



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



Higor Túlio Correa

**Produção de biossurfactante e L-asparaginase utilizando
larvas secas de *Tenebrio molitor* como biomassa inovadora
para fermentação e processo extrativo líquido**

Uberlândia - MG

Março de 2023



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



Higor Túlio Correa

**Produção de biossurfactante e L-asparaginase utilizando
larvas secas de *Tenebrio molitor* como biomassa inovadora
para fermentação e processo extrativo líquido**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho

Uberlândia - MG

Março de 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C824p
2023

Correa, Higor Túlio, 1994-

Produção de biossurfactante e L-asparaginase utilizando larvas secas de *Tenebrio molitor* como biomassa inovadora para fermentação e processo extrativo líquido [recurso eletrônico] / Higor Túlio Correa. - 2023.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7033>

Inclui bibliografia.

1. Química. I. Coutinho Filho, Ubirajara, 1971-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 54

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Tese de Doutorado, 04/2023, PPGEQ				
Data:	29 de março de 2023	Hora de início:	09:15	Hora de encerramento:	11:40
Matrícula do Discente:	11913EQU006				
Nome do Discente:	Higor Túlio Correa				
Título do Trabalho:	Produção de biossurfactante e L-asparaginase utilizando larvas secas de Tenebrio molitor como biomassa inovadora para fermentação e processo extrativo líquido				
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais				
ODS-ONU:	ODS 12 – Consumo e Produção Responsáveis				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Diego Andrade Lemos - ICTE/UFTM, Janaina Fischer - IHCEC/UPF, Thamayne Valadares de Oliveira - FEQUI/UFU, Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU e Ubirajara Coutinho Filho - PPGEQ/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, o presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Coutinho Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/03/2023, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thamayne Valadares de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/03/2023, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/03/2023, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Andrade Lemos, Usuário Externo**, em 29/03/2023, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janaína Fischer, Usuário Externo**, em 29/03/2023, às 11:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4368888** e o código CRC **86AA9CC4**.

Aos meus pais José Carlos Correa da Silva e Lúcia Helena Correa, por todo suporte, incentivo e apoio incondicional. A minha irmã Thaynara Correa pelo companheirismo.

À minha namorada Bruna Afonso, pelo apoio, paciência e por sempre me incentivar a buscar os melhores caminhos.

Aos meus amigos que sempre se fazem presente na minha vida.

Agradecimentos

Meu agradecimento em especial ao Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, meu orientador, pelo apoio irrestrito, por estar sempre a disposição, pelas orientações cruciais para o desenvolvimento do trabalho e por partilhar seu conhecimento e experiência.

Aos funcionários, técnicos e professores da Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, que de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para a realização desse trabalho.

As instituições de fomento e pesquisa FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a todos amigos do laboratório do NUCBIO por compartilhar as experiências e o tempo. Aprendi muito com cada um de vocês!

Agradeço aos meus pais e irmã meus maiores exemplos. Sou grato pelo incentivo, dedicação e amor incondicional. Obrigado por estarem sempre ao meu lado!

A minha namorada Bruna Afonso pelo companheirismo, apoio, compreensão, por estar presente em todos os momentos, pelos conselhos e todo carinho para a conclusão dessa jornada.

Aos meus amigos que me inspiraram a me tornar um profissional melhor a cada dia. Obrigado pelo suporte necessário para chegar até aqui.

Enfim, agradeço a todos aqueles que participaram comigo de alguma forma nessa trajetória e que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê “.*
(Arthur Schopenhauer)

Resumo

A produção de bioprodutos de alto valor agregado é de grande interesse para a indústria. Na busca de fontes alternativas para esses produtos, os insetos têm sido considerados uma fonte de biomassa, pois oferecem desenvolvimento sustentável com baixo custo e facilidade de produção e ainda não foram totalmente explorados. A biomassa de *Tenebrio molitor* já é utilizada para consumo humano e animal por seu alto teor de proteínas e lipídios, porém este estudo investiga seu potencial como fonte de carbono para produção de enzimas e biossurfactantes. A produção de enzimas foi investigada considerando L-asparaginase gerada usando *Penicillium* sp. LAMAI-505 via fermentação em estado sólido. Para a produção de biossurfactante, a biomassa de *Tenebrio molitor* foi avaliada como fonte primária de biossurfactante e também foi avaliada como biomassa para fermentação submersa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. O maior rendimento de L-asparaginase foi de 2,75 U/gds, com período de incubação de 48 horas, pH ácido, biorreator rotacional e 0,015 g/g de glicerol e 0,10 g/g de *Tenebrio molitor* hidrolisado como fontes de carbono. Foi demonstrado que a biomassa de *Tenebrio molitor* como fonte primária possui propriedades surfactantes com e sem fermentação. Quando usados sem purificação e concentração, os biossurfactantes produzidos foram capazes de reduzir a tensão superficial das soluções para 32,0 mN/m, atingir taxas de emulsificação de 100% e ter detergência semelhante a detergentes comerciais (diluídos a 1,0% p/vol).

Palavras-chave: L-asparaginase, fermentação em estado sólido, novas biomassas, materiais sólidos inertes.

Abstract

Production of high-added-value bioproducts is of great interest to industry. In search of alternative sources for these products, insects have been considered as a source of biomass as they offer sustainable development with low cost and ease of production and have not been fully explored. *Tenebrio molitor* biomass is already used for human and animal consumption for its high protein and lipid content; this study investigates its potential as a carbon source for production of enzymes and biosurfactants. Enzyme production was investigated considering l-asparaginase generated using *Penicillium* sp. LAMAI-505 via solid state fermentation. For biosurfactant production, *Tenebrio molitor* biomass was evaluated as the primary biosurfactant source; submerged fermentation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was also evaluated. The greatest yield of l-asparaginase was 2.75 U/gds, with a 48-h incubation period, an acidic pH, a rotational bioreactor, and 0.015 g/g of glycerol and 0.10 g/g of hydrolysed *Tenebrio molitor* as carbon sources. When used without purification and concentration, the biosurfactants produced were able to reduce the surface tension of solutions to 32.0 mN/m, achieve emulsification rates of 100%, and have detergency similar to commercial detergents (diluted at 1.0% wt/vol).

Keywords: L-asparaginase, solid state fermentation, novel biomass, inert solid materials.

Lista de ilustrações

Figura 1 – <i>Tenebrio molitor</i>	28
Figura 2 – Reação catalisada pela enzima L-Asparaginase	33
Figura 3 – Caminhos propostos para a formação de acrilamida após a degradação de Strecker do aminoácido asparagina na presença de produtos dicarbonílicos da reação de Maillard.	34
Figura 4 – Estrutura de um surfactante	35
Figura 5 – Fluxograma referente ao material e os métodos utilizados	43
Figura 6 – Moagem das larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	45
Figura 7 – Fluxograma referente ao processo da biomassa	46
Figura 8 – Suportes sólidos inertes	47
Figura 9 – Reações para a quantificação de L-asparaginase	49
Figura 10 – Procedimento de análise da L-asparaginase	50
Figura 11 – Processo de descontaminação ambiental	51
Figura 12 – FT-IR <i>Tenebrio molitor</i> puro e hidrolisado	53
Figura 13 – Avaliação do <i>Penicillium</i> sp. LAMAI-505 em FES	54
Figura 14 – Avaliação das matrizes sólidas inertes	56
Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura dos suportes inertes	57
Figura 16 – Avaliação do pH	59
Figura 17 – Avaliação do tempo FES para condição otimizada em biorreator estático e rotativo	60
Figura 18 – Índice de emulsão e teste de tensão superficial	61
Figura 19 – Testes de detergência	62

Lista de tabelas

Tabela 1	– Composição nutricional (%) do <i>Tenebrio molitor</i> na literatura	27
Tabela 2	– Parâmetros de cultivo para produção de L-asparaginase	32
Tabela 3	– Classificação dos biossurfactantes por microrganismo produtor	37
Tabela 4	– Caracterização química da biomassa	44
Tabela 5	– Condições de fermentação usadas	48
Tabela 6	– Combinações entre glicerol na solução nutritiva e <i>Tenebrio molitor</i>	58

Lista de abreviaturas e siglas

AC	Acrilamida
CRM	Centro de Recurso Microbianos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Administração Americana de Comidas e Drogas
FES	Fermentação Estado Sólido
FES-SI	Fermentação Estado Sólido com Suporte Inerte
FS	Fermentação Submersa
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
IARC	International Agency for Research Cancer
IC	Imobilização de Células
LAMAI	Código de armazenamento no CRM
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
TMB	Biomassa de <i>Tenebrio molitor</i>

Lista de símbolos

%	Porcentagem
α	Alfa
μ	Micro ou 10^{-6} unidade de medida
(v / v)	Volume por Volume
Λ	Atividade de L-asparaginase
δ	Leitura de Absorbância
θ	Tempo de incubação (minuto)
U/kg	Unidade por kilograma
U/g	Unidade por grama
Vol_{Ext}	Volume da solução de extração (mL)
$Vol_{Amostra}$	Volume da amostra de análise (mL)
$F_{Diluição}$	Fator de diluição da amostra

Sumário

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1	Tenebrio molitor	27
3.2	Produção de insetos	29
3.3	Produtos capazes de gerar valor agregado a biomassa	30
3.4	L-asparaginase	31
3.4.1	Uso terapêutico	33
3.4.2	Uso na indústria de alimentos	34
3.5	Surfactante	35
3.6	Biossurfactantes	36
3.7	Fermentações	38
3.7.1	Fermentação submersa (FS)	38
3.7.2	Fermentação em estado sólido (FES)	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Microrganismos e meios de cultura	43
4.2	Preparação da biomassa de Tenebrio molitor	44
4.3	Suportes sólidos utilizados FES	46
4.4	Condições de fermentação	47
4.5	Análise da L-asparaginase	49
4.6	Avaliação da produção de biossurfactantes	50
4.6.1	Tensão superficial	50
4.6.2	Índice de emulsificação	51
4.6.3	Ensaio de detergência (descontaminação ambiental)	51
4.7	Análise de dados estatísticos	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1	Avaliação da hidrólise do Tenebrio molitor por FT-IR	53
5.2	Avaliação da influência do glicerol e hidrólise da TMB	53
5.3	Seleção dos suportes sólidos	55
5.4	Efeito do meio nutriente na produção de L-asparaginase	57

5.5	Avaliação efeito pH	58
5.6	Efeito do biorreator rotativo	59
5.7	Avaliação do potencial da biomassa de <i>Tenebrio molitor</i> para descontaminação ambiental	60
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	65

1 Introdução

A partir de estudos realizados pelas Nações Unidas estima-se que a população mundial pode alcançar a marca de 9,7 bilhões de pessoas até 2050, com isso surgem grandes desafios para o desenvolvimento sustentável (BORGES et al., 2022). Devido à preocupação com o esgotamento das fontes finitas de alimentos e dos recursos naturais, como terras agricultáveis, disponibilidade de água potável e visando reduzir os impactos provenientes das mudanças climáticas e do crescimento populacional contínuo diversos esforços estão sendo realizados para encontrar fontes alternativas de alimentos, que possam substituir a alimentação tradicional mantendo níveis nutricionais semelhantes e que tenha obtenção de forma mais eficiente e sustentável (BONGAARTS, 2020; FAO, 2021). Nesse cenário, o uso de insetos comestíveis pode se tornar uma ótima estratégia para se alcançar a segurança alimentar.

Os insetos são comuns, diversos e amplamente distribuídos (BASSET et al., 2012), embora existam muitos estudos sobre insetos para uso na alimentação animal e humana, o uso dessa biomassa é inexplorado no que diz respeito à sua aplicação como matéria-prima para biorrefinaria, cujo objetivo é a valorização da biomassa através de sua conversão em compostos químicos que podem ser utilizados para ingredientes alimentícios, ração animal, biomateriais, bioenergia e biomoléculas, incluindo enzimas e biossurfactantes (AZAGOH; HUBERT; MEZDOUR, 2015).

Os insetos, principalmente o *Tenebrio molitor*, possuem grande potencial de utilização em diversos processos da atividade humana. Este inseto pertence à família Tenebrionidae e já vem sendo utilizado como fonte nutricional para animais e na dieta humana devido à sua composição rica em proteínas (53,2%) (GHOSH et al., 2017), lipídios (25%) (JAJIĆ et al., 2019) e alto teor de minerais (magnésio, zinco, ferro, cobre) (SIEMIANOWSKA et al., 2013). Alguns estudos relataram o uso de larvas de *Tenebrio molitor* na dieta de um camarão de alto valor agregado *Macrobrachium rosenbergii* (FENG et al., 2019) e também como fonte alternativa de proteína para substituir a farinha de peixe na ração aquática (IACONISI et al., 2017). Outro estudo avaliou seu uso para a geração de novos peptídeos hepatoprotetores (CHO; LEE, 2020).

Entre as possibilidades de obtenção de biomoléculas a partir do uso de insetos, surge grande interesse pelas enzimas de alto valor agregado, que são utilizadas como catalisadores e, portanto, importantes para aplicações em sistemas biológicos e processos industriais, como nas indústrias alimentícia, papel e celulose e farmacêutica (PRADHAN; PADHY; SAHOO, 2017), com destaque para a L-asparaginase, que além de seu uso em alimentos (ação anticrilmida), é importante na indústria farmacêutica, pois vem sendo utilizada como agente quimioterápico para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (FARAG et al., 2015) por esgotar a L-asparagina no organismo, cujo fornecimento exógeno é necessário para o

crescimento de certos tumores (VERVLIET; PARYS, 2019).

