrado das culturas de fungos em meio M2 acrescido de 0,5% de óleo de motor.

Linhagens	Tensão Superficial (mN/m ⁻¹)	Dispersão (mm)	Índice de Emulsificação	
			E5(%)	E24(%)
<i>A. flavus</i>				
A82a	69,6 ± 0,80	0	100,0 ± 0,00	93,4 ± 0,00
A85a	68,0 ± 0,65	0	100,0 ± 0,00	93,7 ± 0,02
A85b	67,5 ± 0,55	0	100,0 ± 0,00	96,5 ± 0,00
A85c	67,8 ± 0,40	0	100,0 ± 0,00	95,7 ± 0,00
<i>A. nidulans</i>				
A34	69,6 ± 0,85	0	100,0 ± 0,00	92,6 ± 0,02
A96	67,9 ± 2,05	0	100,0 ± 0,00	94,2 ± 0,00
A97a	66,5 ± 0,00	0	58,5 ± 0,04	53,4 ± 0,01
<i>A. ochraceus</i>				
A95b	68,2 ± 0,95	0	100,0 ± 0,00	93,9 ± 0,00
<i>A. sydowii</i>				
A93a	68,3 ± 0,85	0	100,0 ± 0,00	93,9 ± 0,01
<i>A. terreus</i>				
A92	68,8 ± 1,45	0	100,0 ± 0,00	94,6 ± 0,00
A97	68,1 ± 0,65	0	100,0 ± 0,00	92,9 ± 0,01
<i>A. ustus</i>				
A95a	68,5 ± 0,15	0	100,0 ± 0,00	92,1 ± 0,01
A21a	68,6 ± 0,80	0	100,0 ± 0,00	96,1 ± 0,00
<i>P. variotii</i>				
A32	66,7 ± 0,10	0	100,0 ± 0,00	90,7 ± 0,00
A33a	68,3 ± 0,45	0	100,0 ± 0,00	91,2 ± 0,00
A35	69,5 ± 0,35	0	100,0 ± 0,00	93,5 ± 0,00
A36	67,7 ± 0,45	0	100,0 ± 0,00	91,1 ± 0,01
<i>T. koningii</i>				
A31	68,0 ± 0,10	0	100,0 ± 0,00	90,8 ± 0,01
A96b	67,9 ± 0,00	0	100,0 ± 0,00	94,0 ± 0,00
Controles				
SDS (10 g.L ⁻¹)	37,7 ± 0,15	61,5 ± 0,50	58,3 ± 0,01	30,5 ± 0,10
Meio M2	69,5 ± 1,00	N/a	N/a	N/a

Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ Os dados estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

Legenda:

N/a - Não se aplica.

Outro biossurfactante de grande importância industrial é a surfactina, produzida por *B. subtilis*, que é capaz de diminuir a tensão superficial da água para 27 mN.m⁻¹ (10 – 15 mg.L⁻¹) (GEISLER *et al.*, 2019). Entretanto, os biossurfactantes mais potentes já relatados na literatura são produzidos por duas espécies de fungos filamentosos. Ishaq *et al.* (2015) descreveram o glicolípido Uzmaq-A, produzido por *Aspergillus flavus* AF612, enquanto Dos Reis *et al.* (2018) reportaram a produção de um trealolípido pelo fungo *Fusarium fujikuroi*, ambos com propriedade de reduzir a tensão superficial da água para 20 mN.m⁻¹.

Diferentemente do teste de tensão superficial, que necessita de equipamento especializado, a dispersão do óleo é um método barato, rápido e eficaz para detecção de biossurfactantes (ADETUNJI *et al.*, 2021). Excelentes resultados foram obtidos pelos BSs Uzmaq-A e Uzmaq-B, os quais produziram zonas de dispersão de 95 mm e 85 mm, respectivamente (ISHAQ *et al.*, 2015), enquanto um soforolípido produzido por *Candida* sp. produziu halos de 81 mm no óleo de motor (ARCHANA *et al.*, 2019).

De modo similar, resultados negativos nos testes de tensão superficial e dispersão do óleo podem descartar a produção de biossurfactantes pelos microrganismos testados (PANJIAR; SACHAN; SACHAN, 2015).

8.3.2 Emulsificação do Óleo de Motor pelo Filtrado das Culturas de Fungos

Ainda de acordo com a Tabela 5, todas as amostras emulsificaram o óleo de motor, apresentando elevados índices de emulsificação. Dezoito isolados exibiram índices de emulsificação E5% iguais a 100% e índices acima de 90% após 24 h (E₂₄). Os maiores índices E₂₄ foram registrados para os fungos *A. flavus* A85b (96,5%) e A85c (95,7%), *A. ustus* A21a (96,1%), *A. terreus* A92 (94,6%), *A. nidulans* A96 (94,2%) e *Trichoderma koningii* A96b (94,0%). O fungo *A. nidulans* A97a foi o único a apresentar índices de emulsificação inferiores a 90%.

Como mostram a Tabela 6 e a Figura 13, a estabilidade das emulsões após 24 h variou entre 0,91 e 0,97. Os valores mais próximos de 1,0 indicam uma maior estabilidade da emulsão,

com uma separação mais lenta das fases do sistema. Desta forma, as emulsões produzidas pelos fungos testados neste trabalho apresentaram ótima estabilidade.

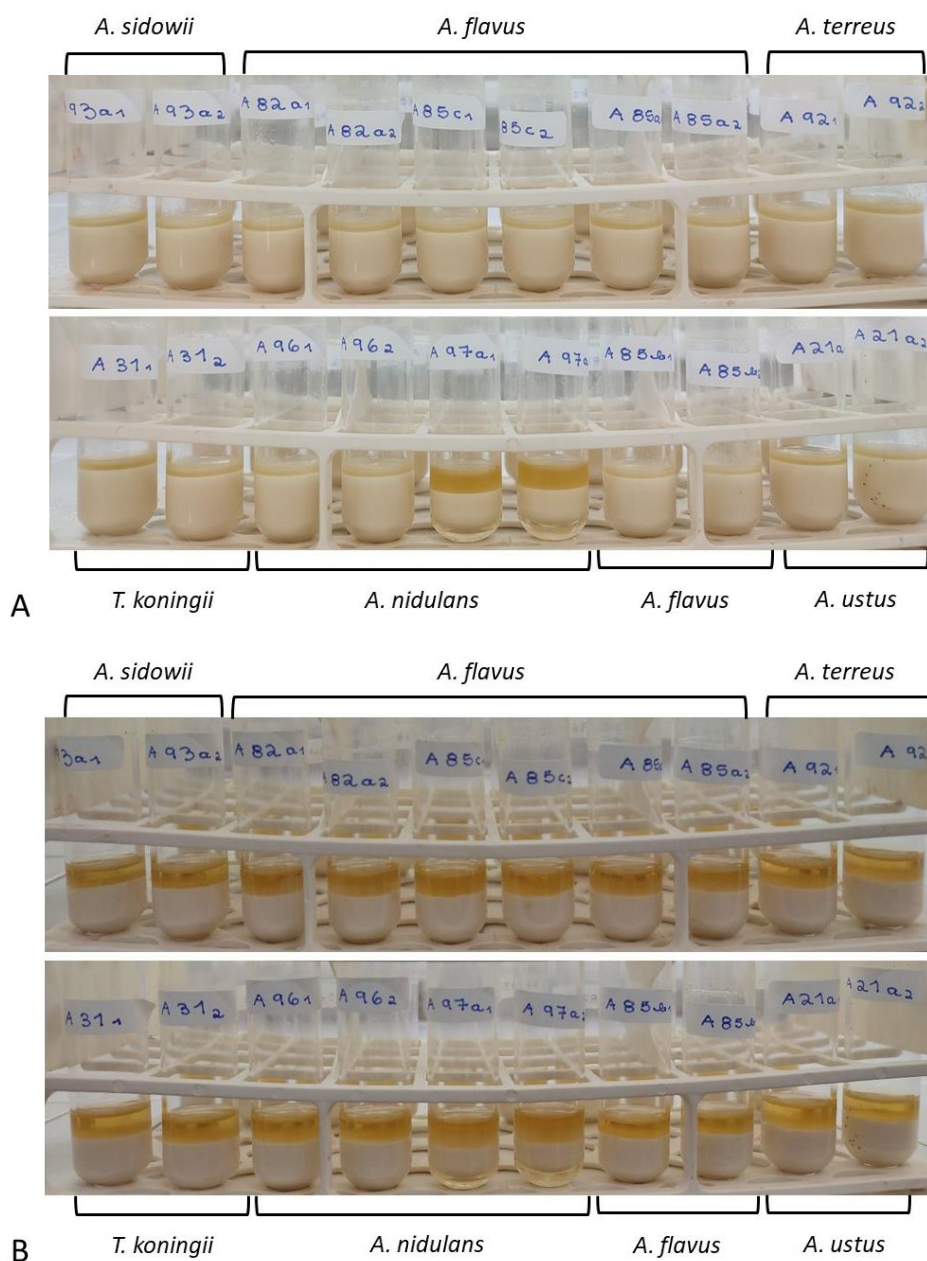
Tabela 6 - Estabilidade das emulsões de óleo de motor produzidas pelas linhagens fúngicas após 24 h e 90 dias.

Linhagens	Estabilidade	
	24 h	90 dias
<i>A. flavus</i>		
A82a	0,93	0,74
A85a	0,94	0,73
A85b	0,97	0,77
A85c	0,96	0,76
<i>A. nidulans</i>		
A34	0,93	0,72
A96	0,94	0,72
A97a	0,91	0,52
<i>A. ochraceus</i>		
A95b	0,94	0,78
<i>A. sydowii</i>		
A93a	0,94	0,77
<i>A. terreus</i>		
A92	0,95	0,75
A97	0,93	0,77
<i>A. ustus</i>		
A95a	0,92	0,74
A21a	0,96	0,72
<i>P. variotii</i>		
A32	0,91	0,77
A33a	0,91	0,76
A35	0,94	0,74
A36	0,91	0,75
<i>T. koningii</i>		
A31	0,91	0,72
A96b	0,94	0,75

Fonte: Autoria própria (2022).

Após 90 dias, a estabilidade das emulsões diminuiu, em média, 18%, exibindo valores superiores a 0,70 para dezoito isolados, enquanto *A. nidulans* A97a apresentou o menor valor (0,52).

Figura 13 – Emulsões de óleo de motor produzidas pelos isolados fúngicos observadas após 24 h (A) e 90 dias (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ As fotos foram tiradas após 24 h (A) e 90 dias (B) de repouso.

O índice de emulsificação E_{24} , juntamente com os valores de estabilidade são os dados mais importantes para aplicação de um surfactante com propriedades emulsificantes em processos ambientais e industriais. Segundo Willumsen e Karlson (1996), um bom emulsificante microbiano deve apresentar índice de emulsificação igual ou superior a 50% e estabilidade maior ou igual a 0,50. Neste trabalho, os bioemulsificantes produzidos pelos isolados fúngicos apresentaram índices de emulsificação e estabilidades superiores a esses valores.