Na produção de enzimas, vem aumentando o uso do processo de fermentação em estado sólido (FES), que é caracterizada por ocorrer na ausência ou quase ausência de água livre, porém em quantidades suficientes para proporcionar o crescimento microbiano e as atividades metabólicas de suas células, em um meio sólido inerte que desempenha o papel de suporte físico e como fonte de nutrientes necessários para a manutenção da vida do microrganismo (ALJAMMAS; FATHI; ALKHALAF, 2018). A produção de L-asparaginase por fungos em FES é promissora por ser considerada segura pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JOINT et al., 2006) e alcançou relevância devido aos seus benefícios ambientais e econômicos (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017).

Outras biomoléculas de interesse são os biossurfactantes, que para sua obtenção o uso de extração líquida e fermentação submersa (FS) são duas abordagens comuns (TWIGG et al., 2020). A FS é utilizada por ser um processo realizado em meio líquido otimizado com nutrientes, inserindo microrganismos para seu crescimento e desenvolvimento para obtenção de bioprodutos com alto valor agregado (DORIYA et al., 2016), sendo que diferentes microrganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus* e as leveduras são comumente utilizadas, pois os metabólitos obtidos possuem características biofisicamente vantajosas, pois auxiliam os microrganismos em seu desenvolvimento celular, regulando a pressão osmótica e compondo o biofilme, além de contribuir para a sobrevivência do microrganismo quando submetido a condições desfavoráveis de desenvolvimento (CHAPRÃO et al., 2015; RABODONIRINA et al., 2019; VIEIRA et al., 2021; PHULPOTO et al., 2021).

Além de ser uma fonte de proteína nutricionalmente valiosa e apresentar potencial de uso para obtenção de biomoléculas como enzimas e biossurfactantes, os insetos podem ser utilizados em processos de descontaminação ambiental. Yi et al. (2013) em seu trabalho avaliou as frações de proteínas solúveis em água de 5 espécies de insetos (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus* e *Blaptica dubia*), sendo que os resultados obtidos mostraram que as proteínas dos insetos avaliados são capazes de formar emulsões e géis, propriedades essas de grande valor para descontaminação de ambientes contaminados com óleo.

O presente trabalho representa o primeiro estudo sobre o uso da biomassa de *Tenebrio molitor* (TMB) para a produção de enzimas e biossurfactantes de alto valor agregado por fermentação e extração. Para produtos enzimáticos, L-asparaginase por FES fúngica usando uma cepa de *Penicillium* sp. LAMAI-505. O biossurfactante proveniente da extração de *Tenebrio molitor* e também por FS utilizando uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, testando a eficácia deste produto para descontaminação ambiental.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir L-asparaginase e biossurfactante utilizando biomassa de *Tenebrio molitor* (TMB) como fonte de carbono por fermentação e extração líquida.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da hidrólise sobre a TMB;
- Avaliar o uso da TMB como fonte primária em extração e como fonte de carbono para fermentações;
- Avaliar e comparar o biossurfactante extraído de TMB com detergentes comerciais;
- Avaliar aplicação do biossurfactante de TMB em processo de descontaminação ambiental.

3 Revisão bibliográfica

3.1 *Tenebrio molitor*

O *Tenebrio molitor* popularmente chamado de bicho-da-farinha, é um inseto pertencente à família Tenebrionidae, da ordem Coleoptera, que exibe holometabolismo (metamorfose completa) dividido em 4 fases: fase embrião (ovos), fase larvar, fase de pupa e a fase adulta, se desenvolve preferencialmente nas regiões temperadas do hemisfério norte e é uma praga de farinha, grãos e alimentos armazenados (RAMOS-ELORDUY et al., 2002; SPANG; FRANCIS, 2013). Considerado um inseto de fácil criação por apresentar alta taxa de reprodução e capacidade de se alimentar de diversos tipos de alimentos torna-se pertinente o estudo do desenvolvimento de colônias desse inseto (GHALY; ALKOAİK, 2009; YANG et al., 2018).

Há um aumento significativo de publicações relacionadas ao *Tenebrio molitor* sendo que os principais focos desses estudos estão associados ao uso desse inseto como fonte de alimento e substituto de rações animais tradicionais, devido sua riqueza nutricional (alto teor proteico e lipídico) as larvas desse inseto são utilizadas como fonte de alimento para animais, incluindo pássaros, répteis, pequenos mamíferos, batráquios e peixes. Comumente são servidas vivas, contudo, também são vendidos enlatados, secos ou em pó (MARIOD; MIRGHANI; HUSSEIN, 2017; VELDKAMP et al., 2012). A Tabela 1 mostra a composição nutricional média encontrada na literatura.

Tabela 1 – Composição nutricional (%) do *Tenebrio molitor* na literatura

Proteína	Gordura	Fibra	Cinza	Extrato sem nitrogênio	Umidade	Referência
51,05	32,09	4,36	4,09	4,41	4,00	(ZHAO et al., 2016)
49,80	37,11	—	3,50	6,79	2,80	(KIM; WEAVER; CHOI, 2016)
55,83	25,19	7,15	4,84	3,68	3,31	(JAJIĆ et al., 2019)
42,90	37,00	—	3,60	8,50	8,00	(CRUZ et al., 2022)

No que diz respeito aos insetos comestíveis o *Tenebrio molitor* está entre os mais promissores para produção em larga escala (RUMBOS et al., 2020), por possuir ciclo de desenvolvimento curto (idade adulta em 70 dias e uma fêmea pode produzir 160 ovos em

seu ciclo de vida), alta taxa de conversão de matéria-prima (GRAU; VILCINSKAS; JOOP, 2017; HONG; HAN; KIM, 2020), fácil cultivo e não demanda grande área (aproximadamente 3,6 metros quadrados por ano para um kg de larva) (SON et al., 2020).

Quando comparadas a comida tradicional rica em proteína como a carne, as larvas do bicho-da-farinha (Figura 1), apresentam vantagens como o uso de recursos naturais (terra e água) para seu cultivo é menor do que em outros animais (MADAU et al., 2020), são considerados uma fonte de alimento sustentável (SMETANA; SPYKMAN; HEINZ, 2021), podem ser cultivados usando diferentes níveis de tecnologia e insumos financeiros, contribuem para a reciclagem de nutrientes usando resíduos orgânicos como fonte de alimento (GOLD et al., 2020), sendo capazes de reduzir os níveis de substâncias potencialmente poluidoras do substrato em que são criados (PARODI et al., 2021).

Figura 1 – *Tenebrio molitor*



Fonte: Autor, 2022

Esta matéria-prima é uma fonte valiosa de compostos bioativos que apresenta potencial para ser utilizado em biorrefinarias de insetos. Portanto, devido alto teor de proteína desse inseto, que possui todos os aminoácidos essenciais, boa digestibilidade, solubilidade e capacidade de emulsificação, representa uma fonte alternativa interessante para consumo crescente e novas aplicações, seja como componente da alimentação humana e animal ou como matéria-prima para processos fermentativos ou de extração de diferentes moléculas de alto valor agregado, como enzimas e biossurfactantes (AZAGOH; HUBERT; MEZDOUR, 2015; RAJENDRAN et al., 2018; GIROTTO; COSSU, 2019). No entanto, esses compostos bioativos têm sido pouco investigados, eles precisam ser mais explorados para uma valorização desse inseto como biomassa.

3.2 Produção de insetos

Para viabilidade da produção de insetos é necessário que o produtor tenha conhecimento sobre a biologia e fisiologia da sua cultura, sempre avaliando as características nutricionais da espécie arraçoada de acordo com o produto final que deseja se obter. Os principais critérios para escolha das espécies a serem cultivadas deve levar em consideração o teor de proteína e volume de biomassa a ser produzido, o custo da alimentação (avaliando a possibilidade de uso de resíduos e dejetos), a tecnologia empregada para atender às necessidades de cada espécie com objetivo de controlar de forma eficiente o ciclo de vida, necessidades ambientais, ferramentas para coleta e manejo reprodutivo ([RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013](#)).

A produção de insetos apresenta inúmeras vantagens com relação a criação de outros animais, como alta taxa de conversão alimentar, que nada mais é que a capacidade de converter alimentação em massa corporal. Em comparação ao gado de corte, por exemplo, que consegue converter aproximadamente 8 kg de alimento em 1 kg de ganho de peso, os insetos são bem mais eficientes, convertendo entre 1,5 a 2 kg de alimento em 1 kg de ganho de peso, e fazem isso eliminando aproximadamente 100 vezes menos óxido nitroso (um agravante do efeito estufa) ([EFSA, 2015](#)).

Outras vantagens da criação de insetos são a redução significativa no consumo de água, menores áreas para criação, emitem baixas quantidades de gases do efeito estufa, apresentam poucas questões relacionadas a bem-estar do animal, baixo risco de transmissão de infecção por zoonoses, podem ser criados utilizando resíduos orgânicos para sua alimentação consumindo assim alimentos e subprodutos industriais desperdiçados contribuindo para redução de impactos ambientais negativos, não competem diretamente com os alimentos para consumo humano, são facilmente transportáveis, relativamente fáceis de gerir e apresentam potencial para gerar retornos financeiros altos ([OONINCX et al., 2010](#); [OONINCX; BOER, 2012](#); [VELDKAMP et al., 2012](#); [HUIS, 2013](#)).

A geração de resíduos sólidos, sejam eles domésticos, industriais ou agrícolas, tem aumentado exigindo a necessidade de alternativas para sua destinação correta. O Brasil é um dos principais produtores mundiais de produtos agrícolas e consequentemente é um dos principais geradores de subprodutos ([AZEVEDO et al., 2022](#)). Como já citado os insetos apresentam potencial de uso para consumo de subprodutos gerados nas cadeias produtivas agrícolas e industriais, com isso a produção de insetos pode ser uma alternativa para biodegradação valorização desses resíduos reduzindo o impacto ambiental relacionado à destinação e contribuindo diretamente para os padrões sustentáveis de produção animal.

Muitos benefícios gerados pelo consumo de insetos ainda não são investigados como os resultantes de compostos bioativos com características antioxidantes, antimicrobianas, anti hipertensivas e fibras alimentares prebióticas. Apesar das potenciais vantagens fornecidas o consumo de insetos não é completamente seguro, pois também não existem muitos estudos

sobre os possíveis efeitos adversos como presença de substâncias alergênicas, tóxicas ou antinutrientes (BORGES et al., 2022).

Apesar de apresentar grande potencial para diversas aplicações como alimentação humana, ração para animais e fonte de matéria-prima pra processos para obtenção de produtos de alto valor agregado, ainda há muito a ser desenvolvido para evoluírem os sistemas de produção de insetos de modo a serem destinados a escala maiores. De certa forma, eles precisam ser domesticados e como outros animais nem todas as espécies de insetos comestíveis podem ser domesticadas.

3.3 Produtos capazes de gerar valor agregado a biomassa

A quantidade de resíduos gerados em todo o mundo continua a aumentar para atender as demandas do consumo humano. Uma gestão ruim desses resíduos pode contribuir para diversas ameaças ambientais e problemas econômicos (FERRONATO; TORRETTA, 2019). Assim, um planejamento adequado de descarte e redução de resíduos é necessário para gerenciar as enormes quantidades geradas de forma segura e sustentável, com uma emissão mínima de gases de efeito estufa. Entre os resíduos descartados existem os orgânicos que apresentam potencial para uso em biorrefinarias para obtenção de produtos de alto valor agregado como enzimas, biocombustíveis, surfactantes, resinas e fertilizantes (RAKSASAT et al., 2020).

O uso de insetos capazes de adicionar valor agregado para biomassas tem sido cada vez mais comum, como no trabalho de Wong et al. (2021) que realizou a valorização assistida de resíduos de endosperma de coco, tratados por *Rhizopus oligosporus* via fermentações in situ e ex situ juntamente com bioconversão em valiosa biomassa larval de mosca soldado negro para produção de biodiesel. A biomassa dessa larva também tem sido explorada como matéria-prima para um processo de transesterificação através do uso de um co-solvente com o objetivo de reduzir o consumo de energia do processo de extração de gordura e melhorar os rendimentos de conversão de biodiesel (NGUYEN et al., 2018).

Existem insetos e vermes que possuem a capacidade de degradar resíduos orgânicos para obter materiais digeridos de alta qualidade que podem ser usados como fertilizante orgânico. Zhang et al. (2014) relataram que, além de produzir adubo orgânico, moscas domésticas também contribuíram de forma eficiente para redução da concentração de antibióticos presentes no esterco suíno após um ciclo típico de 6 dias, mostrando o potencial de uso dos insetos para a biorremediação de resíduos contaminados.

A criação de insetos apesar de considerada sustentável gera resíduos, esses dejetos de insetos geralmente são convertidos em fertilizante de plantas, porém, Bulak et al. (2020) em seu trabalho avaliou o uso dos resíduos provenientes da criação de três espécies diferentes de insetos: *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor* e *Gryllus* spp, para produção de metano por

meio da digestão anaeróbica, comprovando a aplicabilidade de resíduos de pós-produção de criação de insetos para geração de biogás.

Um inseto que tem uso consagrado é o *Dactylopius coccus*, o qual se extrai um corante natural de cor vermelha, que tem sido utilizado em objetos do patrimônio cultural (por exemplo, têxteis e pinturas) desde a antiguidade (GRAAFF; ROELOFS; BOMMEL, 2004). O ácido carmínico (principal pigmento da cochonilha) é um corante natural que pode ser obtido a partir dos corpos secos de fêmeas da espécie *Dactylopius coccus* Costa, que se alimentam de cactos selvagens (*Opuntia* spp) e possui uso nas indústrias cosméticas, alimentícias, farmacêuticas e também aplicações têxteis e plásticas por ser permitido pela maioria das legislações de alimentos de diversos países, como por exemplo, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e a Comunidade Econômica Européia, cujo código de identificação de aditivo alimentar é E-120 (JALÓN; PEÑA; RIVAS, 1989; BORGES et al., 2012).

Outro importante processo envolvendo o uso de insetos é a extração realizada para obtenção de quitina e quitosana. A quitina é um biopolímero, biodegradável, não tóxico e altamente insolúvel na maioria dos solventes polares e não polares, que quando passa por um tratamento com NaOH concentrado em condições extremas possibilita a obtenção de quitosana via desacetilação (KUMIRSKA et al., 2010). A quitosana, derivada da quitina, é um copolímero, polissacarídeo natural, não tóxico, biodegradável e biocompatível com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Devido essas propriedades ambas moléculas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, cosmética e biomédica, também possuem aplicação na agricultura e no tratamento de águas residuais (SOON et al., 2018).

3.4 L-asparaginase

A L-asparaginase (E.C.3.5.1.1) é uma enzima comumente tetramétrica, descoberta em 1953 por Kidd, que possui a capacidade de hidrolisar o grupo amida da cadeia do aminoácido L-asparagina, obtendo como produtos da reação o ácido aspártico e amônia, seus efeitos antineoplásicos resultam da redução da concentração de asparagina plasmática que é essencial para o desenvolvimento das células malignas, por isso tornou-se um importante componente na quimioterapia para o tratamento de LLA infantil (WLODARCZYK, ; YAP; LEE; TING, 2021).

Essa enzima pode ser obtida a partir de vários organismos como plantas, animais, fungos filamentosos, leveduras, bactérias e arqueobactérias, porém ela não é sintetizada de forma natural em seres humanos, por isso a necessidade de desenvolver técnicas para produção dessa enzima (DORIYA et al., 2016). Devido sua grande relevância e necessidade de produção em larga escala para atender a demanda mundial diversos estudos vêm sendo realizados para seleção de microrganismos produtores, como no trabalho de Lopes et al. (2015) que observaram a capacidade de obtenção de L-asparaginase a partir de 67 microrganismos, entre eles 45 tipos de bactérias e 22 tipos de fungos (fungos filamentosos e leveduras).

A produção dessa enzima depende de vários parâmetros que variam para cada tipo de organismo, sendo que a concentração de fontes de carbono e de nitrogênio, o pH do meio de cultura, temperatura, tipo de fermentação, tempo, agitação e a taxa de transferência de oxigênio. A Tabela 2 mostra as condições de cultivo para produção de L-asparaginase por diversos microrganismos.

Tabela 2 – Parâmetros de cultivo para produção de L-asparaginase

Microrganismos	Fontes de carbono % (w/v)	Parâmetros de produção	Atividade	Referências
<i>Bacillus licheniformis</i>	KH ₂ PO ₄ (0,3); MgSO ₄ .7H ₂ O (0,05); L-asparagina (4,0); Glicerol (0,2)	pH 6,0; 37°C 200 rpm; 18 h	32,26 U/mL	(MAHAJAN et al., 2012)
<i>Cladosporium</i> sp.	Farelo de milho	pH 8,0; 30°C 48 h	3,74 U/mL	(KUMAR; SOBHA, 2012)
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	Peptona (1,0) Ex. levedura (0,5)	pH 5,5 - 7,0 24 °C	2,25 U/mL	(KOTZIA; LABROU, 2007)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Glicose (0,2) L-asparagina (1,0)	pH 5,0; 72 h 30 °C; 140 rpm	18,24 U/gds	(YAP; LEE; TING, 2021)
<i>Serratia marcescens</i>	Torta de óleo de coco (7,6)	pH 7,4; 96 h 35,5 °C	5,86 U/gds	(GHOSH et al., 2013)

Fonte: Autor, (2022)

Ainda que diversos microrganismos sejam capazes de produzir L-asparaginase existem limitações para seu uso no que diz respeito a aplicações terapêuticas, principalmente da enzima obtida por bactérias, por causa dos efeitos colaterais como alergia, vômito, trombose, disfunção hepática e outras reações ligadas a hipersensibilidade, fazendo com que a enzima não seja aprovada pelos requisitos exigidos pelas agências regulatórias (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; LOPES et al., 2015; BATOOL et al., 2016). Com isso a L-asparaginase fúngica por apresentar propriedades distintas das enzimas bacterianas e se assemelharem das proteínas humanas, surgem como alternativa com intuito de reduzir os efeitos adversos da L-asparaginase provinda de bactérias.

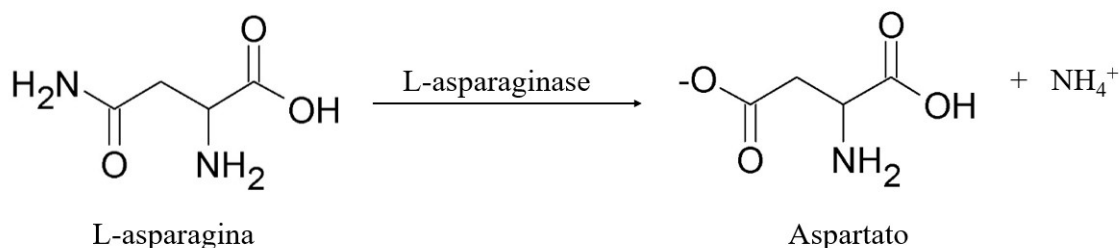
A L-asparaginase tem sido utilizada como um biofármaco anti-tumoral clinicamente eficiente para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e sarcoma linfático (CHAKRAVARTY et al., 2022). Na indústria de alimentos é utilizada no controle de acrilamida (AC) em produtos processados em altas temperaturas (YASSIN et al., 2022).

3.4.1 Uso terapêutico

Há mais de trinta anos a enzima L-asparaginase vem sendo utilizada como agente quimioterapêutico para o tratamento de diversas enfermidades como a leucemia linfoblástica aguda principalmente em crianças, doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda e leucemia linfocítica crônica, tratamento com linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma, devido sua capacidade de catalisar a reação da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia (THENMOZHI et al., 2011; FARAG et al., 2015).

A Figura 2 mostra a ação da enzima L-asparaginase responsável por catalisar a hidrólise do nitrogênio do grupo amida da cadeia lateral do aminoácido, cortando parte do suprimento das células tumorais impedindo assim que essas cresçam e ganhem força, diminuindo o desenvolvimento do câncer usando o aminoácido L-asparagina (BERG, 2011). As células doentes exibem crescimento desenfreado se existir suprimento constante de nutrientes e é exatamente sobre a parte nutricional dessas células que a L-asparaginase vai agir como agente quimioterápico (EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014).

Figura 2 – Reação catalisada pela enzima L-Asparaginase



Fonte: Adaptado de Narta, Kanwar e Azmi (2007).

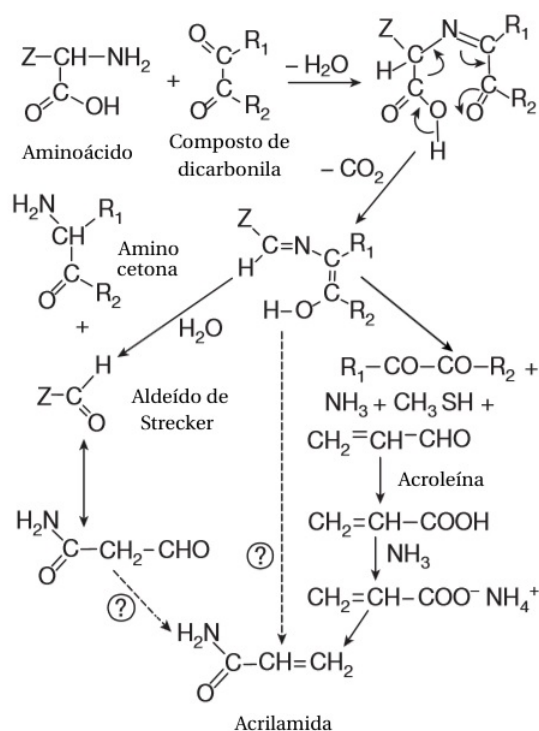
A L-asparaginase pode ser encontrada na forma de medicamento, sendo que os principais existentes no mercado são Elspar[®], Crasnitin[®] e Kidrolase[®] (de origem de *E. coli*) e Erwinase[®] (de origem de *E. chrysanthemi*) (SHRIVASTAVA et al., 2016). O tratamento dos pacientes afetados pela LLA passa pelo procedimento de quimioterapia com L-asparaginase, em que a mesma é injetada por via intravenosa ou intramuscular com objetivo de esgotar os teores de L-asparagina disponíveis no plasma, reduzindo as chances de crescimento das células malignas (HEO; SYED; KEAM, 2019). Por ser considerada eficaz no tratamento antitumoral cada vez mais surge a necessidade de estudos que buscam a obtenção dessa enzima a partir de variadas fontes, movimentando pesquisas tanto em universidades quanto na indústria farmacêutica (BRUMANO et al., 2019).

3.4.2 Uso na indústria de alimentos

Além do seu uso na indústria farmacêutica, vêm crescendo a utilização da L-asparaginase como aditivo alimentar no processamento de alimentos em determinadas condições. A L-asparagina e os açúcares redutores presentes na composição de alguns alimentos, quando submetidos a elevadas temperaturas sintetizam uma substância que apresenta grande potencial carcinogênico chamada acrilamida (PAUL; TIWARY, 2020).

Por possuir efeitos neurotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos a AC é classificada como possível carcinogênico em humanos pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC). Esta substância é formada pela reação de Maillard em alimentos contendo o aminoácido livre L-asparagina e açúcares redutores (Figura 3), como glicose e frutose, aquecidos em temperaturas acima de 120°C e em condições de baixa umidade (TAREKE et al., 2002; GONZÁLEZ-MULERO et al., 2022). Esta reação também forma compostos desejáveis de cor, sabor e aroma em alimentos cozidos ou fritos (THOMAS; THOMAS, 2014). Os principais alimentos que contêm altos teores de acrilamida são: batatas fritas com concentração variando de 272 a 570 µg/kg de AC, produtos de panificação com variação de 75 a 1044 µg/kg de AC e café variando de 229 a 890 µg/kg de AC (HU et al., 2015).

Figura 3 – Caminhos propostos para a formação de acrilamida após a degradação de Strecker do aminoácido asparagina na presença de produtos dicarbonílicos da reação de Maillard.



Fonte: Adaptado de Mottram, Wedzicha e Dodson (2002).

As condições de processamento dos alimentos como a temperatura, umidade, tempo

de cozimento e a composição do produto são os principais fatores que influenciam a produção de AC, com isso inúmeros trabalhos foram realizados para avaliar métodos que são capazes de reduzir a intensidade da reação de Maillard, porém em grande parte os métodos utilizados para esse fim trazem impactos negativos no sabor e na aparência do produto final (BATOOL et al., 2016; CUNHA, 2020).

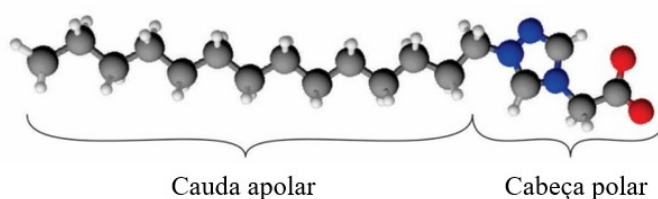
Com o objetivo de minimizar os impactos negativos no sabor e na aparência dos alimentos e ainda inibir a produção de AC o uso da L-asparaginase fúngica é uma técnica com grande potencial por sua capacidade de interferência na reação de Maillard ou até mesmo na remoção de precursores, reduzindo os níveis de L-asparagina na massa dos produtos sem alterar o valor nutricional, aparência ou sabor do produto final (DIAS; AGUILAR; SATO, 2019; CUNHA, 2020).

3.5 Surfactante

Os surfactantes, também conhecidos como agentes tensoativos, são moléculas anfipáticas, ou seja, apresentam em sua composição uma porção hidrofílica (polar) e uma hidrofóbica (apolar) (HUSSAIN et al., 2022). Em virtude de sua constituição apresentam propriedades de limpeza, dispersão, formação de espuma e emulsificação, que os incluam no cotidiano das pessoas por serem os principais componentes de cosméticos, agentes umectantes, emulsificantes, espumantes, catalisadores, detergentes, lubrificantes, os tornando compostos mais produzidos e consumidos no mundo (SIYAL et al., 2020).