Desta forma, em virtude dos resultados negativos nos testes de tensão superficial e dispersão do óleo diesel e com base nos excelentes índices de emulsificação obtidos pelos fungos, pôde-se constatar que os dezenove isolados produziram bioemulsificantes extracelulares em meio M2 com adição de óleo de motor. Apesar de alguns biossurfactantes também possuírem atividade emulsificante, essa propriedade deve vir acompanhada de redução da tensão superficial e atividade dispersante.

Outros trabalhos utilizaram o teste de emulsificação do óleo de motor para detecção de bioemulsificantes secretados por fungos filamentosos no sobrenadante das culturas. Marques *et al.* (2020) reportaram uma linhagem de *Mucor circinelloides* capaz de emulsificar o óleo de motor (E_{24}), sob condições variadas de cultivo, entre 80% e 90%, enquanto uma linhagem de *M. hiemalis* estudada por Ferreira *et al.* (2020) exibiu um índice de emulsificação de 98%.

De modo similar, trabalhos envolvendo bactérias produtoras de bioemulsificantes também apresentaram altos índices de emulsificação do óleo de motor. Obayori *et al.* (2009) registraram índices E_{24} de 80,25% para uma linhagem de *Pseudomonas* sp., ao passo que Camacho-Chab *et al.* (2013) obtiveram taxas de 96,3% para *Microbacterium* sp.

Outros trabalhos, no entanto, relataram a produção de biossurfactantes por bactérias e fungos filamentosos com ambas as propriedades tensoativas e emulsificantes. Algumas linhagens de *Pseudomonas* spp. e uma de *Bacillus* sp. isoladas por Viramontes-Ramos *et al.* (2010) exibiram índices E_{24} superiores a 80% para o óleo de motor, à medida que, também reduziram a tensão superficial.

Diferentes linhagens de *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. reduziram a tensão superficial (27 – 35 mN.m⁻¹) e apresentaram índices de emulsificação do óleo de motor entre 55,2% e 96% (CANDIDO *et al.*, 2022; FERREIRA *et al.*, 2020; PELE *et al.*, 2018). A linhagem de *M. hiemalis* estudada por Ferreira *et al.* (2020) produziu os dois tipos de biomoléculas. Sob agitação, produziu um biossurfactante e sem agitação, um bioemulsificante, citado anteriormente.

No presente trabalho, a produção de bioemulsificantes pelos isolados de fungos filamentosos se deu em cultivo estático, sendo interessante, portanto, a investigação de outros parâmetros de cultivo, como agitação e diferentes fontes de carbono, de modo a avaliar seu impacto na produção e nas propriedades das biomoléculas produzidas.

Em virtude dos dados apresentados, verifica-se que os índices de emulsificação do óleo de motor encontrados neste trabalho para as linhagens de *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* se mostraram superiores aos achados por Camacho-Chab *et al.* (2013), Candido *et al.* (2022), Marques *et al.* (2020), Obayori *et al.* (2009), Pele *et al.* (2018) e outros estudos encontrados na literatura, tanto para bioemulsificantes como para biossurfactantes.

Os isolados *A. flavus* A85b, *T. koningii* A96b e *P. variotii* A35 foram os representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Paecilomyces*, respectivamente, que apresentaram os maiores índices de emulsificação do óleo de motor, colocando-os como microrganismos promissores para ensaios e aplicações futuras. Ademais, este foi o primeiro estudo a identificar a produção de bioemulsificantes pelos gêneros *Trichoderma* e *Paecilomyces*.

8.4 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTES POR *Aspergillus flavus* 85b E *Trichoderma koningii* 96b

Com base nos dados da emulsificação do óleo de motor e estabilidade das emulsões, os isolados *Aspergillus flavus* 85b e *Trichoderma koningii* 96b foram escolhidos para os ensaios de recuperação e caracterização dos bioemulsificantes.

8.4.1 Biomassa dos Isolados em Diferentes Condições de Cultivo

Como forma de avaliar as melhores condições de cultivo de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b para produção de bioemulsificantes, as variáveis de pH e concentração do óleo de motor foram analisadas em relação à biomassa (Tabela 7).

Verifica-se que as duas variáveis exerceram influência sobre a biomassa dos isolados em meio M2, em que o crescimento máximo foi alcançado na condição de pH 7 e 2% de óleo de motor, com biomassa seca de 16,44 g.L⁻¹ para *A. flavus* 85b e 15,92 g.L⁻¹ para *T. koningii* 96b.

Contudo, o efeito apresentado pela concentração do óleo de motor foi muito mais decisivo para o acúmulo de biomassa pelos fungos, como observado na Figura 14. Nota-se que o rendimento da biomassa se deu de maneira proporcional ao aumento da concentração do óleo

de motor em pH 7 ($p < 0,05$), atingindo seu maior valor no meio com 5% de óleo, onde *A. flavus* 85b obteve $34,72 \text{ g.L}^{-1}$ e *T. koningii* 96b, $27,68 \text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 7 – Efeitos do pH e da concentração do óleo de motor na biomassa (g.L^{-1}) de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b no meio M2 com 1% e 2% de óleo de motor.

pH	1% de Óleo		2% de Óleo	
	<i>A. flavus</i> 85b	<i>T. koningii</i> 96b	<i>A. flavus</i> 85b	<i>T. koningii</i> 96b
5	$7,93 \pm 0,39$	$8,17 \pm 0,30$	$14,67 \pm 1,42$	$13,72 \pm 0,49$
6	$8,15 \pm 0,04$	$8,48 \pm 0,09$	$14,55 \pm 0,15$	$12,45 \pm 1,29$
7	$9,01 \pm 0,22$	$9,11 \pm 0,04$	$16,44 \pm 0,45$	$15,92 \pm 0,40$

Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ Os dados estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

Apesar disso, no momento da filtração das culturas, observou-se um excedente de óleo não metabolizado pelos fungos na condição de 5%, e por esse motivo, escolheu-se a porcentagem de 2% para o ensaio de rendimento dos extratos de bioemulsificantes, discutido posteriormente.

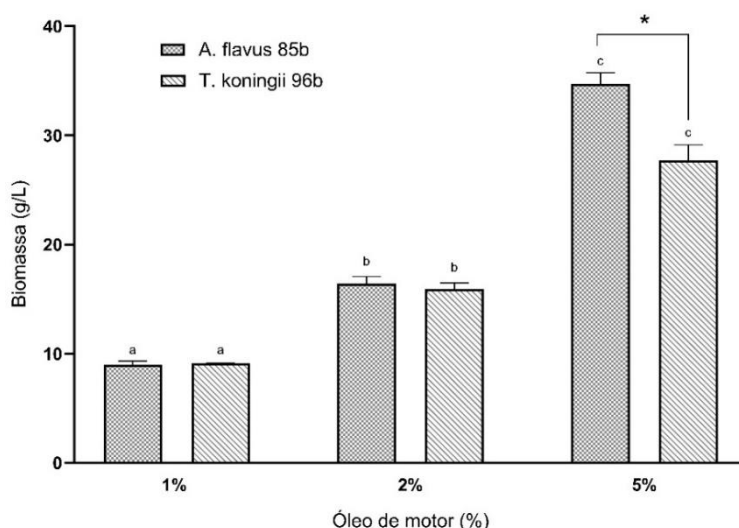
Fungos filamentosos podem se desenvolver em um amplo espectro de pHs (CORNET; GAILLARDIN, 2014; VYLKOVA, 2017), como observado neste trabalho para os isolados *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b, que cresceram nos pHs testados, apresentando maior biomassa em pH 7. O melhor crescimento nesse pH pode estar relacionado ao pH neutro do solo do qual as linhagens de fungos foram isoladas (MARQUES, 2004).

Poucos trabalhos utilizaram concentrações de óleo para produção de biossurfactantes e bioemulsificantes superiores a 1% (v/v). Ameen *et al.* (2015) demonstraram que fungos filamentosos possuem alta tolerância a hidrocarbonetos de petróleo, obtendo valores de biomassa de $10,3 \text{ g.L}^{-1}$ em meio mineral com 10% de óleo de motor e pH 5,5, no decorrer de quatro semanas de cultivo. Os fungos estudados por Asemoloye *et al.* (2020), por sua vez, cresceram em meio mineral suplementado com até 20% de óleo de motor.

Além de servir como indutor da produção de bioemulsificantes neste trabalho, a metabolização do óleo de motor pelos isolados de *A. flavus* e *T. koningii*, convertida em ganho

de biomassa, também demonstra potencial de utilização desses organismos em eventos de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo no ambiente.

Figura 14 – Efeito de diferentes concentrações de óleo de motor na biomassa (g.L^{-1}) de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b no meio M2.



Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

(1) As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

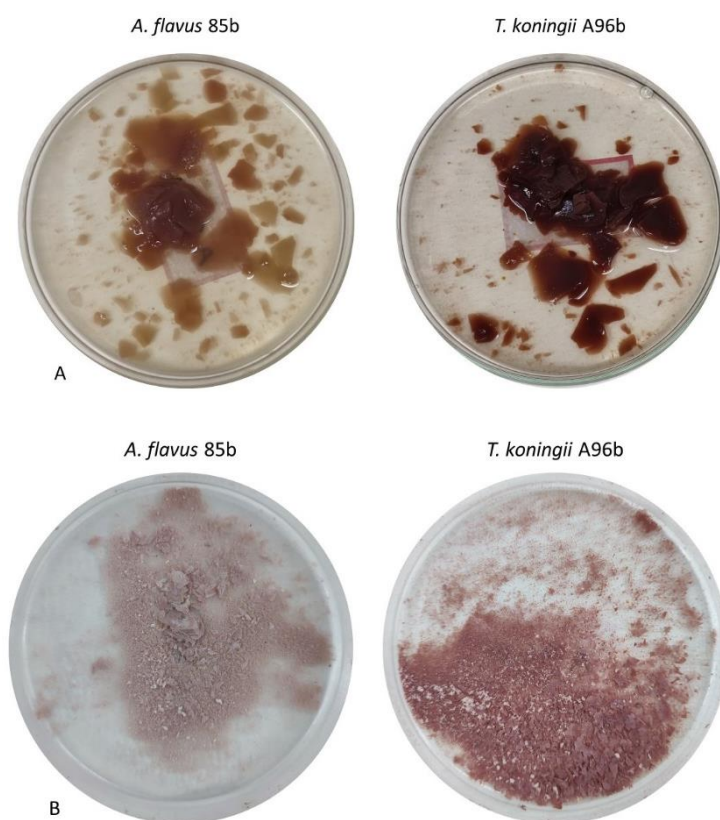
(2) Letras diferentes e o asterisco (*) representam significância ($p < 0,05$).

8.4.2 Rendimento dos Extratos de Bioemulsificantes

A produção de bioemulsificantes em meio M2 com pH 7 e 2% de óleo de motor registrou rendimentos de $1,86 \text{ g.L}^{-1}$ para *A. flavus* 85b e $2,14 \text{ g.L}^{-1}$ para *T. koningii* 96b. Com relação à extração dos bioemulsificantes, a precipitação com etanol se mostrou um método simples e já foi utilizada com sucesso por outros autores.