Essas moléculas tensoativas (Figura 4) são capazes de diminuir a tensão superficial, adsorver em interfaces sólido-gasoso, sólido-líquido, sólido-sólido, líquido-gasoso ou líquido-líquido. No entanto, na grande maioria das aplicações destes compostos, utiliza-se fase líquida, comumente água (QIN et al., 2022). Assim, o entendimento do comportamento da agregação de surfactantes em água é a base para a compreensão de todos os processos de atividade destas moléculas e, conseqüentemente, de aplicações práticas destes sistemas. Quanto maior a tendência do surfactante em diminuir a energia livre de uma interface, maior a sua capacidade de adsorver nela, e mais tensoativo será esse surfactante (HOLMBERG BO JONSSON; LINDMAN, 2002).

Figura 4 – Estrutura de um surfactante



Fonte: Adaptado de Diniz (2019).

Além de reduzir a tensão superficial, os surfactantes são capazes de realizar o fenômeno do emulscionamento de líquidos, que são sistemas dispersivos que ocorrem quando dois líquidos imiscíveis, ou seja, que não se misturam são colocados em contato, nesse caso um dos dois líquidos (a fase interna ou dispersa) encontra-se no interior do outro líquido (fase externa ou contínua) (DALTIM, 2011).

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo, representando riscos ao meio ambiente e aumentando os custos de produção, com objetivo de atender às legislações de controle do meio ambiente associado à preocupação ambiental entre os consumidores, o desenvolvimento de surfactantes naturais vem se tornando necessário. A necessidade por produtos que não agredem de forma tão severa o meio ambiente como os compostos não biodegradáveis, fez com que buscassem a obtenção dos chamados biossurfactantes, compostos de origem microbiana obtidos via fermentação, que vêm se destacando por serem produtos ecologicamente corretos apresentando propriedades físico-químicas semelhantes aos surfactantes de origem sintéticas (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

3.6 Biossurfactantes

Os surfactantes naturais, ou biossurfactantes, provêm da fermentação microbiana, de plantas e animais, embora a quantidade obtida através destas fontes não seja suficiente para serem utilizados em escala industrial (SAMI et al., 2022). Diante dos desafios de produção em larga escala e da redução dos custos do processo produtivo, a utilização de subprodutos agrícolas e industriais como matéria-prima para biorrefinaria está sendo cada vez mais realizada, tornando possível obter produtos de alto valor agregado com menores custos produtivos, gerando lucro e menos impacto ao meio ambiente (NAZARETH et al., 2021).

Ao comparar os biossurfactantes e os surfactantes sintetizados industrialmente, os agentes tensoativos de origem microbiana apresentam diversas vantagens, tais como: baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, elevada capacidade espumante, maior seletividade, atividade específica a temperaturas extremas, pH e salinidade (KASHIF et al., 2022). Devido à característica de redução de tensão superficial dos biossurfactantes, esses compostos aumentam a solubilidade e a área de contato dos elementos insolúveis, a sua mobilidade, biodisponibilidade e biodegradação, sendo uma escolha interessante em várias aplicações físico-químicas e biológicas nas indústrias cosmética, farmacêutica, biotecnológica, agrícola, alimentícia e petrolífera (ABBOT et al., 2022).

Atualmente os biossurfactantes são classificados em compostos de primeira e segunda geração, de acordo com sua origem. Os de primeira geração também chamados de “surfactantes verdes” são os compostos extraídos e purificados de matérias-primas vegetais e animais ou obtidos através de recursos renováveis por sínteses químicas. Já os biossur-

factantes de segunda geração são produzidos por processos fermentativos e de extração a partir de recursos renováveis, tendo como principais exemplos os surfactantes microbianos (MARCELINO, 2016).

As classificações e características físico-químicas dos biosurfactantes dependem de seus atributos estruturais, que geralmente são compostas por cadeia hidrocarbônica com um ou mais ácidos graxos, podendo ser saturados ou insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato. As propriedades estruturais dessas biomoléculas são dependentes de inúmeras variáveis, sendo que o microrganismo produtor é uma das mais relevantes (ABBOT et al., 2022). A Tabela 3 mostra as principais classes de biosurfactantes com exemplo dos microrganismos produtores.

Tabela 3 – Classificação dos biosurfactantes por microrganismo produtor

Tipo de biosurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
Raminolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trealoselipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Soforoselipídios	<i>Rhodococcus ruber</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Biosurfactantes Poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-Proteína- Lipídeo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter spp</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: Adaptado de Desai e Banat (1997)

Apesar de existir produção de biosurfactantes em escala industrial, ela é limitada devido alto custo do processo. O substrato representa de 30 a 50% do valor final do produto, com isso surge a necessidade de encontrar substratos de baixo custo e avaliar em conjunto cepas de alta produção, otimização desse meio de cultura e melhoria dos processos fermentativos visando tornar menos oneroso a obtenção do biosurfactante (NAZARETH et al., 2021). É possível encontrar diversos trabalhos na literatura com esse objetivo, como por exemplo Gurjar e Sengupta (2015) utilizou resíduo de polimento de moinho de arroz (um resíduo

agrícola abundante e barato) como substrato para o crescimento de *Bacillus subtilis* MTCC 2423 por fermentação submersa para produção de surfactina, obtendo como melhor resultado rendimento recuperável de surfactina de 4,17 g/kg de resíduo. [Chen et al. \(2018\)](#) em seu estudo avaliou o uso de óleo residual de cozinha como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* para produção de ramnolipídio e uso desse produto para a remoção de borra de óleo em tecido de algodão, obtendo taxas de remoção de 34,13%. Os resultados encontrados nesses trabalhos demonstram que a produção de biossurfactante a partir de substratos de baixo valor agregado são promissores, com vantagens de bom desempenho, baixo custo e segurança ambiental.

3.7 Fermentações

3.7.1 Fermentação submersa (FS)

Os processos fermentativos apresentam grande relevância na história da humanidade há milhares de anos, desde a produção de alimentos e bebidas (pão e vinho), quanto ao cenário atual que conta com uso de microrganismos para obtenção de diversos produtos de alto valor agregado, como por exemplo etanol, biodiesel, enzimas e biossurfactantes.

A FS é um processo que ocorre com alto teor de água livre, no qual os microrganismos são inseridos e se desenvolvem nesse meio líquido nutritivo para obtenção de bioprodutos. Tal processo possui equipamentos bem estabelecidos, reatores fechados contendo meio de fermentação e alta concentração de oxigênio e dão preferência ao uso de bactérias, pois são mais adaptadas a locais com umidade elevadas. Este tipo de fermentação pode ser realizado em frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial ([KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013](#); [DORIYA et al., 2016](#)).

Diversos trabalhos são encontrados na literatura no que diz respeito a obtenção de biomoléculas através da FS. Como por exemplo a produção em escala industrial do vinagre, em que a FS requer cepas de microrganismos robustas que são capazes de oxidar o etanol sob condições seletivas para produzir ácido acético de alto título. Como no trabalho de [Es-sbata et al. \(2022\)](#) que utilizou pêra espinhosa (*Opuntia ficus-indica*) para produção de vinagre em FS empregando as bactérias *Acetobacter malorum* e *Gluconobacter oxydans* em três diferentes temperaturas de acetificação (30°C, 37°C e 40°C). Com o aumento da temperatura as concentrações dos compostos voláteis foram claramente menores e a maioria dos compostos fenólicos contidos nos vinagres de *Acetobacter malorum* foram superiores aos de *Gluconobacter oxydans*.

Outro exemplo de aplicação da FS é a produção em larga escala de L-asparaginase, que para atender à crescente demanda global utiliza a *Escherichia coli* e a *Erwinia chrysanthemi* para sua produção comercial. [Kenari, Alemzadeh e Maghsodi \(2011\)](#) em seus estudos ava-

liaram a produção de L-asparaginase de *Escherichia coli* ATCC 11303, obtendo atividade enzimática máxima 1,03 U/mL, nas condições otimizadas por metodologia de superfície de resposta de: 1,08% de lactose, 1,79% de triptona, 1,6% de extrato de levedura, 2% de KH_2PO_4 e 0,19% de l-asparagina.

Apesar de ser mais comum o uso de resíduos agroindustriais em processos de FES, existem estudos na literatura usam esses materiais para FS. Como no trabalho de [Rastogi et al. \(2021\)](#) que utilizou extrato de casca de laranja como substrato para o *Bacillus haynesii* E1 para produção de biossurfactante sob FS e aplicação na descontaminação ambiental de Pb^{2+} . O estudo conseguiu mostrar uma alternativa para o gerenciamento de resíduos biológicos como substrato de baixo custo para produção de biossurfactante (3,7 g/L) por *Bacillus haynesii* E1 e que esse produto tem potencial para biorremediação de Pb^{2+} , sendo que em condições ótimas conseguiu uma remoção biossortiva de 99,05% desses íons.

Devido à facilidade de manuseio e maior controle sobre os parâmetros ambientais, os processos biológicos realizados em FS apresentam vantagens notáveis em termos de instrumentação e controle no que diz respeito aos parâmetros de pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de moléculas hidrossolúveis, aeração e escalonamento ([FARINAS, 2015](#)). Sendo assim, por apresentar controle das condições ambientais relativamente simples algumas enzimas industrialmente significativas como a L-asparaginase têm sido historicamente obtidas a partir de FS ([SIROHI et al., 2018](#)). Contudo, esse processo apresenta desvantagens como altos custos de produção, energia e custo operacional, baixos rendimentos do produto, geração de efluentes em excesso e, com isso, grandes volumes de águas residuais, além da problemática que ocorre quando o produto de interesse é produzido de forma extracelular, obtendo-se uma preparação mais diluída, sendo necessária a inclusão de uma etapa de concentração mais trabalhosa no processo de purificação ([CACHUMBA, 2017](#)).

3.7.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A economia brasileira é fundamentada no setor agrícola, produzindo e exportando diversos produtos como café, açúcar, soja e grande variedade de frutas gerando assim enormes quantidades de resíduos. Devido sua riqueza nutricional, esses resíduos apresentam grande potencial de uso em processos biotecnológicos para obtenção de produtos de alto valor agregado, por isso o processo de FES vem contribuindo notadamente para utilização desses resíduos ([YAFETTO, 2022](#)).

Com umidade apenas suficiente para garantir o crescimento celular e as atividades metabólicas dos microrganismos a FES é um processo fermentativo que pode ocorrer de duas maneiras, a primeira ocorre utilizando um material sólido é de origem natural que tem as funções de suporte e de fonte de energia e nutrientes; já a segunda o material sólido funciona apenas como um suporte físico inerte sendo necessário impregnar uma solução nutritiva para o microrganismo ([SOCCOL et al., 2017](#); [ALJAMMAS; FATHI; ALKHALAF, 2018](#)).

Essa tecnologia viabiliza a utilização de substratos sólidos para a biotransformação, na presença de microrganismos específicos, para a produção de bioprodutos com alto valor agregado, como por exemplo enzimas, biossurfactantes, biopesticidas, bioplásticos, fármacos, metabólicos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma (CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009; JIMÉNEZ-PEÑALVER et al., 2016; EL-BAKRY; GEA; SÁNCHEZ, 2016; CERDA et al., 2019). Este biotratamento pode ser empregado também na produção de alimentos visando favorecer os compostos bioativos presentes, como vitaminas e fenólicos que apresentam atividade antioxidante (STARZYŃSKA-JANISZEWSKA et al., 2019).

As vantagens existentes da FES com relação a FS justificam o interesse em se aplicar cada vez mais essa tecnologia, sendo possível citar as vantagens ambientais como a utilização de resíduos agroindustriais como suporte inerte colaborando para destinação final mais sustentável e menor produção de efluentes (SINGHANIA et al., 2009). Outros pontos positivos que podem ser destacados são que devido a menor quantidade de água é um processo mais resistente a contaminação bacteriana e é mais fácil de se realizar a esterilização do meio; com relação a obtenção dos produtos de interesse a FES possibilita maior produtividade enzimática para inúmeras enzimas devido maior qualidade e atividade dos extratos; não há necessidade de solventes orgânicos (que geralmente conferem algum grau de toxicidade ao extrato); menores custos de capital e operacionais; processamento a jusante reduzido e agitação reduzida (SINGHANIA et al., 2009; MARTINS et al., 2011).

Várias classes de microrganismos podem ser utilizadas no processo de FES, abrangendo fungos, bactérias e leveduras. Entretanto, por possuir suportes inertes que se assemelham ao habitat natural dos fungos e de algumas leveduras, os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, e leveduras do gênero *Candida*, *Saccharomyces* e *Aureobasidium* são os mais utilizados pois possibilita melhor adaptação e desenvolvimento dos mesmos (YAZID et al., 2017).

Na literatura científica, inúmeros estudos a cerca da produção de enzimas por FES podem ser encontrados, sendo que nesses estudos são empregados os mais variados tipos de resíduos e diferentes tipos de microrganismos. Hu et al. (2018) em seus estudos investigaram a produção de celulase a partir de resíduos têxteis por *Aspergillus niger* CKB e nas condições otimizadas com pH 7,29, temperatura de 28°C e tempo de fermentação de 6 dias, obteve a atividade máxima da celulase de 1,56 U/g. Bagewadi, Mulla e Ninnekar (2017) avaliaram a produção de celulases por *Trichoderma harzianum* utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas em FES sendo que entre os resíduos avaliados o sorgo sacarino foi o melhor, obtendo atividade enzimática das enzimas celulíticas CMCase e FPase de 30,32 U/gms e 5,56 U/gms, respectivamente.

Finkler et al. (2017) utilizaram uma mistura de substratos com 27 kg de farelo de trigo e 3 kg de bagaço de cana (massa seca) em biorreator de leito empacotado, utilizando o *Aspergillus niger* como microrganismo produtor. A maior resposta obtida foi atividade

de 22 U/g de pectinase, concluindo assim que o uso desse consorcio entre biomassas com biorreatores de leito empacotado é uma estratégia promissora para a produção de pectinases em FES.

Outras enzimas que podem ser obtidas através da FES são as lipases. [Vargas \(2004\)](#) produziram em seu trabalho lipase de *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato, sendo que as condições que possibilitaram atividade enzimática máxima (30 U/g) foram tempo de fermentação de 80 h, 27,5°C e 55% de umidade. [Domínguez et al. \(2003\)](#) avaliaram a produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* por FES, sendo que entre o substrato de farelo de cevada e nozes trituradas, as nozes foram as mais responsivas possibilitando a atividade enzimática de 69 U/g em 10 dias de fermentação.

[Kumar, Ramasamy e Manonmani \(2013\)](#) em seus estudos investigaram produção de L-asparaginase de *Cladosporium* sp. em FES, empregando farelo de trigo, farelo de arroz e bagaço como substratos. Com tempo de fermentação de 120 h e condições aeróbicas otimizadas usando a metodologia de superfície de resposta (RSM) indicando que com teor de umidade de 58%, pH de 5,8, temperatura de 30°C é possível obter rendimento enzimático máximo de 3,74 U.

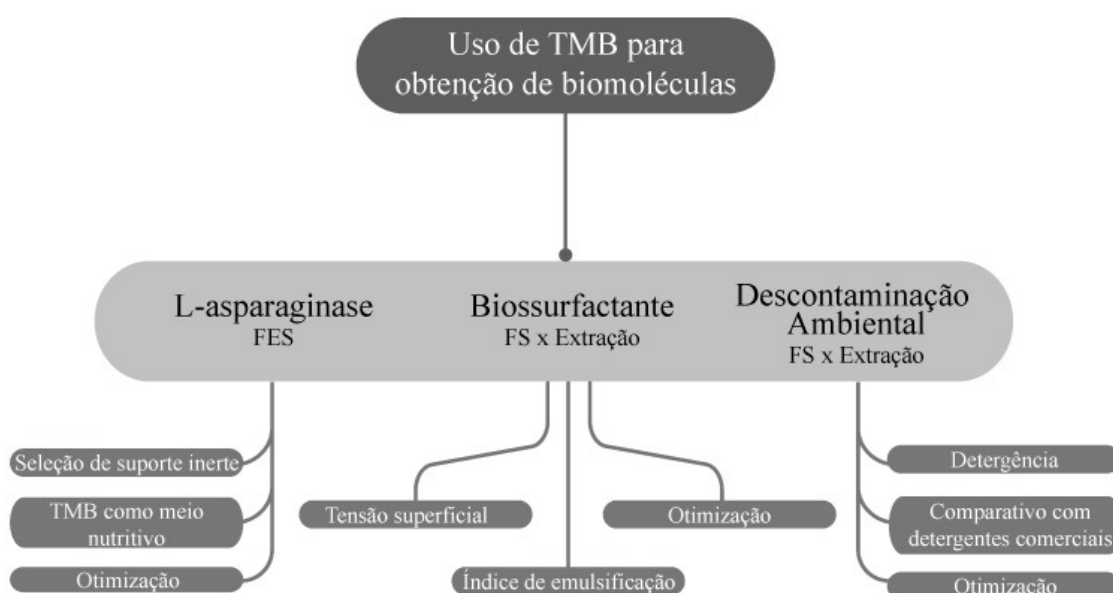
Além de resíduos agroindustriais existe a possibilidade de utilizar suportes inertes que não contém em sua composição nutrientes, sendo necessário assim impregnar nesse material a solução nutritiva. [Vieira et al. \(2020\)](#) usaram como suporte inerte a espuma de poliuretano e disponibilizou como solução nutritiva glicose e L-asparagina, obtendo produção máxima de L-asparaginase de 13,7 U/g na condição otimizada com pH de 5,1, temperatura de 40°C e umidade de 80%.

4 Material e Métodos

No presente trabalho todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata, sendo que a média foi utilizada como valor representativo e os erros ilustrados nos gráficos referem-se aos desvios-padrões.

O fluxograma indicado na Figura 5 exibe como foi realizada as etapas de execução do trabalho.

Figura 5 – Fluxograma referente ao material e os métodos utilizados



Fonte: Autor, (2022).

4.1 Microrganismos e meios de cultura

O microrganismo produtor de L-asparaginase utilizado foi o *Penicillium* sp. LAMAI-505 obtido do Centro de Recursos Microbianos do Instituto de Biotecnologia da UNESP, Instituto de Biotecnologia (CRM - UNESP). As culturas foram armazenadas em placa de Petri devidamente esterilizada, com meio nutritivo Czapek sólido, contendo a concentração de nutrientes em g/L de NaNO₃, 2,0; K₂HPO₄, 1,0; MgSO₄, 0,5; KCl, 0,5; FeSO₄, 0,01; sacarose, 30,0 e agar, 20,0.

O microrganismo utilizado para produção de biossurfactante foi a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, fornecida pela Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tosello (Campinas - SP), mantida em meio ágar nutriente contendo concentrações em g/L de sacarose, 20,0; extrato de carne, 3,0; peptona de carne bacteriológica, 5,0 e ágar, 20,0.

Para a utilização das células do *Penicillium* sp. LAMAI-505 após o período de cultivo, foi realizada a preparação do pré-inóculo para a FES, em que ocorreu a transferência celular para reatores cônicos com capacidade de 250 mL com uma solução de 100 mL de meio Czapek, contendo a concentração de nutrientes em g/L de NaNO₃, 2,0; K₂HPO₄, 1,0; MgSO₄, 0,5; KCl, 0,5; FeSO₄, 0,01; Sacarose, 30,0. Já o pré-inóculo para FS utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi realizado transferindo o material celular para reatores cônicos com capacidade de 250 mL com uma solução de 100 mL contendo nutrientes nas concentrações em g/L de NH₄NO₃, 5,7; MgSO₄.7H₂O, 0,2; Na₂HPO₄, 7,0; KH₂PO₄, 3,0; glicose, 20,0 e extrato de levedura, 11,0. Ambos os meios foram previamente autoclavados a 121°C durante 20 minutos. O cultivo em meio líquido foi realizado em mesa agitadora a 150 rpm em temperatura ambiente (25°C ± 2°C) e o tempo de fermentação foi de 48 horas, garantindo crescimento e aumento da concentração celular. Após preparação do pré-inóculo, o fermentado foi centrifugado e as células recolocadas em suspensão em 100 mL de água destilada estéril, as quais foram então, utilizadas nos processos fermentativos. O sobrenadante foi descartado nesta etapa.

4.2 Preparação da biomassa de *Tenebrio molitor*

A biomassa de *Tenebrio molitor* (TMB) foi obtida da empresa Tenebrio Brasil como biomassa de larva desidratada com composição descrita na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização química da biomassa

Umidade	5,45%
Proteína bruta	59,91%
Lipídeos	26,14%
Matéria fibrosa	4,79%
Matéria mineral	3,59%

Fonte: Informação nutricional da embalagem, (2022)

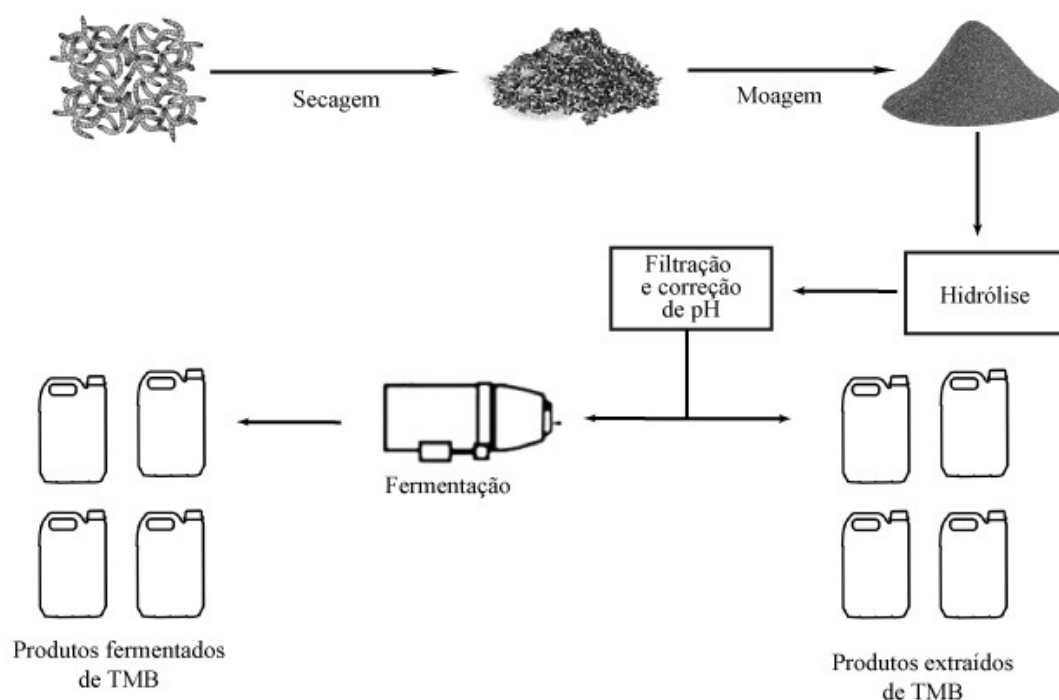
Para a obtenção da solução de *Tenebrio molitor* foi realizada a moagem das larvas secas através do uso de um pistilo (Figura 6), esse procedimento foi realizado visando aumentar a eficiência do processo de hidrólise, deixando o material com maior superfície de contato e facilitando a quebra e inserção dos nutrientes contidos nas larvas para a solução ao fim do processo.

Figura 6 – Moagem das larvas de *Tenebrio molitor*

Fonte: Autor, (2022).

A Figura 7 mostra detalhes das etapas que caracterizam a preparação de biomassa para a produção de L-asparaginase e biossurfactante bruto e para uso ambiental. A produção de enzimas e biossurfactantes foi avaliada a partir da fração solúvel de TMB obtida após tratamento a 120°C por 30 minutos com e sem adição de 1% (v/v) de H₂SO₄ (ZHAO et al., 2018). Após a conclusão do processo de hidrólise foi realizada a filtração da solução com a utilização de uma bomba de sucção, um Kitasato contendo um Funil de Büchner na presença de um papel filtro com poros de 25 µm, obtendo assim o meio nutritivo a ser utilizado nos processos fermentativos. O efeito da solubilização do TMB, antes e após o processo hidrolítico, foi avaliado por meio de espectroscopia no infravermelho (espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum Two, com acessório de reflexão total atenuado - ATR).

Figura 7 – Fluxograma referente ao processo da biomassa

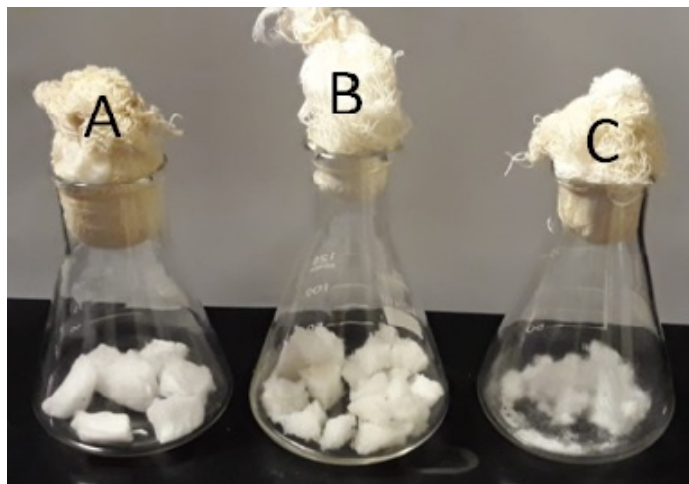


Fonte: Autor, (2022).

4.3 Suportes sólidos utilizados FES

Foram utilizados três suportes sólidos na FES para a produção de L-asparaginase a fibra cerâmica, a espuma de poliuretana e a lã de vidro. A Figura 8 mostra os biorreatores estáticos com capacidade de 125 mL, contendo os suportes sólidos utilizados nas FES.

Figura 8 – Suportes sólidos inertes



Nota: A - Biorreator com suporte sólido inerte de fibra cerâmica; B - Biorreator com suporte sólido inerte de espuma de poliuretana; C - Biorreator com suporte sólido inerte de lã de vidro. Fonte: Autor, (2022).