Os trabalhos de Phetrong, H-kittikun e Maneerat (2008) e Marques *et al.* (2020) obtiveram rendimentos de $2,94 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,69 \text{ g.L}^{-1}$ para BEs produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7 e *Mucor circinelloides* UCP0001, respectivamente, ao passo que Bhaumik *et al.* (2020) registraram um rendimento de 726 mg.L^{-1} para levedura *Meyerozyma caribbica*. Na Figura 15 são observados os extratos de BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b antes e após liofilização.

Figura 15 – Extratos de bioemulsificantes das culturas de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b extraídos com precipitação etanólica, antes (A) e após liofilização (B).



Fonte: Autoria própria (2022).

8.4.3 Emulsificação de Diferentes Substratos pelos Extratos de Bioemulsificantes

A habilidade de emulsificar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos puros (*n*-hexano, tolueno e xileno), misturas (óleos cru, de motor, diesel e querosene) e óleos vegetais (azeite e óleo de soja) foi investigada a partir de soluções de 2 g.L⁻¹ dos extratos de bioemulsificantes de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b, com base nos rendimentos obtidos na seção anterior, e os resultados se encontram na Tabela 8.

A princípio, observa-se que os índices de emulsificação do óleo de motor e a estabilidade das emulsões formadas pelos extratos de BEs foram semelhantes aos obtidos a partir do filtrado livre de células (Tabela 4), comprovando a eficiência da precipitação com etanol 96% para extração dos BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b.

Tabela 8 – Índices de emulsificação de diferentes substratos hidrofóbicos e estabilidade das emulsões formadas por extratos de bioemulsificantes produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b.

Linhagens	Índice de emulsificação		Estabilidade
	E5(%)	E24(%)	
Óleo cru			
A. flavus 85b	78,7 ± 2,43	62,1 ± 3,09	0,79
T. koningii 96b	66,8 ± 1,24	60,5 ± 0,93	0,90
Óleo de motor			
A. flavus 85b	100,0 ± 0,00	92,8 ± 0,40	0,92
T. koningii 96b	100,0 ± 0,00	93,9 ± 0,05	0,93
Óleo diesel			
A. flavus 85b	62,9 ± 2,09	50,2 ± 0,10	0,79
T. koningii 96b	62,8 ± 0,87	7,46 ± 1,74	0,11
Querosene			
A. flavus 85b	0,0	0,0	0
T. koningii 96b	0,0	0,0	0
Xileno			
A. flavus 85b	57,2 ± 0,85	5,23 ± 0,35	0,09
T. koningii 96b	35,0 ± 0,56	6,77 ± 1,68	0,19
Tolueno			
A. flavus 85b	58,1 ± 3,08	40,4 ± 0,68	0,69
T. koningii 96b	36,6 ± 1,66	11,0 ± 2,63	0,30
n-Hexano			
A. flavus 85b	50,5 ± 6,54	24,2 ± 6,01	0,48
T. koningii 96b	46,2 ± 0,03	9,13 ± 0,88	0,19
Azeite			
A. flavus 85b	31,3 ± 0,36	30,96 ± 0,10	0,98
T. koningii 96b	30,31 ± 0,64	29,17 ± 0,97	0,96
Óleo de soja			
A. flavus 85b	37,8 ± 2,41	34,59 ± 1,86	0,91
T. koningii 96b	44,0 ± 0,86	40,4 ± 0,00	0,91

Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

(1) Os dados estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

O óleo cru também foi emulsionado de forma eficiente pelos dois extratos, atingindo índices de 62,1% para *A. flavus* 85b e 60,5% para *T. koningii* 96b. O óleo diesel, por sua vez, foi emulsificado eficientemente apenas pelo BE de *A. flavus* 85b (50,2%), enquanto nenhum formou emulsões com o querosene. Entre os hidrocarbonetos aromáticos, o tolueno foi melhor emulsificado que o xileno, enquanto o *n*-hexano formou emulsões mais estáveis com o BE de *A. flavus* 85b (0,69).

Ademais, ambos os extratos formaram emulsões estáveis com os óleos vegetais testados ($> 0,90$), embora nenhum dos índices E_{24} tenha atingido 50%. Destes, o melhor resultado foi apresentado pelo BE produzido por *T. koningii* 96b, que emulsificou o óleo de soja em 40,4% (E_{24}).

Comparou-se, também, os índices de emulsificação do óleo de motor e a estabilidade das emulsões formadas entre os extratos de BEs e os surfactantes sintéticos SDS, CTAB e Tween 80, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 9 e nas Figuras 16 e 17.

Tabela 9 – Índices de emulsificação do óleo de motor e estabilidade das emulsões formadas pelos extratos de bioemulsificantes dos fungos *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b e pelos surfactantes sintéticos SDS, CTAB e Tween 80.

Parâmetros	<i>A. flavus</i> 85b	<i>T. koningii</i> 96b	SDS	CTAB	Tween 80
E5(%)	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00	58,3 $\pm$ 1,27	100 $\pm$ 0,00	100 $\pm$ 0,00
E24(%)	93,4 $\pm$ 0,26	91,5 $\pm$ 2,07	30,51 $\pm$ 9,83	39,4 $\pm$ 5,85	0
Estabilidade	0,93	0,91	0,52	0,39	0

Fonte: Autoria própria (2022).

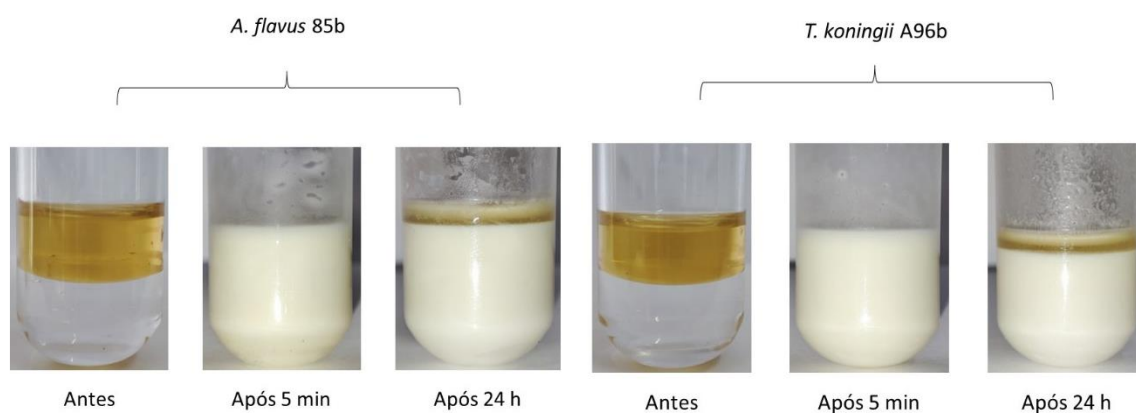
Notas:

⁽¹⁾ Os índices de emulsificação estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

⁽²⁾ Utilizou-se a concentração de 10 g.L⁻¹ para o SDS e o CTAB.

Como esperado, os BEs formaram emulsões estáveis no decorrer de 24 h (Figura 16), o que não aconteceu com o CTAB e o Tween 80, que emulsionaram o óleo de motor em 100% (E_5), mas não estabilizaram as emulsões de forma adequada, o que levou à completa separação das fases no caso do Tween 80 (Figura 17). O SDS também não demonstrou um bom índice de emulsificação, mas dentre os surfactantes sintéticos testados, foi o que melhor estabilizou as emulsões (0,52).

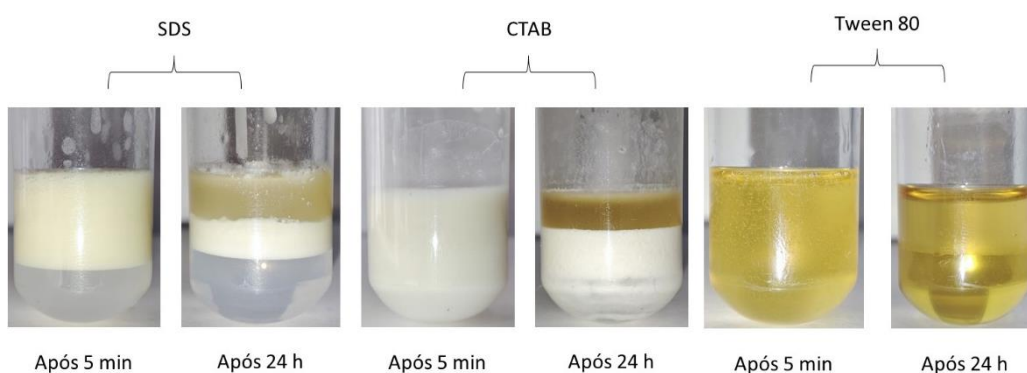
Figura 16 – Emulsões de óleo de motor formadas pelos extratos de bioemulsificantes dos fungos *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b.



Fonte: Autoria própria (2022).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8, os BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b emulsionaram eficientemente os óleos cru e de motor, mas não os hidrocarbonetos puros. Uma vez que os óleos cru (petróleo bruto) e de motor possuem cadeias de alto peso molecular, diferente do querosene (C_{16} - C_{20}) (SCHOBERT, 2013; SPEIGHT, 2014), observou-se que os BEs testados foram mais eficientes na emulsificação de misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa. Esses resultados foram similares aos encontrados por Shavandi *et al.* (2011) e Abu-Ruwaida *et al.* (1991).

Figura 17 – Emulsões de óleo de motor formadas pelos surfactantes SDS, CTAB e Tween 80.



Fonte: Autoria própria (2022).

Ademais, o BE de *A. flavus* 85b demonstrou uma maior versatilidade ao emulsionar eficientemente o óleo diesel (C_9 - C_{16}) e a formar emulsões estáveis com o tolueno (C_7H_8). Esses

resultados podem ser explicados pelo fato de a maioria dos BEs e BSs emulsionarem preferencialmente um subconjunto de substratos hidrofóbicos a despeito de outros e isso se deve à grande diversidade estrutural de suas moléculas, que possuem grupos funcionais com afinidade por substratos específicos (LUNA-VELASCO *et al.*, 2007; TAO *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2021).

Essa particularidade dos BEs e BSs é de fundamental importância para sua aplicação em processos industriais, visto que estes requerem catalisadores químicos específicos para funções também específicas. O emulsan, produzido por *A. calcoaceticus* RAG⁻¹, é um exemplo de BE substrato-dependente utilizado na indústria e que só emulsiona eficientemente misturas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em proporções equivalentes, mas não suas formas puras (ROSENBERG *et al.*, 1979).

De modo similar, outro tipo de emulsan, quimicamente distinto do primeiro e produzido por *A. calcoaceticus* BD4, também necessita de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos para emulsificação, além da presença do íon Mg²⁺ (KAPLAN; ROSENBERG, 1982). O alasan, por sua vez, produzido por *A. radioresistens* KA53, emulsiona de forma efetiva hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos puros e de alto peso molecular, mas não seus homólogos de cadeia curta (NAVON- VENEZIA *et al.*, 1995).

Alguns BEs, no entanto, conseguem emulsionar um espectro maior de hidrocarbonetos. Cai *et al.* (2017) estudaram um BE produzido por *Exiguobacterium* sp. N41P capaz de emulsionar compostos alifáticos e aromáticos (> 60%) e misturas de hidrocarbonetos, em especial o óleo mineral (70%), enquanto emulsões estáveis de querosene, óleo diesel e xileno (> 60%) foram obtidas por BEs produzidos por *Penicillium* sp., *Lysinibacillus* sp. SP1025 e *Bacillus cereus* SP1035 (LUNA-VELASCO *et al.*, 2007; PANJIAR; SACHAN; SACHAN, 2015).

Em vista dos fatos mencionados, a eficiência dos BEs de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b na emulsificação dos óleos cru e de motor sugere uma potencial aplicação na indústria de petróleo e em eventos de biorremediação, enquanto a excelente estabilização das emulsões de azeite e óleo de soja pode ser aproveitada nas indústrias de alimentos e cosméticos como agentes estabilizantes.

Por fim, faz-se necessária a realização de testes de emulsificação com um número maior de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e óleos vegetais para assim traçar um perfil mais completo dos bioemulsificantes estudados neste trabalho.

8.4.4 Emulsificação do Óleo de Motor pelos Extratos de Bioemulsificantes

O óleo de motor exibiu as maiores taxas de emulsificação pelos bioemulsificantes de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b e por esse motivo foi escolhido para os testes de concentração emulsificante mínima e estabilidade frente a condições extremas de salinidade e temperatura.

8.4.4.1 Efeito da concentração dos extratos de bioemulsificantes

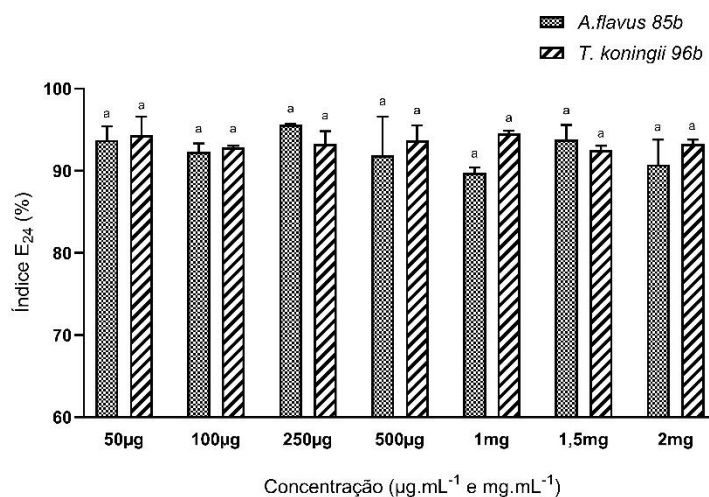
A estabilidade de uma emulsão depende de muitos fatores, inclusive da concentração de BE utilizada. Por isso, avaliou-se a influência da concentração dos extratos de BEs na emulsificação do óleo de motor, com o intuito de determinar uma concentração emulsificante mínima, mas de acordo com a Figura 18, todas as concentrações testadas ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ – 2 mg.mL^{-1}) promoveram elevados índices E24%, sem diferença significativa ($p > 0,05$), variando de 89,7% (1 mg.mL^{-1}) a 95,6% ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para *A. flavus* 85b e de 92,5% ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) a 94,5% (1 mg.mL^{-1}) para *T. koningii* 96b.

Avaliou-se, também, a estabilidade das emulsões de óleo de motor formadas a partir das diferentes concentrações dos extratos, cujos resultados se encontram na Figura 19. Verificou-se que a estabilidade variou de 0,89 (1 mg.mL^{-1}) a 0,95 ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para *A. flavus* 85b e de 0,92 ($1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) a 0,94 (1 mg.mL^{-1}) para *T. koningii* 96b, também sem diferença significativa ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados nas Figuras 18 e 19 demonstraram a efetividade dos BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b na emulsificação de dois substratos imiscíveis, óleo de motor e água, mesmo na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ (50 mg.L^{-1}). Em comparação, os surfactantes SDS e CTAB, na concentração de 10 g.L^{-1} , foram pouco efetivos na emulsificação dos mesmos substratos (Tabela 9; Figura 17).

Tais resultados são equiparáveis aos emulsans RAG⁻¹ e BD4, que também promovem emulsões estáveis na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ (KAPLAN; ROSENBERG, 1982; ROSENBERG *et al.*, 1979). De modo similar, o trabalho de Tao *et al.* (2019) testou a atividade emulsionante de diferentes concentrações do BE produzido por *B. subtilis* CICC 20034, cujos melhores resultados, para a maioria dos substratos testados, foram obtidos na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$, embora este não tenha emulsificado eficientemente o óleo de motor (19,05%).

Figura 18 – Emulsificação do óleo de motor (E₂₄) por diferentes concentrações dos extratos de BE produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b.



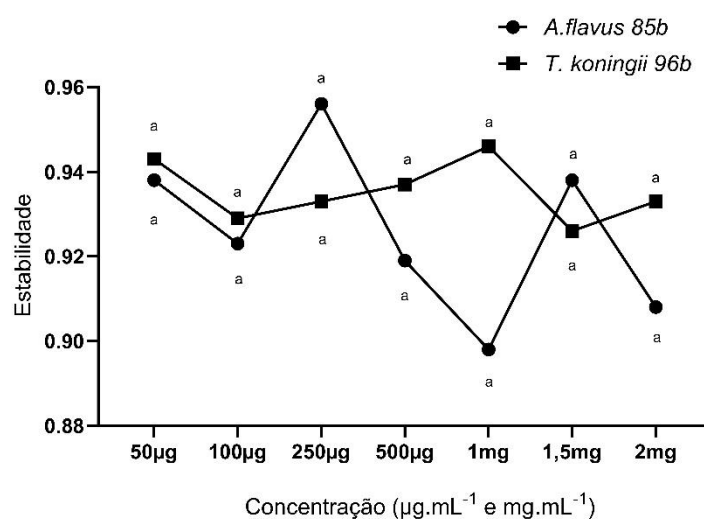
Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

(¹) Os dados estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

(²) Letras diferentes representam significância ($p < 0,05$).

Figura 19 – Estabilidade das emulsões de óleo de motor formadas mediante diferentes concentrações dos extratos de BE de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b



Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

(¹) Letras diferentes representam significância ($p < 0,05$).

Cai *et al.* (2017), por outro lado, investigaram a concentração mínima necessária à emulsificação do óleo diesel pelo BE de *Exiguobacterium* sp. N41P e constataram uma diferença considerável entre a concentração de extrato bruto (15 g.L⁻¹) e a de extrato semipurificado (3 g.L⁻¹) requeridas. Assim, faz-se necessário, em estudos posteriores, a avaliação de concentrações menores que 50 µg/mL, bem como a purificação dos extratos de BE de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b, de modo a determinar a concentração emulsificante mínima desses compostos.

8.4.4.2 Efeitos da salinidade e temperatura na atividade dos bioemulsificantes

Como forma de avaliar os efeitos da salinidade e temperatura na emulsificação do óleo de motor pelos extratos de BEs, soluções de 500 mg.L⁻¹ foram suplementadas com diferentes concentrações de NaCl (1-30%) ou submetidas a um ciclo de autoclavação (121 °C por 15 min). Os resultados se encontram nas Figuras 20 e 21.

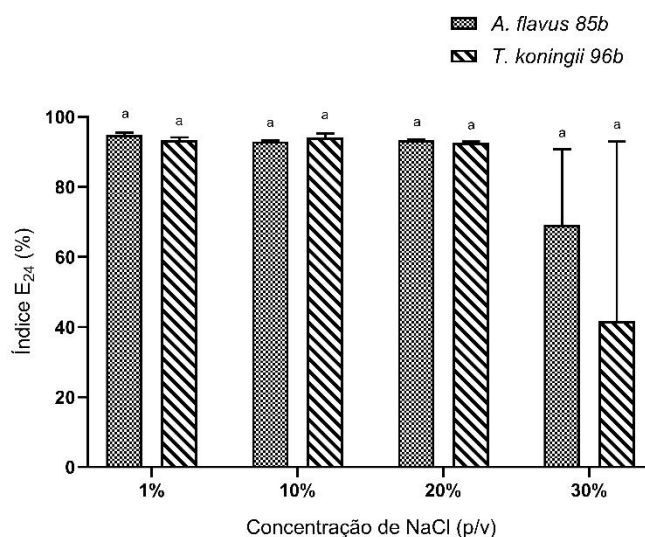
Constatou-se que as concentrações de 1 – 20% de NaCl não afetaram a atividade dos BEs, pois formaram emulsões estáveis, variando entre 93% (10%) e 94,8% (1%) no caso de *A. flavus* 85b e de 92,6% (20%) a 94,1% (10%) para o isolado *T. koningii* 96b, não apresentando diferenças significantes entre os isolados testados ($p > 0,05$). Também não foram observadas diferenças significantes ($p > 0,05$) em relação aos índices E₂₄ obtidos com o filtrado livre de células e com as concentrações utilizadas na seção 8.4.3 para esse mesmo óleo.

Entretanto, na concentração de 30% de NaCl foram registrados os menores índices E₂₄ do óleo de motor, com 69,2% para *A. flavus* 85b e 41,6% para *T. koningii* 96b, além de instabilidade na atividade dos BEs, o que se refletiu nos altos valores de desvio padrão nesse grupo e ausência de diferenças significantes ($p > 0,05$).

Em relação ao tratamento térmico, verificou-se que a temperatura de 121 °C não interferiu na capacidade de emulsificação dos extratos de BEs, com as duas amostras exibindo índices de emulsificação superiores a 92% (Figura 21).

Esses resultados mostram que os BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b são resistentes a condições de elevado estresse salino e térmico, enquanto a maioria dos surfactantes sintéticos como SDS, Triton X⁻¹⁰⁰ e Tween perdem sua atividade em concentrações de NaCl superiores a 10 – 12% (GUDIÑA *et al.*, 2015).

Figura 20 – Emulsificação do óleo de motor (E₂₄) pelos extratos de BE produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b em diferentes concentrações de NaCl.



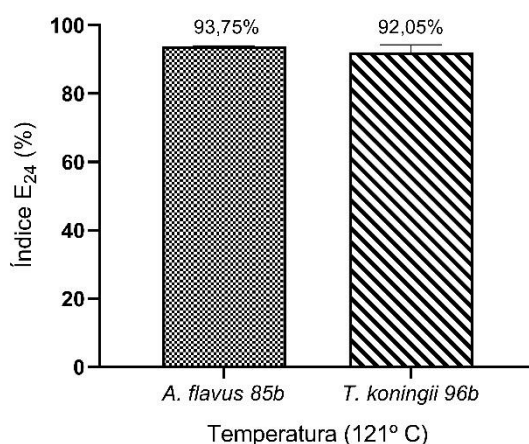
Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ Os dados estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

⁽²⁾ Letras diferentes representam significância ($p < 0,05$).