4.4 Condições de fermentação

A Tabela 5 mostra detalhes das condições experimentais utilizadas para avaliar a produção de L-asparaginase e biossurfactante por, respectivamente, FES e FS. A FES foi realizado a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em reator estático e rotativo utilizando suportes sólidos inertes e *Penicillium* sp. LAMAI-505 com concentrações celulares ajustadas para 10^6 esporos/mL por metodologia espectrofotométrica (curva de calibração com absorbância em 530 nm), conforme descrito por [Espinell-Ingroff e Kerkerling \(1991\)](#) e [Aberkane \(2002\)](#). A FS foi realizada a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ usando *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, inoculado com 10^7 células/mL em um reator de frasco cônico de 250 mL ([SILVA et al., 2010](#)).

Tabela 5 – Condições de fermentação usadas

Testes	Suportes (kg/m ³)	Biorreator (rpm)	Biomassa ^a (g/gds)	Glicerol (g/gds)	pH	Tempo
1 ao 12	4	-	0,1 a 0,5	0,1	1,5 a 6,0	48 h
13 ao 18	4	-	0,5	0,05	1,5	48 h
19 ao 30	4	-	0,5 a 0,15	0,05 a 0,020	6,0	48 h
31 ao 42	4	-	0,5 a 0,15	0,05 a 0,020	1,5	48 h
43 ao 49	4	-	0,10	0,15	0,5 a 6,0 ^b	48 h
50 ao 53	4	-	0,10	0,15	1,5	24 a 96 h
54 ao 57	4	5	0,10	0,15	1,5	24 a 96 h
58 ao 73 ^c	-	150	10,0 a 100,0	-	5,8	48 h
74	-	-	-	-	7,0	-
75	-	-	50,0	-	5,8	48h
76	-	-	50,0	-	5,8	48h
77	-	150	50,0	-	5,8	48h
78	-	150	50,0	-	5,8	48h
79	-	-	-	-	7,0	-
80	-	-	-	-	7,0	-

Nota: ^a testes 1 ao 57, g/g; testes 58 ao 80, g/L; ^b pH corrigido com solução de NaOH 5M, ^c testes com diferentes concentrações de 10, 20, 50 e 100 g/L, para avaliar tensão superficial e índice de emulsificação, em cada concentração foi realizado um teste avaliando a biomassa pura (teste controle, CT), biomassa hidrolisada (HCT), biomassa como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (PB) e biomassa após hidrólise como fonte de carbono (HB), todas as fermentações foram conduzidas a 25± 2 °C.

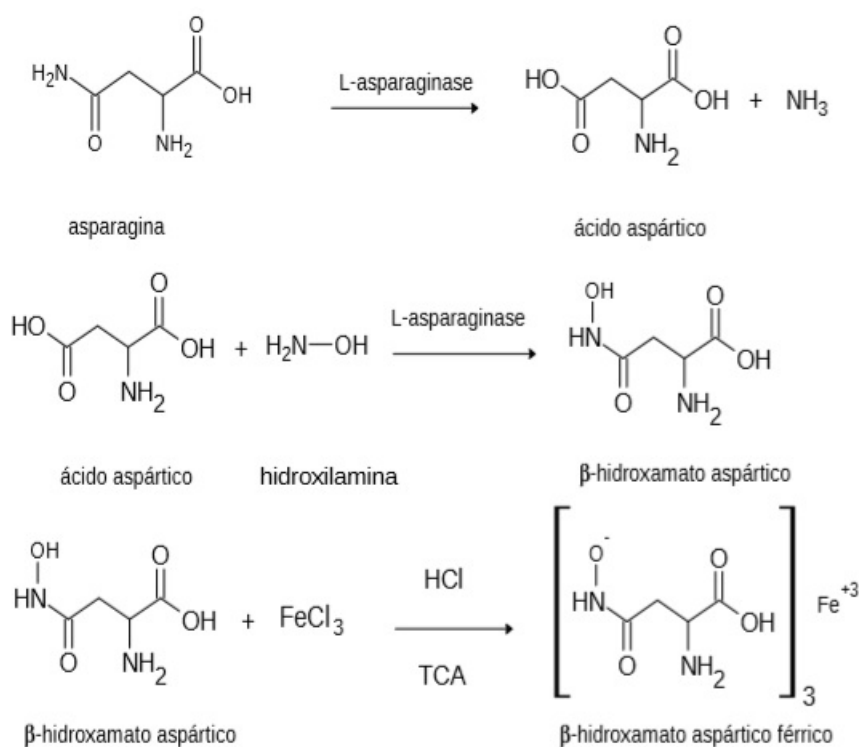
Nas FES foram utilizados diferentes configurações de reatores biológicos isotérmicos na produção de L-asparaginase, com relação à fermentação estática foi utilizado biorreator de bancada (testes 1 ao 53) e para fermentação com uso de biorreator mantido sob rotação a 5 rpm foi confeccionado um biorreator rotativo (testes 54 ao 57). O processo fermentativo no reator estático foi utilizado para realização de estudos comparativos das FES em fibra cerâmica, poliuretana e lã de vidro. Além disso, a fermentação estática foi utilizada na otimização do meio nutritivo e das condições operacionais (concentração de *Tenebrio molitor*, glicerol, pH e tempo) com células imobilizadas. Já na FES realizada com biorreator rotativo, apenas a condição otimizada pelo processo anterior foi utilizada.

No que diz respeito à produção de biossurfactantes foram realizados ensaios que avaliaram a tensão superficial e índice de emulsificação (testes de 58 a 73), sendo que foi utilizado o mesmo ensaio de fermentação ou extração (a depender do teste) para ambas análises. Já a avaliação dos ensaios de descontaminação ambiental foi realizado um estudo comparativo entre o biossurfactante obtido por extração direta da TMB, do biossurfactante da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 utilizando a TMB como meio nutritivo para FS e de dois detergentes comerciais.

4.5 Análise da L-asparaginase

A L-asparaginase foi avaliada em ensaios de atividade enzimática utilizando hidroxilamina conforme descrito por [Drainas, Kinghorn e Pateman \(1977\)](#). A Figura 9 apresenta as reações que ocorrem durante o processo de quantificação da atividade enzimática da L-asparaginase, em que o aminoácido L-asparagina na presença da enzima L-asparaginase é convertida em ácido aspártico e amônia, o ácido aspártico na presença de hidroxilamina é convertido em β -hidroxamato aspártico, que na presença de cloreto férrico em meio contendo ácido tricloroacético e ácido clorídrico é convertido em β -hidroxamato aspártico férrico, sendo essa molécula identificada pela leitura no espectrofotômetro.

Figura 9 – Reações para a quantificação de L-asparaginase



Fonte: Adaptado de [Elshafei \(2012\)](#)

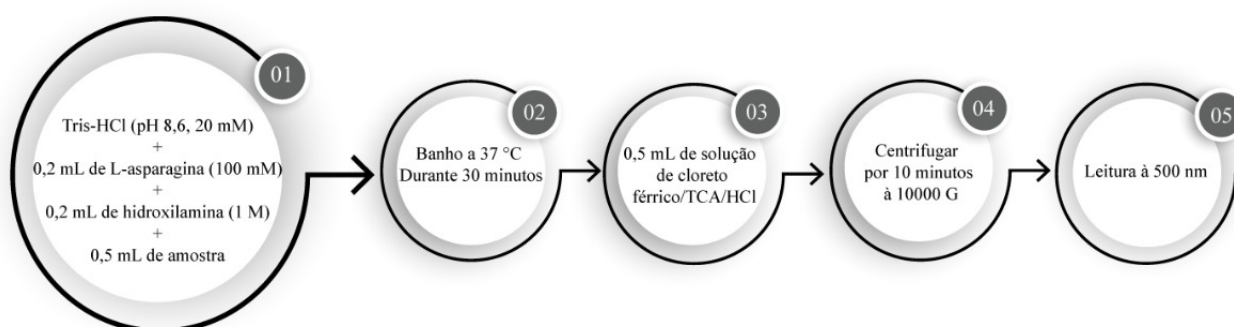
Nestes ensaios, 0,5 mL de amostra de enzima foi misturada em 1,5 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,6, 20 mM), 0,2 mL de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL de hidroxilamina (1 M), foi incubada por 30 minutos a uma temperatura de 37 °C. A reação foi terminada com adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico (10%) em meio contendo ácido tricloroacético(5%) e ácido clorídrico (0,66 M). O meio foi centrifugado por 10 minutos (10000 g, Avanti J-26XP Series) e em seguida o teor de ácido β -hidroxilamico foi obtido por espectrofotometria (500 nm, espectrofotômetro UV-MINI-1240). A unidade enzimática foi definida como 1 μ mol/min de ácido β -hidroxilamico produzido e a atividade calculada como mostra na Equação (4.1) ([DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977](#); [DIVINO, 2015](#)).

$$\lambda \left(\frac{U}{gds} \right) = 1000 \times \left(\frac{\delta \times Vol_{Ext} \times F_{Diluição}}{Vol_{Amostra} \times 0,4 \times \theta \times m_{Sólido}} \right) \quad (4.1)$$

Sendo que λ representa a atividade em U/gds, δ é a leitura de absorbância a 500 nm, Vol_{Ext} é o volume de extração, solução tween 80 (1 %), $F_{Diluição}$ é o fator de diluição das amostra que foram analisadas, $Vol_{Amostra}$ é o volume da amostra inserida na reação de análise de L-asparaginase, θ representa o tempo de incubação e o $m_{Sólido}$ é a massa de suporte sólido utilizada na FES.

A Figura 10 representa o diagrama simplificado das etapas adotadas no procedimento de análise enzimática da L-asparaginase.

Figura 10 – Procedimento de análise da L-asparaginase



Fonte: Adaptado de [Pinheiro \(2017\)](#).

4.6 Avaliação da produção de biossurfactantes

O biossurfactante foi medido em termos de índice de emulsificação, tensão superficial e detergência.

4.6.1 Tensão superficial

Para obtenção da tensão superficial amostras (25 mL) do meio de fermentação foram centrifugadas a 7741 G-force e 25°C utilizando uma centrífuga da marca Bekman Coulter J-25 durante 20 minutos para a remoção das células e obtenção de um sobrenadante. Aproximadamente 15 mL do sobrenadante obtido, foram colocadas em placas Petri à temperatura ambiente e realizadas as análises com o auxílio de um tensiômetro, previamente calibrado com álcool etílico. A realização da leitura em triplicata no tensiômetro, foi feita utilizando-se um anel de platina-iridium de 2 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura, sendo este, imerso na superfície das amostras colocadas nas placas de Petri ([VAIDYA; NARVÁEZ, 2014](#)).

4.6.2 Índice de emulsificação

Para fazer uma avaliação da formação de biossurfactante, foi realizado o teste de índice de emulsificação conforme o método descrito por [Cooper e Goldenberg \(1987\)](#). Esse índice foi obtido a partir da mistura e agitação no vórtex (marca Phoenix, modelo AP56) por 2 minutos de 3 mL do meio apolar querosene e óleo de motor, com o 2 mL de sobrenadante do meio fermentativo centrifugado durante 20 minutos a 7741 G-force na centrífuga da marca Bekman Coulter J-25, em um tubo de ensaio. Assim, após 24 horas de repouso desse tubo de ensaio, o índice de emulsificação foi obtido em triplicata pela Equação (4.2):

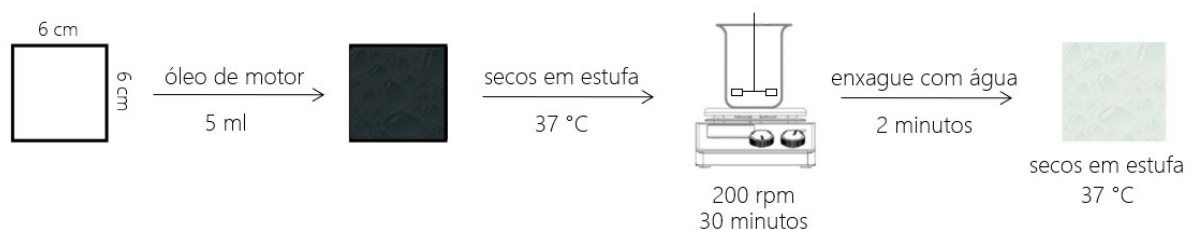
$$E_I = \frac{E}{E_T} * 100 \quad (4.2)$$

E_I representa o índice de emulsificação e o E e E_T , respectivamente, a altura da camada emulsificada e a altura total da mistura na cuba.

4.6.3 Ensaios de detergência (descontaminação ambiental)

Por fim, para avaliar a detergência, foram realizados testes de lavagem com tecido de algodão branco (6 cm × 6 cm), ao qual foram adicionados 5 mL de óleo de motor e depois secos em estufa a 37 °C. Após a secagem, foram submetidos a um processo de limpeza utilizando um agitador magnético para simular o processo de lavagem, realizado em temperatura ambiente, com rotação de 200 rpm e duração de lavagem de 30 min. Após a incubação, os tecidos de algodão foram removidos, lavados com água da torneira por 2 min e secos a 37°C até peso constante (Figura 11).