Figura 21 – Emulsificação do óleo de motor (E₂₄) pelos extratos de BE produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b, submetidos a um ciclo de autoclavação (121 °C) por 15 min.



Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

⁽¹⁾ Os dados estão expressos como média aritmética e desvio padrão.

Os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes ou superiores aos de outros estudos que também avaliaram a estabilidade de emulsões de óleo de motor em diferentes

concentrações de sal. Andrade-Silva *et al.* (2014), Camacho-Chab *et al.* (2013) e Marques *et al.* (2020) relataram um declínio da atividade emulsificante dos BEs estudados em concentrações de NaCl superiores a 10%, enquanto os BE de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b permaneceram estáveis nas concentrações de 1% a 20% de NaCl (Figura 20).

Marques *et al.* (2020) também relataram um declínio na atividade do BE de *M. circinelloides* UCP0001 na concentração de 30% de NaCl, que foi marcada por uma redução de 38% na capacidade de emulsionar o óleo de motor. Neste trabalho, a concentração de 30% de NaCl foi bem tolerada pelo BE de *A. flavus* 85b, que atingiu índice E_{24} próximo de 70%.

Outros trabalhos apresentaram BEs estáveis em condições salinas de até 25%, como Cai *et al.* (2017) e Luna-Velasco *et al.* (2007), enquanto o BE de Alcantara *et al.* (2013) e o BS de Ali *et al.* (2021) apresentaram estabilidade em concentrações de até 10% de NaCl. Já os BEs estudados por Adetunji e Olaniran (2019), Ilori, Amobi e Odocha (2005), Shavandi *et al.* (2011) e De Sousa e Bhosle (2012) foram inibidos por concentrações superiores a 5-10%.

Com relação à estabilidade térmica, os índices E_{24} exibidos pelos BEs de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b foram ligeiramente menores que os de Marques *et al.* (2020), que obteve 95,2%, mas notavelmente maiores que aqueles citados nos trabalhos mencionados anteriormente.

Esses resultados sugerem que os bioemulsificantes produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b podem ser aplicados em ambientes salinos para recuperação de óleo melhorada por microrganismos, limpeza de reservatórios de petróleo e eventos de biorremediação, assim como nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos, que empregam altas temperaturas para esterilização dos produtos (CAMACHO-CHAB *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2010).

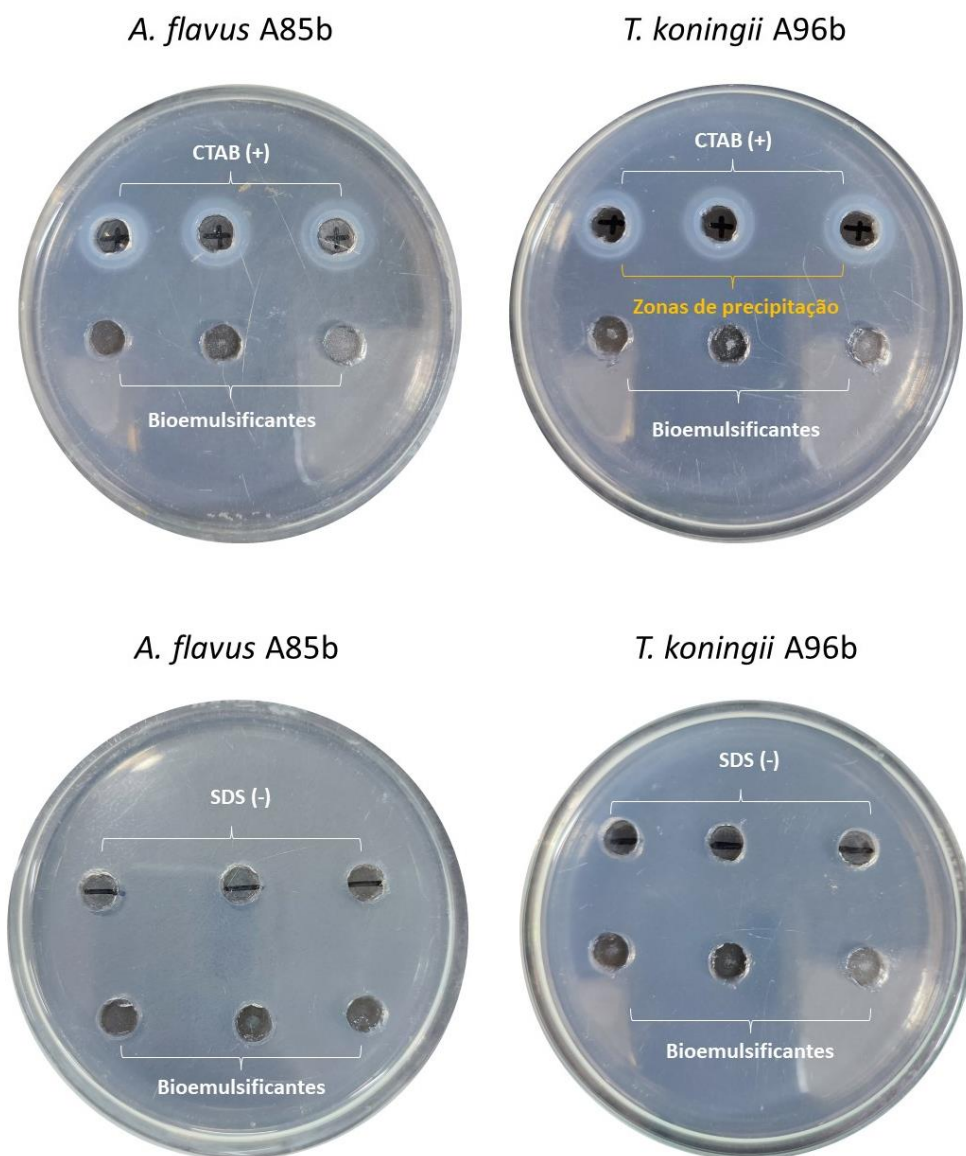
8.5 DETERMINAÇÃO DA CARGA IÔNICA DOS BIOEMULSIFICANTES DE *A. flavus* 85b E *T. koningii* 96b

O resultado do teste de difusão dupla em ágar evidenciou a natureza aniônica dos bioemulsificantes de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b, uma vez que, após 24 h, observou-se zonas de precipitação decorrentes do encontro entre os BEs e o tensoativo catiônico CTAB (Figura 22). Em contrapartida, não foram observados halos de precipitação ao redor dos poços contendo o surfactante aniônico SDS, confirmando, assim, a carga negativa dos BEs.

O teste de difusão dupla em ágar, proposto por Meylheuc, Oss e Bellon-Fontaine (2001) é amplamente utilizado na literatura para determinação da carga iônica de BEs e BSs. O caráter

aniônico dos BEs de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b é consistente com o fato de que a maioria dos BEs e BSs microbianos é aniônica ou neutra (MULLIGAN, 2005; IBRAHIM, 2018; RUFINO *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2019; SATPUTE *et al.*, 2019).

Figura 22 – Teste de difusão dupla em ágar para determinação da carga iônica dos bioemulsificantes produzidos por de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b.



Fonte: Autoria própria (2022).

8.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BIOEMULSIFICANTES DE *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b

8.6.1 Compostos Detectados pela Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A presença de lipídeos, proteínas e carboidratos nos extratos de bioemulsificantes dos fungos *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b foi detectada de modo qualitativo pela cromatografia em camada delgada (CCD), conforme Figuras 23 e 24.

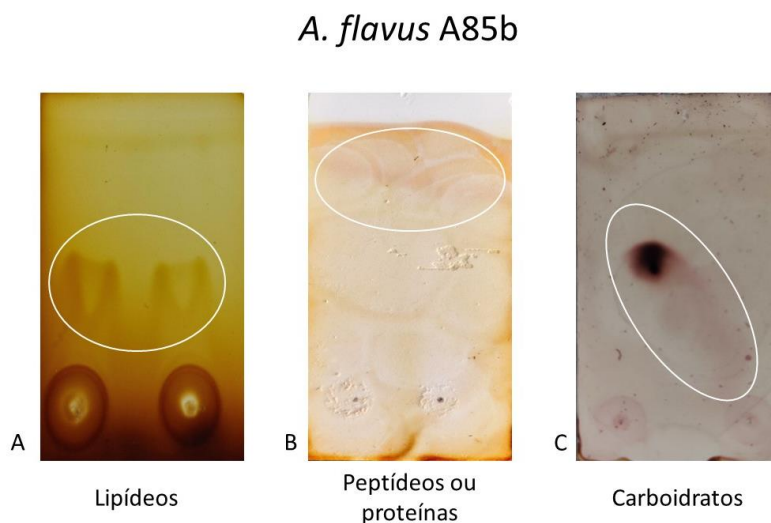
A exposição das placas de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b aos vapores de iodo promoveu a formação de manchas marrons amareladas decorrentes da formação de complexos entre o iodo e os ácidos graxos presentes, indicando a presença de lipídeos, como mostram as Figuras 23A e 24A.

Após revelação com ninidrina, ambas as placas exibiram zonas de coloração rósea, como destacado nas Figuras 23B e 24B, sugerindo que os BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b podem conter uma fração peptídica ou proteica.

Por fim, a revelação das placas com orcinol permitiu a visualização de manchas de coloração púrpura intensa indicando a presença de carboidratos nas amostras, conforme as Figuras 23C e 24C.

A CCD é uma técnica simples e rápida de separação e análise qualitativa de compostos presentes em uma amostra, sendo amplamente utilizada na caracterização química qualitativa de bioemulsificantes e biossurfactantes. Ebrahimipour *et al.* (2014) detectaram a presença de carboidratos e ácidos graxos em amostras de um BE produzido por *Planococcus* sp. De modo similar, Derguine-Mecheri *et al.* (2018) identificaram a presença de carboidratos e lipídeos no extrato bruto do BE produzido pela levedura *Cryptococcus* sp.

Figura 23 – Compostos detectados no extrato do bioemulsificante produzido por *A. flavus* 85b pela cromatografia em camada delgada.