Figura 11 – Processo de descontaminação ambiental



Autor, (2022)

A porcentagem de remoção de cada mancha foi calculada usando os pesos precisos dos tecidos de algodão antes e depois da lavagem conforme a Equação (4.3) ([FEI et al., 2019](#)):

$$Detergência (\%) = \frac{C - B}{A - B} * 100 \quad (4.3)$$

Sendo que A é o peso de um tecido sujo, B é o peso de um tecido branco e C é o peso de um tecido sujo após a lavagem. As soluções utilizadas para o processo de lavagem foram água, teste de controle (CT), teste de controle hidrolisado (HCT), TMB antes e após hidrólise, PB e HB, respectivamente, como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, nessas amostras, com exceção da água, o acetato de etila foi usado para extrair o surfactante. A fim de comparar este novo surfactante foram selecionados dois detergentes comercialmente disponíveis.

4.7 Análise de dados estatísticos

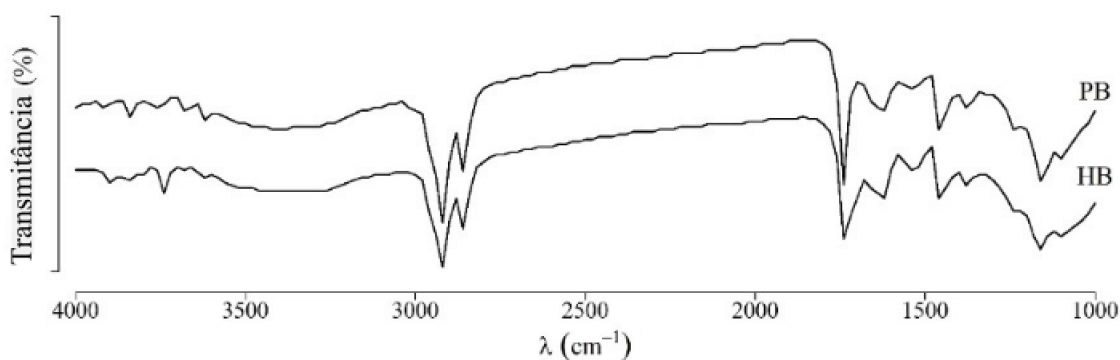
No presente trabalho, todos os testes experimentais foram realizados em triplicata. As médias foram utilizadas como valores representativos e os valores de erro apresentados em todos os gráficos referem-se ao desvio padrão. O teste de Tukey foi realizado com nível de significância de 5% sempre que necessário.

5 Resultados e discussões

5.1 Avaliação da hidrólise do *Tenebrio molitor* por FT-IR

A Figura 12 mostra o resultado do tratamento da biomassa descrito pela fração sólida de TMB antes e após a hidrólise, respectivamente, PB e HB. De acordo com os resultados pode-se observar o alongamento C-H (2878 cm^{-1}), deformações C-H (1420 cm^{-1}), C=O alongamento na amida secundária ($1550, 1625, 1655$ e 1661 cm^{-1}) e C-N alongamento na amida secundária (1320 cm^{-1}), sendo regiões de transmitância significativa para quitina e quitosana, semelhante ao relatado por [Van de Velde, Kathleen and Kiekens, Paul \(2004\)](#) repetidamente e independentemente da fonte (camarão, caranguejo, lagosta, bicho-da-seda ou gafanhoto) nos trabalhos de [Kaya, Baran e Karaarslan \(2015\)](#); [Kumari et al. \(2015\)](#); [Paulino et al. \(2006\)](#) e [Cárdenas et al. \(2004\)](#). Diferentemente, os espectros FT-IR de larvas hidrolisadas contêm os grupos funcionais M-OH (3750 cm^{-1}). Os picos de transmitância relativos a ambas as biomassas são os picos esperados em quitina e quitosana. Esses picos indicam que a hidrólise não modificou a fração sólida remanescente, sugerindo que ela pode ser utilizada como subproduto. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar mais detalhadamente a biomassa sólida.

Figura 12 – FT-IR *Tenebrio molitor* puro e hidrolisado



Nota: PB (biomassa pura) e HB (biomassa hidrolisada).

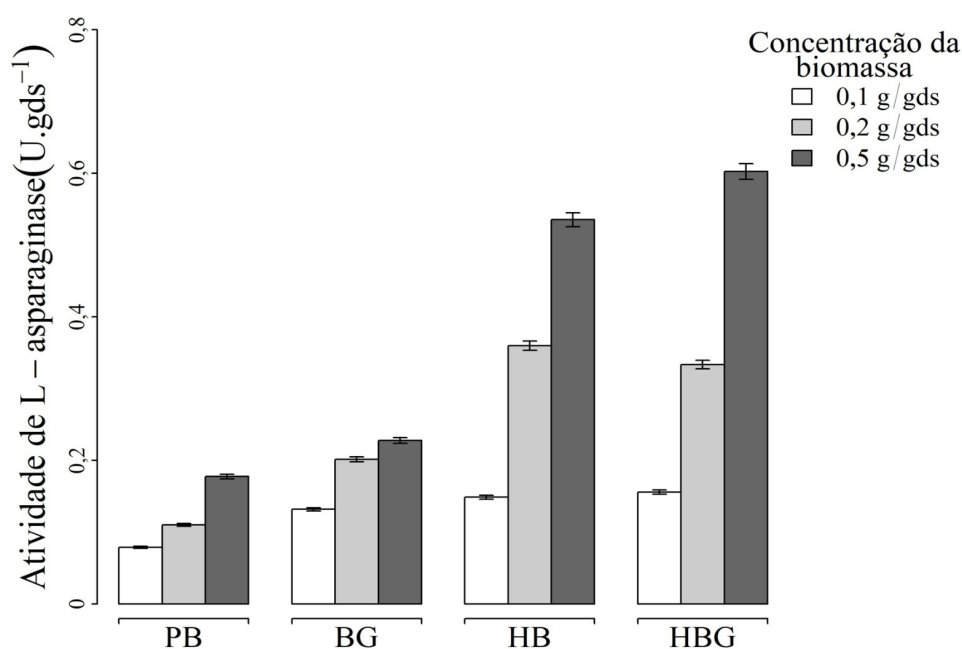
5.2 Avaliação da influência do glicerol e hidrólise da TMB

A Figura 13 mostra a influência do glicerol e hidrólise na produção de L-asparaginase usando TMB. Em relação aos testes sem glicerol, a comparação entre biomassas hidrolisadas e puras, respectivamente, HB e PB, mostram que a hidrólise foi essencial para aumentar a produção de L-asparaginase em todas as concentrações de biomassa, já que em geral os métodos de processo de proteólise, como o tratamento químico, hidrólise enzimática e fermentação

microbiana, podem gerar produtos com maior bioatividade em relação aos materiais não tratados (BOUHAMED; KRICHEN; KECHAOU, 2018). O mesmo pode ser observado nos testes com glicerol na ausência e presença de hidrólise de biomassa, descritos como BG e HBG, respectivamente, exceto para uma concentração de 0,2 g/gds de biomassa. O aumento da produção de L-asparaginase associada ao glicerol é possivelmente consequência de ser uma fonte de carbono complementar (MAHAJAN et al., 2012). Narayana, Kumar e Vijayalakshmi (2008) avaliaram em seu estudo os efeitos de diferentes fontes de carbono como a glicose, frutose, maltose, tralose e glicerol na produção de L-asparaginase, sendo que com a utilização do glicerol foi a segunda mais eficiente onde obtiveram atividade de 2,26 UI/mg de peso seco celular, sendo inferior apenas a maltose (3,74 UI/mg). Pelo processo de hidrólise e glicerol, o ensaio HBG com 0,05 g/gds de biomassa apresentou maior produção de L-asparaginase, 0,60 U/gds.

Outros estudos também apontaram o glicerol como fonte de carbono que permitiu maior produção de L-asparaginase. Kavitha e Vijayalakshmi (2012) testaram diversos meios suplementados para o crescimento e produção de L-asparaginase por *Nocardia levis*, com as fontes de carbono arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, sorbitol, amido, sacarose e xylose, comparados a um cultivo em um meio contendo glicerol 1%. Neste trabalho, o meio basal com glicerol obteve uma produção enzimática de $4,15 \pm 0,063$ U/mg de peso seco, seguido por arabinose ($4,03 \pm 0,16$ U/mg), frutose ($3,9 \pm 0,223$ U/mg) e galactose ($3,75 \pm 0,221$ U/mg), com glicose foi obtida uma atividade de $0,32 \pm 0,016$ U/mg.

Figura 13 – Avaliação do *Penicillium* sp. LAMAI-505 em FES

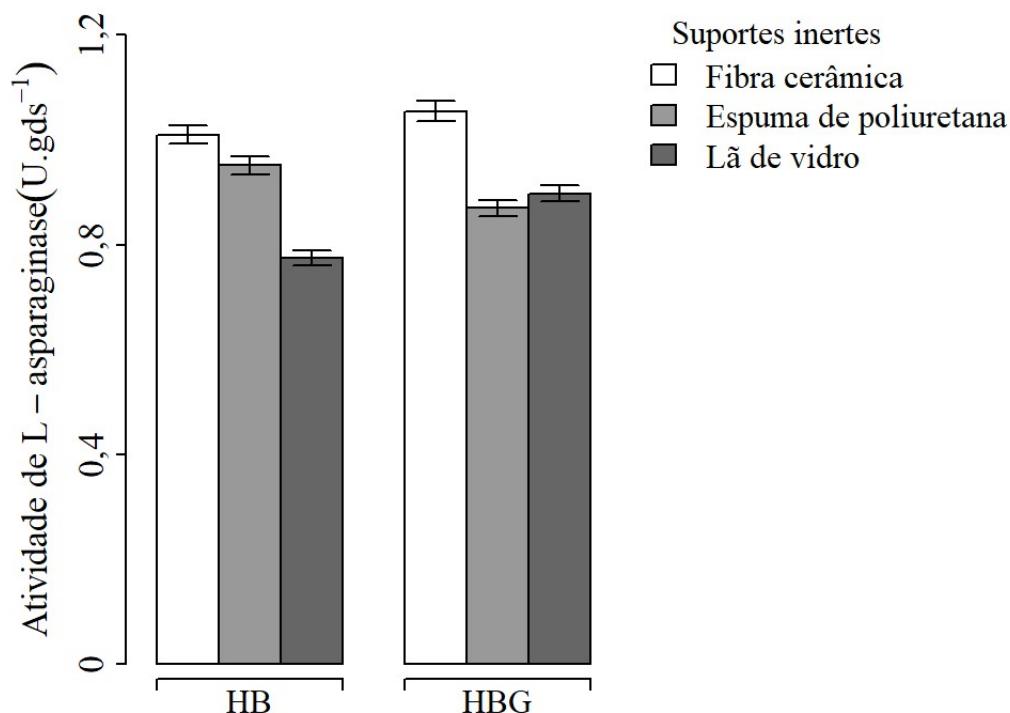


Nota: PB (biomassa pura), BG (biomassa e glicerol), HB (biomassa hidrolisada), HBG (biomassa hidrolisada com glicerol); Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

5.3 Seleção dos suportes sólidos

Com o objetivo de aumentar a atividade de L-asparaginase, foram realizados outros ensaios para avaliar diferentes suportes sólidos inertes (fibra cerâmica, espuma de poliuretano e lã de vidro) em FES utilizando biomassa hidrolisada de *Tenebrio molitor* na concentração de 0,5 g/gds de HB e 0,05 g/gds de glicerol, conforme mostra a Figura 14. Em relação aos suportes, a fibra cerâmica foi a que proporcionou maior adaptação de *Penicillium* sp. LAMAI-505 para produção de L-asparaginase, sendo assim foi escolhida para os ensaios realizados na sequência desse trabalho. Pode-se observar também que o aumento da concentração de glicerol de 0,01 para 0,05 g/gds foi responsável pelo aumento da atividade enzimática em 58% em relação ao melhor resultado dos testes anteriores, obtendo-se assim 1,04 U/gds de enchimento. A atividade de 1,04 U/gds é semelhante à encontrada por [Meghavarnam e Janakiraman \(2017\)](#), obteve 1,08 U/gds utilizando casca de café como fonte de carbono para a produção de L-asparaginase por *Fusarium culmorum* (ASP -87) sob FES. [Nageswara, Guntuku e Tadimalla \(2014\)](#) utilizando biomassas alternativas em FES como casca de arroz, farelo de trigo, torta de coco, casca de grama preta e casca de grama verde alcançaram produção máxima de L-asparaginase com farelo de trigo (33,2 U/gds) e produção mínima com casca de capim preto (7,19 U/gds). O fato do valor obtido neste trabalho ser semelhante ao encontrado em alguns trabalhos da literatura como por exemplo o uso da casca de café, que representa um substrato utilizado em diversos FES ([CERDA et al., 2017](#); [MARÍN](#); [ARTOLA](#); [SÁNCHEZ, 2018](#); [DAS et al., 2021](#)), sugere que o uso da biomassa de *Tenebrio molitor* é promissora.