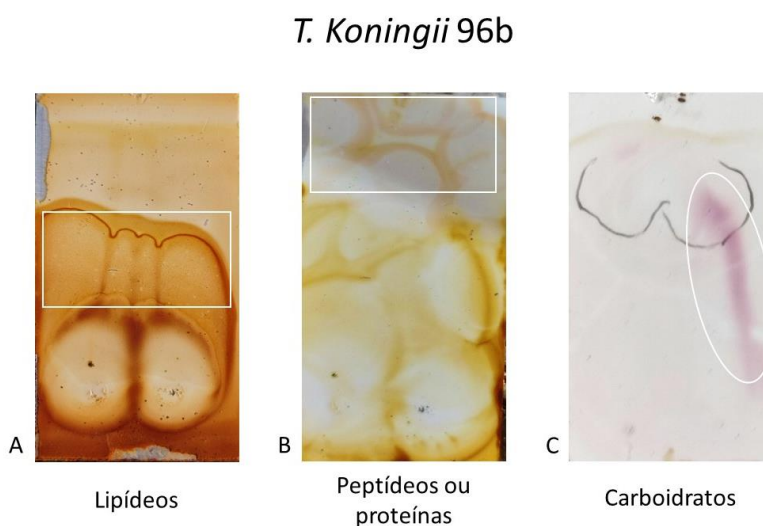


Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

- (1) Os compostos detectados estão destacados nas imagens.
- (2) A – Teste com iodo; B – Teste com ninidrina; C – Teste com orcinol.

Figura 24 – Compostos detectados no extrato do bioemulsificante produzido por *T. koningii* 96b pela cromatografia em camada delgada.



Fonte: Autoria própria (2022).

Notas:

- (1) Os compostos detectados estão destacados nas imagens.
- (2) A – Teste com iodo; B – Teste com ninidrina; C – Teste com orcinol.

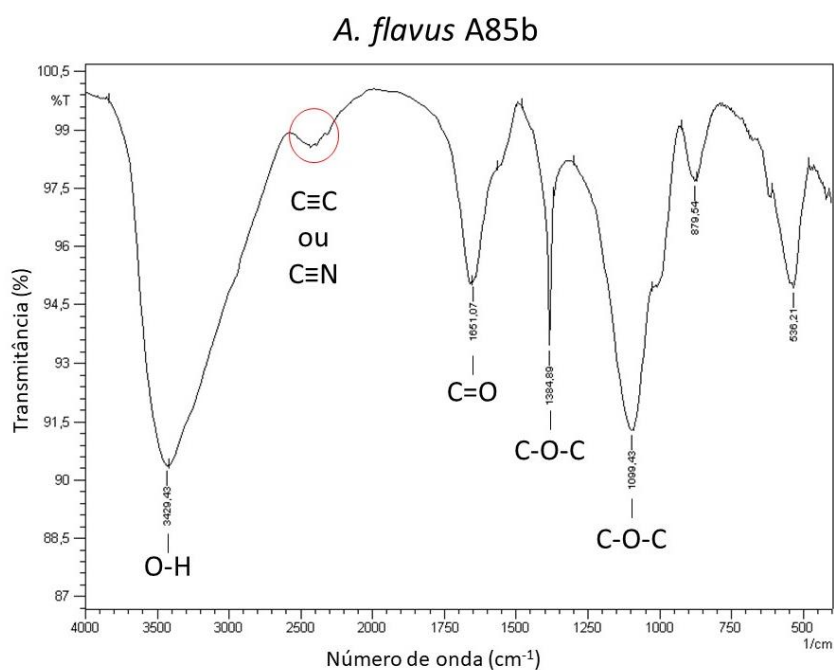
8.6.2 Funções orgânicas detectadas pela espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

De acordo com os espectros de infravermelho dos extratos de BEs de *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b (Figuras 25 e 26), observa-se que os mesmos são muito parecidos, exibindo bandas de absorção similares. Para o espectro do BE de *A. flavus* 85b, foi possível identificar os grupos funcionais hidroxila (OH) em 3429 cm^{-1} e carbonila (C=O) em 1651 cm^{-1} , sugerindo a presença da função orgânica ácido carboxílico, além de ligações C–O–C em 1384 e 1099 cm^{-1} (Figura 17).

Semelhantemente, para o extrato do BE de *T. koningii* 96b, também foi possível identificar os grupos funcionais hidroxila (OH) em 3444 cm^{-1} , carbonila (C=O) em 1651 cm^{-1} e ligações C–O–C em 1384 e 1095 cm^{-1} , também sugerindo a presença da função orgânica ácido carboxílico (Figura 26).

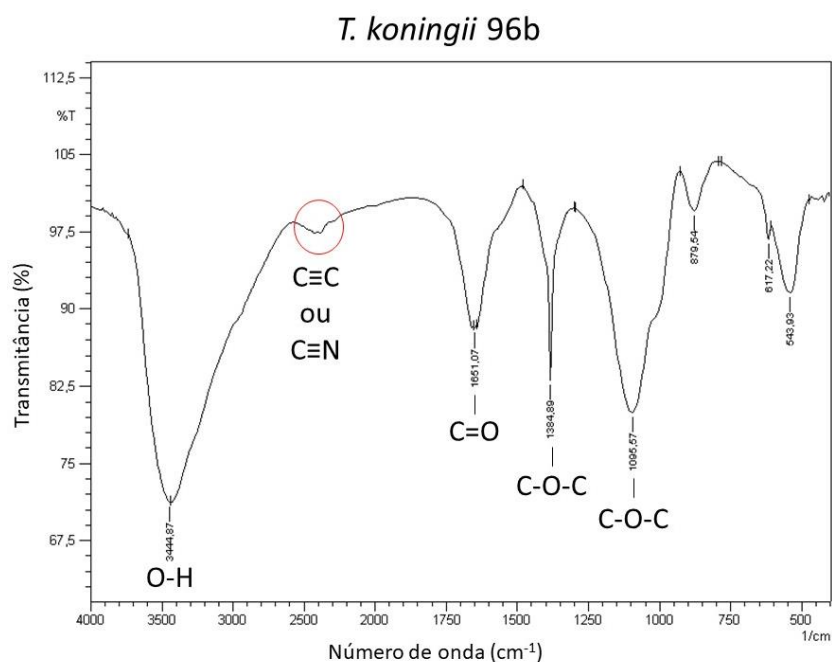
Na região entre 2000 e 2500 cm^{-1} ainda foi observada uma banda referente à ligação C≡C ou C≡N para ambos os compostos.

Figura 25 – Espectro do extrato do bioemulsificante produzido por *Aspergillus flavus* 85b obtido através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 26 – Espectro do extrato do bioemulsificante produzido por *T. koningii* 96b obtido através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.



Fonte: Autoria própria (2022).

A função ácido carboxílico pode ser encontrada em ácidos graxos, aminoácidos e carboidratos (NELSON; COX, 2018), enquanto o grupo funcional éter (C–O–C) sugere a presença de carboidratos (GUDIÑA *et al.*, 2015). Não foram observadas, contudo, bandas de aminas (N–H_n), que ocorrem acima de 3200 cm⁻¹, bem como bandas correspondentes ao grupo metileno (C–H₂), que aparecem em 2900 – 3000 cm⁻¹ (BHAUMIK *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2017; SILVERSTEIN *et al.*, 2019). Essas bandas, características de aminoácidos e ácidos graxos, respectivamente, podem ter sido sobrepostas pela banda larga e forte do grupo funcional hidroxila (OH) em ambos os espectros.

Com base nos resultados obtidos pela CCD e FTIR, supõe-se que os BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b sejam complexos de carboidratos, lipídeos e proteínas. Segundo Bhardwaj, Cameotra e Chopra (2013), a maioria dos BEs e BSs fúngicos são derivados de lipídeos e eventualmente formam complexos com carboidratos, peptídeos e proteínas, corroborando os dados levantados neste trabalho.

É importante destacar que o extrato bruto obtido através da precipitação etanólica pode conter outros metabólitos fúngicos que não apenas bioemulsificantes e por esse motivo se faz necessária a purificação dos BEs produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b. Além disso, a análise dos extratos por técnicas mais robustas como ressonância magnética nuclear e

cromatografias líquida e gasosa acopladas ao espectrômetro de massas pode auxiliar na elucidação de suas estruturas químicas e mecanismos de ação.

Por fim, em virtude dos excelentes resultados obtidos na emulsificação de substratos hidrofóbicos, mesmo em baixas concentrações, aliados à estabilidade em condições extremas de salinidade e temperatura, os bioemulsificantes produzidos pelos fungos *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b se apresentam como substitutos promissores de emulsificantes sintéticos usados na indústria de petróleo e na biorremediação de ambientes marinhos contaminados com óleo, sendo importante a realização de estudos toxicológicos e de biodegradação para entender a forma como essas moléculas se comportam no ambiente.

Um maior entendimento das características e potencialidades desses bioemulsificantes é importante para avaliar suas possíveis aplicações em áreas diversas.

9 CONCLUSÕES

- a) Os dezenove isolados de fungos filamentosos provenientes de um aterro de resíduos de petróleo produziram bioemulsificantes em meio mineral utilizando óleo de motor como substrato.
- b) Os bioemulsificantes presentes no filtrado livre de células promoveram elevados índices de emulsificação do óleo de motor e formaram emulsões estáveis por até 3 meses.
- c) Os bioemulsificantes produzidos por *Aspergillus flavus* 85b e *Trichoderma koningii* 96b foram extraídos de forma eficiente pela precipitação etanólica.
- d) O extrato do bioemulsificante produzido por *A. flavus* 85b emulsionou eficientemente os óleos cru e diesel e ainda formou emulsões estáveis com o tolueno, azeite e óleo de soja.
- e) O extrato do bioemulsificante produzido por *T. koningii* 96b emulsionou eficientemente o óleo cru e formou emulsões estáveis com o azeite e óleo de soja.
- f) Os bioemulsificantes produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b se mostraram eficientes em baixas concentrações e estáveis em condições de elevada salinidade e temperatura.
- g) Os bioemulsificantes produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b possuem natureza aniônica.
- h) A caracterização química preliminar dos bioemulsificantes produzidos por *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b sugeriu a presença de lipídeos, carboidratos e proteínas em sua composição.
- i) As linhagens de fungos filamentosos estudadas apresentam grande potencial de aplicação industrial, com destaque para os fungos *A. flavus* 85b e *T. koningii* 96b, que se mostraram microrganismos promissores para uso na indústria de petróleo e em eventos de biorremediação.

REFERÊNCIAS

- ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A. *et al.* Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization, and evaluation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 4, p. 315-324, 1991.
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 151, 2019.
- ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 669-679, 2021.
- AKINTUNDE, W. O.; OLUGBENGA, O. A.; OLUFEMI, O. O. Some adverse effects of used engine oil (common waste pollutant) on reproduction of male Sprague Dawley rats. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 46-51, 2015.
- ALCANTARA, V.; PAJARES, I.; SIMBAHAN, J.; EDDING, S. Downstream recovery and purification of a bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. **The Philippine agriculturist**, 96, p. 349-358, 12/01 2013.
- ALI, F.; DAS, S.; HOSSAIN, T. J.; CHOWDHURY, S. I. *et al.* Production optimization, stability and oil emulsifying potential of biosurfactants from selected bacteria isolated from oil-contaminated sites. **R Soc Open Sci**, v. 8, n. 10, p. 211003, 2021.
- ALIZADEH-SANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; KHEZERLOU, A.; AZIZI-LALABADI, M. *et al.* Bioemulsifiers derived from microorganisms: applications in the drug and food industry. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 191-199, 2018.
- ALMEDA, R.; BACA, S.; HYATT, C.; BUSKEY, E. J. Ingestion and sublethal effects of physically and chemically dispersed crude oil on marine planktonic copepods. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 6, p. 988-1003, 2014.
- AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. J.; COUTINHO, J. A. P. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. In: SEN, R. (Ed.). **Biosurfactants**. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 236-249.
- AMARAL, P. F. F.; DA SILVA, J. M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V. *et al.* Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894-1898, 2006.
- AMEEN, F.; HADI, S.; MOSLEM, M.; AL-SABRI, A. *et al.* Biodegradation of engine oil by fungi from mangrove habitat. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 185-192, 2015.
- ANDRADE SILVA, N. R.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO, L. O. *et al.* Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

ARCHANA, K.; SATHI REDDY, K.; PARAMESHWAR, J.; BEE, H. Isolation and characterization of sophorolipid producing yeast from fruit waste for application as antibacterial agent. **Environmental Sustainability**, v. 2, n. 2, p. 107-115, 2019.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.

ASEMOLOYE, M. D.; TOSI, S.; DACCÒ, C.; WANG, X. *et al.* Hydrocarbon degradation and enzyme activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* isolated from nigerian crude oil-polluted sites. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1912, 2020.

ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 149-156, 1991.

BAJPAI, D.; TYAGI, V. K. Laundry detergents: an overview. **Journal of Oleo Science**, v. 56, n. 7, p. 327-340, 2007.

BALDEWEG, F.; WARNCKE, P.; FISCHER, D.; GRESSLER, M. Fungal biosurfactants from *Mortierella alpina*. **Organic Letters**, v. 21, n. 5, p. 1444-1448, 2019.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BARRON, M. G.; CARLS, M. G.; SHORT, J. W.; RICE, S. D. Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered Alaska North Slope crude oil to Pacific herring eggs and larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 650-660, 2003.

BASTOS, R.; OLIVEIRA, P. G.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. *et al.* Brewer's yeast polysaccharides — A review of their exquisite structural features and biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, p. 118826, 2022.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 868-875, 2006.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1-8, 2004.

BEYER, J.; TRANNUM, H. C.; BAKKE, T.; HODSON, P. V. *et al.* Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v.110, n. 1, p. 28-51, 2016.

BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H.K. Biosurfactants from fungi: a review. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 4, n. 6, 2013.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231-236, 1999.

BJERK, T. R.; SEVERINO, P.; JAIN, S.; MARQUES, C. *et al.* Biosurfactants: properties and applications in drug delivery, biotechnology and ecotoxicology. **Bioengineering**, v. 8, n. 8, p. 115, 2021.

BHAUMIK, M.; DHANARAJAN, G.; CHOPRA, J.; KUMAR, R. *et al.* Production, partial purification and characterization of a proteoglycan bioemulsifier from an oleaginous yeast. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 10, p. 1747-1759, 2020.

BRYCKI, B.; WALIGÓRSKA, M.; SZULC, A. The biodegradation of monomeric and dimeric alkylammonium surfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 280, p. 797-815, 2014.

CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z. *et al.* A novel bioemulsifier produced by *Exiguobacterium* sp. strain N4⁻¹P isolated from petroleum hydrocarbon contaminated coastal sediment. **RSC Advances**, v. 7, n. 68, p. 42699-42708, 2017.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I. *et al.* Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CAMACHO-CHAB, J. C.; GUÉZENNEC, J.; CHAN-BACAB, M. J.; RÍOS-LEAL, E. *et al.* Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 18959-18972, 2013.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M. *et al.* Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1164-1170, 2015.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p. 313-324, 2019.

CÂNDIDO, T. R. D. S.; MENDONÇA, R. D. S.; LINS, U. M. D. B. L.; SOUZA, A. F. D. *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. 2-11, 2022.

CERESA, C.; FRACCHIA, L.; FEDELI, E.; PORTA, C. *et al.* Recent advances in biomedical, therapeutic and pharmaceutical applications of microbial surfactants. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 466, 2021.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

COHERENT MARKET INSIGHTS. **Emulsifiers Market Analysis**. Índia, 2020. Disponível em: < <https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/emulsifiers-market-3850>. Acesso em: 5 out. 2022.

CORNET, M.; GAILLARDIN, C. pH signaling in human fungal pathogens: a new target for antifungal strategies. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 3, p. 342-352, 2014.

DALTIN, Délcio. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

DA SILVA, A. F.; BANAT, I. M.; GIACHINI, A. J.; ROBL, D. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 10, p. 2003-2034, 2021.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 663-674, 2009.

DE ALMEIDA, D. G.; SOARES DA SILVA, R. D. C. F.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D. *et al.* Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

DE SIENA, M.; RAOUL, P.; COSTANTINI, L.; SCARPELLINI, E. *et al.* Food emulsifiers and metabolic syndrome: the role of the gut microbiota. **Foods**, v. 11, n. 15, p. 2205, 2022.

DE SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 256-262, 2012.

DERGUINE-MECHERI, L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; KHEMILI-TALBI, S.; DJENANE, D. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic *Cryptococcus* strain YLF isolated from crude oil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 162, p. 712-724, 2018.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 2, p. 143-150, 1995.

DOS REIS, C. B. L. M., LIZIANE MARIA BARASSUOL; BEVILACQUA, CAROLINE BORGES; BUBLITZ, FABRÍCIO; UGALDE, GUSTAVO; MAZUTTI, MARCIO ANTONIO; JACQUES, RODRIGO JOSEMAR SEMINOTI. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, 2018.

EBRAHIMIPOUR, G.; GILAVAND, F.; KARKHANE, M.; KAVYANIFARD, A. A. *et al.* Bioemulsification activity assessment of an indigenous strain of halotolerant *Planococcus* and partial characterization of produced biosurfactants. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 1379-1386, 2014.

FARIAS, C. B. B.; ALMEIDA, F. C. G.; SILVA, I. A.; SOUZA, T. C. *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28-39, 2021.

FELSE, P. A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J. *et al.* Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 316-323, 2007.

FENG, X.; MUSSONE, P.; GAO, S.; WANG, S. *et al.* Mechanistic study on demulsification of water-in-diluted bitumen emulsions by ethylcellulose. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3050-3057, 2010.

FENIBO, E. O.; IJOMA, G. N.; SELVARAJAN, R.; CHIKERE, C. B. Microbial surfactants: the next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 581, 2019.

FERREIRA, I. N. S.; RODRÍGUEZ, D. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; ANDRADE, R. F. D. S. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 51-58, 2020.

FDA. **Food & Drug Administration**, 2022. Disponível em: < <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. Acesso em: 24 jun. 2022.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Biosurfactants market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (glycolipid, lipopeptides, phospholipids, polymeric, and others), by application (household cleaners, industrial and institutional cleaners, food processing, oil & petroleum, personal care, agrochemicals, and others), and regional forecast, 2022-2029.** Índia, 2021b. Disponível em: < <https://www.fortunebusinessinsights.com/biosurfactants-market-102761>. Acesso em: 19 jan. 2022.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Surfactants market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (anionic, nonionic, cationic, and amphoteric), by application (home care, personal care, textile, food & beverages, industrial & institutional cleaning, plastics, and others), and regional forecast, 2021-2028.** Índia, 2021a. Disponível em: < <https://www.fortunebusinessinsights.com/surfactants-market-102385>. Acesso em: 19 jan. 2022.

GAYLARDE, C. C. Seleção de microrganismos produtores de surfactantes e avaliação da base fisiológica da produção. In: SILVA, C. M. M. S.; ROQUE, M. R.; MELO, I. S. **Microbiologia ambiental: manual de laboratório**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000, 98p.

GEETHA, S.J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23-32, 2018.

GEISSLER, M.; HERAVI, K. M.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. Lipopeptide Biosurfactants from *Bacillus* species. In: HAYES, D. G.; SOLAIMAN, D. K. Y., *et al* (Ed.). **Biobased Surfactants (Second Edition)**: AOCS Press, 2019. p. 205-240.

GUDIÑA, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; COSTA, R.; EVTUGUIN, D. V. *et al.* Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 14, 2015.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, L. R. Research and production of biosurfactants for the food industry. *In: Bioprocessing for Biomolecules Production*, 2019. p. 125-143.

HUSAINI, A.; ROSLAN, H. A.; HII, K. S. Y.; ANG, C. H. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 2789-2797, 2008.

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

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985-992, 2005.

ISRAELACHVILI, Jacob N. **Intermolecular and surfaces forces**. 3. ed. USA: ELSEVIER, 2011.

ISHAQ, U.; AKRAM, M. S.; IQBAL, Z.; RAFIQ, M. *et al.* Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1035-1045, 2015.

IVSHINA, I. B.; KUYUKINA, M. S.; KRIVORUCHKO, A. V.; ELKIN, A. A. *et al.* Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. **Environmental Science-Processes & Impacts**, v. 17, n. 7, p. 1201-1219, 2015.

JACKSON, M.; EADSFORTH, C.; SCHOWANEK, D.; DELFOSSE, T. *et al.* Comprehensive review of several surfactants in marine environments: fate and ecotoxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 35, n. 5, p. 1077-1086, 2016.

JAHAN, R.; BODRATTI, A. M.; TSIANOU, M.; ALEXANDRIDIS, P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 102061, 2020.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124-4126, 1949.

JOHNSON, P.; TRYBALA, A.; STAROV, V.; PINFIELD, V. J. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, p. 102340, 2021.

KADHEM, B.Q; ESSA, R.H; MAHMOOD, N.N. Antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of University of Garmian**, v. 6, n. 1, p. 546-554, 2019.

KAPLAN, N.; ROSENBERG, E. Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1335-1341, 1982.

KONTOGEORGIS, G. M., KIIL, S. Surface and interfacial tensions – principles and estimation methods. In: KONTOGEORGIS, G. M., KIIL, S. **Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry**, 2016. p. 34-73.

KRONBERG, B., HOLMBERG K. LINDMAN, B. Surface and interfacial tension. In: KRONBERG, B., HOLMBERG K. LINDMAN, B. **Surface Chemistry of Surfactants and Polymers**, 2014. p. 231-249.

LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 25, n. 11, p. 1353-1366, 2007.

LEVY, J. K.; GOPALAKRISHNAN, C. Promoting ecological sustainability and community resilience in the US gulf coast after the 2010 Deepwater Horizon oil spill. **Journal of Natural Resources Policy Research**, v. 2, n. 3, p. 297-315, 2010.

LINKE, D. Detergents: An Overview. In: BURGESS, R. R. e DEUTSCHER, M. P. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, 2009. v. 463, p. 603-617.

LOURENÇO, L. A.; ALBERTON MAGINA, M. D.; TAVARES, L. B. B.; GUELLI ULSON DE SOUZA, S. M. A. *et al.* Biosurfactant production by *Trametes versicolor* grown on two-phase olive mill waste in solid-state fermentation. **Environmental Technology**, v. 39, n. 23, p. 3066-3076, 2018.

LUFT, L.; CONFORTIN, T. C.; TODERO, I.; ZABOT, G. L. *et al.* An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 1059-1080, 2020.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 715-720, 2003.

LUNA-VELASCO, M. A.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CAÑÍZARES-VILLANUEVA, R. O.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 310-314, 2007.

MAŃKO, D.; ZDZIENNICKA, A.; JAŃCZUK, B. Thermodynamic properties of rhamnolipid micellization and adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 119, p. 22-29, 2014.

MAPELLI, F.; SCOMA, A.; MICHOU, G.; AULENTA, F. *et al.* Biotechnologies for marine oil spill cleanup: indissoluble ties with microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 860-870, 2017.

MARKANDE, A. R.; PATEL, D.; VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications, and current developments. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 11, 2021.

MARQUES, N. S. A. A.; SILVA, I. G. S. D.; CAVALCANTI, D. L.; MAIA, P. C. S. V. *et al.* Eco-Friendly bioemulsifier production by *Mucor circinelloides* UCP0001 isolated from

mangrove sediments using renewable substrates for environmental applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 365, 2020.

MARQUES, W. F. Caracterização microbiológica do aterro de resíduos sólidos da produção de petróleo na região de Icapuí – CE e seu potencial de biorremediação. 2004. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

MERRETTIG-BRUNS U, JELEN E. Anaerobic biodegradation of detergent surfactants. **Materials**, v. 2, p. 181-206, 2009.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M.-N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 822-832, 2001.

MILTON J. ROSEN, J. T. K. Characteristic features of surfactants. *In: Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2012. p. 1-38.

MNIF, I.; GHRIBI, D. High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 691-706, 2015.

MONTEIRO, A. S.; BONFIM, M. R. Q.; DOMINGUES, V. S.; CORRÊA, A. *et al.* Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, n. 101, n. 14, p. 5186-5193, 2010.

MUJUMDAR, S.; JOSHI, P.; KARVE, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 277-287, 2019.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ Pollut**, v. 133, n. 2, p. 183-198, 2005.

NAKAMA, Y. Surfactants. *In: SAKAMOTO, K.; LOCHHEAD, R. Y., et al (Ed.). Cosmetic Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 231-244.

NAIMI, S.; VIENNOIS, E.; GEWIRTZ, A. T.; CHASSAING, B. Direct impact of commonly used dietary emulsifiers on human gut microbiota. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 66, 2021.

NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R. *et al.* Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NELSON, C.; COX, M.M.; **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NIKOLOVA, C.; GUTIERREZ, T. Use of microorganisms in the recovery of oil from recalcitrant oil reservoirs: current state of knowledge, technological advances and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020.

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

OBAYORI, O. S.; ILORI, M. O.; ADEBUSOYE, S. A.; OYETIBO, G. O. *et al.* Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp strain LP1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1615-1623, 2009.

OPENPR. **Emulsifiers market future on recent innovation 2026 key players**. Alemanha, 2020. Disponível em: < <https://www.openpr.com/news/2063526/emulsifiers-market-future-on-recent-innovation-2026-key-players>. Acesso em: 5 out. 2022.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PANJIAR, N.; SACHAN, S. G.; SACHAN, A. Screening of bioemulsifier-producing microorganisms isolated from oil-contaminated sites. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 753-764, 2015.

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

PAVIA, D.L.; LAMPMAM, G.L.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PELE, M. A., MONTERO-RODRIGUEZ, D., RUBIO-RIBEAUX, D., SOUZA, A. F., LUNA, M. A. C., SANTIAGO, M. F., ANDRADE, R. F. S., E SILVA, T. A. L., SANTIAGO, A. L. C. M. A., & CAMPOS-TAKAKI, G. M. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 150-157, 2018.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: TIMMIS, K. N. (Ed.). **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 1501-1512.

PESSÔA, M. G.; VESPERMANN, K. A. C.; PAULINO, B. N.; BARCELOS, M. C. S. *et al.* Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 2, p. 319-339, 2019.

PHETRONG, K.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 297-305, 2008.

PIEGZA, M.; PIETRZYKOWSKA, J.; TROJAN-PIEGZA, J.; LABA, W. Biosurfactants from *Trichoderma* filamentous fungi-a preliminary study. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 13, 2021.

PITOCCHI, R.; CICATIELLO, P.; BIROLO, L.; PISCITELLI, A. *et al.* Cerato-platanins from marine fungi as effective protein biosurfactants and bioemulsifiers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2913, 2020.

BAIN & COMPANY. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira**. São Paulo, 2014. Disponível em: <
https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_tensaoativos.pdf. Acesso em: 14 fev. 2022.

PRADHAN, A.; BHATTACHARYYA, A. Quest for an eco-friendly alternative surfactant: surface and foam characteristics of natural surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 150, p. 127-134, 2017.

PRINCE, R. C. Oil spill dispersants: boon or bane? **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 11, p. 6376-6384, 2015.

RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1037-1062, 2010.

RAMADASS, K.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Ecological implications of motor oil pollution: earthworm survival and soil health. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 85, p. 72-81, 2015.

ROCHA E SILVA, F. C. P.; ROQUE, B. A. C.; ROCHA E SILVA, N. M. P.; RUFINO, R. D. *et al.* Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 202, 2017.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

ROSEN, M. J., KUNJAPPU, JOY T. **Surfactants and interfacial phenomena**. 4. ed. John Wiley & Sons 2012.

ROSENBERG, E.; PERRY, A.; GIBSON, D. T.; GUTNICK, D. L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 409-413, 1979.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

RUFINO, R. D.; DE LUNA, J. M.; DE CAMPOS TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.

SAJNA, K. V.; HÖFER, R.; SUKUMARAN, R. K.; GOTTUMUKKALA, L. D. *et al.* White biotechnology in biosurfactants. In: PANDEY, A.; HÖFER, R., *et al* (Ed.). **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 499-521.

SALEK, K.; EUSTON, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 143-155, 2019.

SALEK, K.; EUSTON, S. R.; JANEK, T. Phase behaviour, functionality, and physicochemical characteristics of glycolipid surfactants of microbial origin. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

SANDIAWO, S.; HOCK, O. G.; WEN, T. J.; HEE, C. W. *et al.* Comparative assessment of three fungal genus in mycoremediation of spent engine oil: a brief review. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 10, n. 3, p. 474-480, 2022.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A. *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M. *et al.* Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Review in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127-144, 2010.

SATPUTE, S. K.; MONE, N. S.; DAS, P.; BANAT, I. M. *et al.* Inhibition of pathogenic bacterial biofilms on PDMS based implants by *L. acidophilus* derived biosurfactant. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 39, 2019.

SCHEIBEL, J. J. The evolution of anionic surfactant technology to meet the requirements of the laundry detergent industry. **Journal of Surfactants and Detergents**, 7, n. 4, p. 319-328, 2004.

SCHOBERT, H. Composition, classification, and properties of petroleum. In: SCHOBERT, H. (Ed.). **Chemistry of Fossil Fuels and Biofuels**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 174-191. (Cambridge Series in Chemical Engineering).

SENA, H. H.; SANCHES, M. A.; ROCHA, D. F. S.; SEGUNDO, W. O. P. F. *et al.* Production of biosurfactants by soil fungi isolated from the amazon forest. **International Journal of Microbiology**, 2018, p. 5684261, 2018.

SILVA, A. C. S. D.; SANTOS, P. N. D.; SILVA, T. A. L. E.; ANDRADE, R. F. S. *et al.* Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, 2018.

SHARMA, J.; SUNDAR, D.; SRIVASTAVA, P. Biosurfactants: potential agents for controlling cellular communication, motility, and antagonism. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 2021.

SHAVANDI, M.; MOHEBALI, G.; HADDADI, A.; SHAKARAMI, H. *et al.* Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 477-482, 2011.

SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2015.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207-217, 1995.

SNYMAN, C.; MEKOUE NGUELA, J.; SIECZKOWSKI, N.; MARANGON, M. *et al.* Optimised extraction and preliminary characterisation of mannoproteins from non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 924, 2021.

SPEIGHT, J.D. **The chemistry and technology of petroleum**. 5. ed. Estados Unidos: CRC Press, 2014.

SWANNELL, R. P. J.; MITCHELL, D.; LETHBRIDGE, G.; JONES, D. *et al.* A field demonstration of the efficacy of bioremediation to treat oiled shorelines following the Sea Empress incident. **Environmental Technology**, v. 20, n. 8, p. 863-873, 1999.

TAO, W.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H. *et al.* Designer bioemulsifiers based on combinations of different polysaccharides with the novel emulsifying esterase AXE from *Bacillus subtilis* CICC 20034. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 173, 2019.

THRAEIB, J. Z.; ALTEMIMI, A. B.; JABBAR ABD AL-MANHEL, A.; ABDELMAKSoud, T. G. *et al.* Production and characterization of a bioemulsifier derived from microorganisms with potential application in the food industry. **Life**, v. 12, n. 6, p. 924, 2022.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; TEHRANI, H. A. Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 29, n. 8, p. 734-737, 1996.

TUPE, S. G.; DESHMUKH, S. K.; ZAMBARE, R. B.; TRIPATHI, A. A. *et al.* Biopolymers from fungi and their applications. In: DESHMUKH, S. K.; DESHPANDE, M. V., *et al* (Ed.). **Fungal Biopolymers and Biocomposites: Prospects and Avenues**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 3-14.

TWIGG, M. S.; BACCILE, N.; BANAT, I. M.; DÉZIEL, E. *et al.* Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 147-170, 2021.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 245, 2015.

VALLEJO-CARDONA, A. A.; MARTÍNEZ-PALOU, R.; CHÁVEZ-GÓMEZ, B.; GARCÍA-CALOCA, G. *et al.* Demulsification of crude oil-in-water emulsions by means of fungal spores. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

VAN BOGAERT, I. N. A.; SAERENS, K.; DE MUYNCK, C.; DEVELTER, D. *et al.* Microbial production and application of sophorolipids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 23-34, 2007.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, 232, p. 389-397, 2017.

VAZQUEZ-DUHALT, R. Environmental impact of used motor oil. **Science of The Total Environment**, v. 79, n. 1, p. 1-23, 1989.

VELIOGLU, Z.; OZTURK UREK, R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 526-531, 2015.

VIEIRA, I. M. M.; SANTOS, B. L. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 100, p. 1-18, 2021.

VIRAMONTES-RAMOS, S.; CRISTINA PORTILLO-RUIZ, M.; BALLINAS-CASARRUBIAS MDE, L.; TORRES-MUÑOZ, J. V. *et al.* Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 3, p. 668-675, 2010.

VYLKOVA, S. Environmental pH modulation by pathogenic fungi as a strategy to conquer the host. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, 2017.

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

WHITE, G, F.; RUSSEL, N.J. What is biodegradation?. *In*: KARSA, D. R.; PORTER, M.R. (Ed.). **Biodegradability of surfactants**. Reino Unido, Springer-Science + Business Media, 1995. p. 28.

XU, X.; LIU, W.; TIAN, S.; WANG, W. *et al.* Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. **Front Microbiol**, v. 9, p. 2885, 2018.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N. *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.