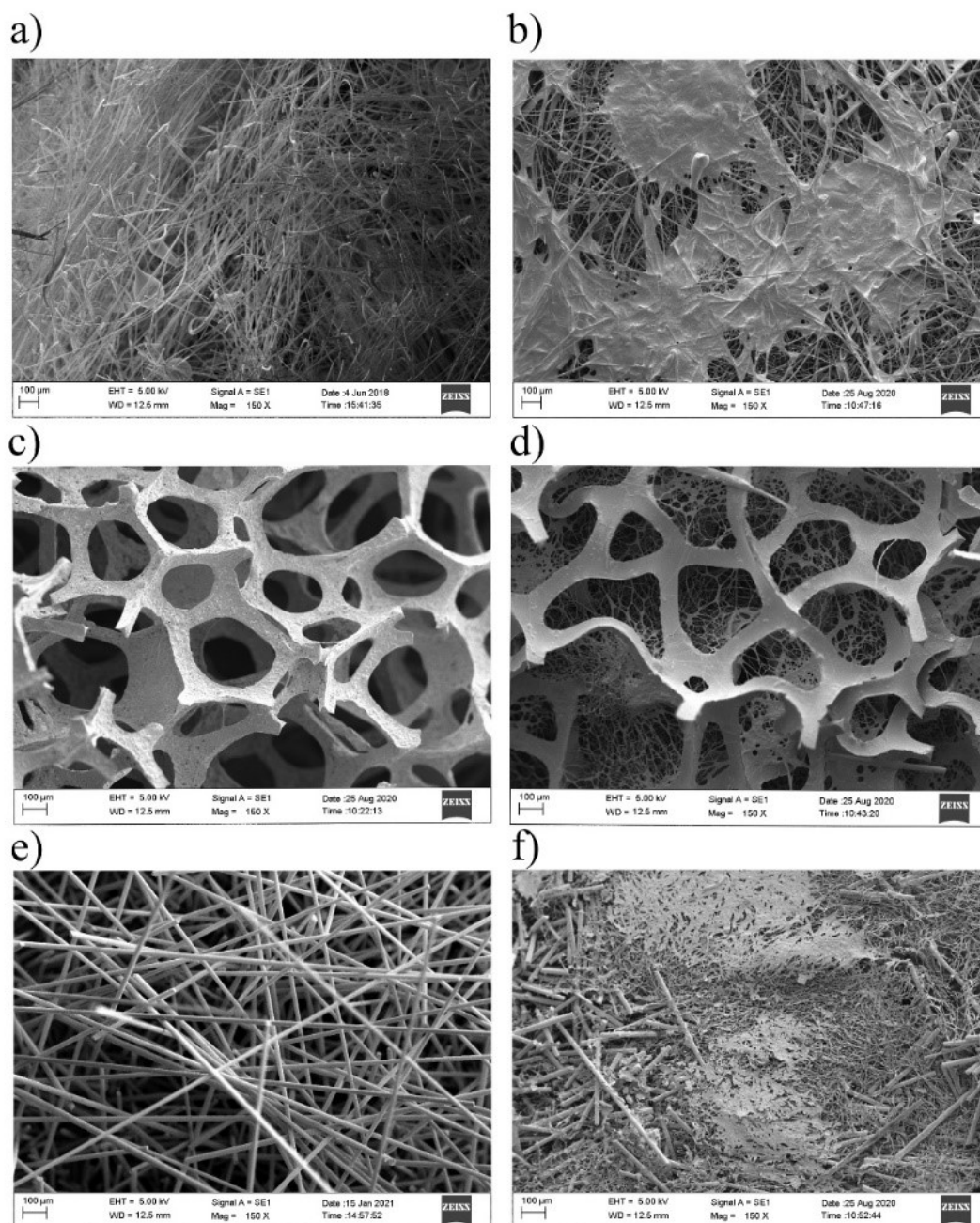
Figura 14 – Avaliação das matrizes sólidas inertes



Nota: Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

A avaliação dos suportes sólidos em microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as condições apresentadas nos ensaios anteriores (ensaios 16, 17 e 18) é apresentada na Figura 15. Observe que a fibra cerâmica possui uma estrutura mais densa e homogênea, favorável ao crescimento de fungos ao longo da superfície (Figuras 15 a) e b)); a espuma de poliuretano possui poros maiores, onde o fungo cresce dentro de sua estrutura (Figuras 15 c) e d)) e a lã de vidro, um material com estrutura de fios mais espaçados que a fibra cerâmica, o crescimento do fungo ocorre em sua superfície (Figuras 15 e) e f)).

Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura dos suportes inertes



5.4 Efeito do meio nutriente na produção de L-asparaginase

A Tabela 6 mostra a avaliação da otimização da produção de L-asparaginase em termos de composições de *Tenebrio molitor* e glicerol (usado como fonte de carbono complementar para TMB) em testes com hidrólise e, para fins comparativos, os resultados nas mesmas concentrações de biomassa na ausência de hidrólise também são apresentados. Foram encontrados nos testes 23 e 37, respectivamente, produção de L-asparaginase de 0,74 e 2,67 U/gds, podendo-se observar que as melhores condições obtidas para a atividade da L-asparaginase foram 3 vezes maiores que as obtidas nos primeiros ensaios, o que mostra a

importância de otimizar a proporção de *Tenebrio molitor* e glicerol como fontes de carbono para a produção de L-asparaginase de *Penicillium* sp. LAMAI-505.

Tabela 6 – Combinações entre glicerol na solução nutritiva e *Tenebrio molitor*

Ensaio	Glicerol (g/gds)	<i>T. molitor</i> (g/gds)	L-asparaginase (U/gds)	
			Sem hidrólise	Com hidrólise
19 (31)	0,05	0,5	0,80	(1,10)
20 (32)	0,010	0,5	1,12	(1,13)
21 (33)	0,015	0,5	0,78	(1,20)
22 (34)	0,020	0,5	0,81	(1,10)
23 (35)	0,05	0,10	0,74	(2,19)
24 (36)	0,010	0,10	0,88	(1,82)
25 (37)	0,015	0,10	1,10	(2,67)
26 (38)	0,020	0,10	0,83	(2,13)
27 (39)	0,05	0,15	1,14	(1,78)
28 (40)	0,010	0,15	1,10	(2,13)
29 (41)	0,015	0,15	1,23	(2,20)
30 (42)	0,020	0,15	1,16	(2,41)

Nota: Os valores entre parênteses representam ensaios com hidrólise; condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$); tempo de fermentação (48h).

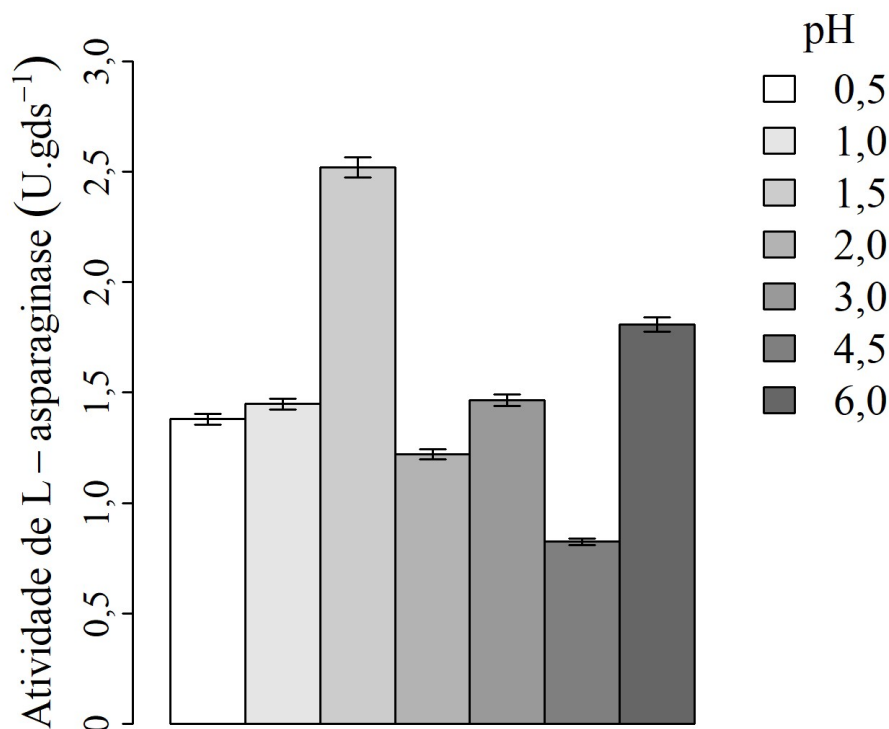
A avaliação deste estudo mostra que a condição que proporcionou o melhor resultado para a produção de L-asparaginase foi quando o fungo apresentou 0,015 g/gds de glicerol e 0,10 g/gds de *Tenebrio molitor* hidrolisado (2,67 U/gds). As concentrações de substrato e fonte de carbono são variáveis que afetam diretamente os parâmetros fisiológicos do fungo, pois a quantidade correta de alimento na dieta do microrganismo pode torná-lo um excelente produtor de enzimas, [Leite, Belo e Salgado \(2021\)](#) afirmam que os elementos do meio de fermentação precisam estar disponíveis em quantidades suficientes para o desenvolvimento do microrganismo e sua síntese enzimática. [Makky e Ali \(2017\)](#) descobriram que o melhor resultado para a produção de L-asparaginase por *Escherichia coli* foi quando eles tinham 0,5 g (1,0% (p/v)) de ossos de frango cozidos como substrato e amido como fonte de carbono. [Ghosh et al. \(2013\)](#) verificaram que 7,6 g de torta de óleo de coco é a faixa de substrato ideal para obtenção de L-asparaginase por *Serratia marcescens*.

5.5 Avaliação efeito pH

A discussão do efeito do pH final após a hidrólise na atividade final da biomassa é apresentada na Figura 16, usando a melhor condição de combinação entre biomassa de *Tenebrio molitor* e glicerol (Teste 37, Tabela 6). Observe que a maior atividade enzimática foi de 2,50 U/gds obtida em pH 1,5. De acordo com [Kumar, Dasu e Pakshirajan \(2011\)](#), a asparaginase comercializada provem da modificação genética de *Erwinia* sp. com maior

atividade em pH ácido, e com *E. coli* com atividade máxima em pH alcalino. O pH é um fator crucial para os processos de fermentação e controle de secreções enzimáticas (EL-GENDY et al., 2021).

Figura 16 – Avaliação do pH



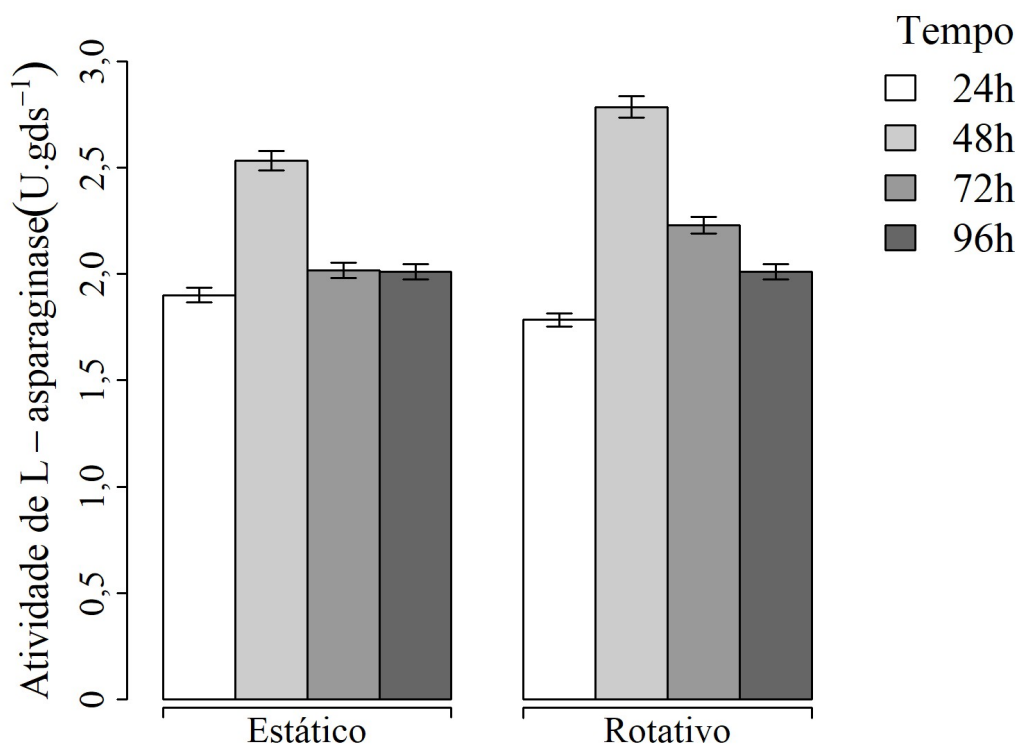
Nota: Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

5.6 Efeito do biorreator rotativo

Embora a atividade de 2,67 U/gds represente um valor satisfatório quando comparado com a literatura, observa-se também que este valor pode ser melhorado conforme mostrado na Figura 17. O uso do biorreator de tambor rotativo mostrou uma melhora na produção de L -asparaginase obtendo 2,75 U/gds e, com exceção da fase inicial de crescimento do fungo nas primeiras 24 horas de fermentação, todas as demais condições no tambor rotativo apresentaram resultados melhores que no biorreator estático, o mesmo observado em Doriya e Kumar (2018), que em seus estudos realizados comparando dois tipos de biorreatores, verificaram a produção de L-asparaginase de *Aspergillus tubingensis* IBBL1, com uso de sementes de algodão como biomassa em biorreator estático de bandeja, após 120 h de fermentação, a maior atividade de L-asparaginase de 16,12 U/gds. Estes autores também

verificaram a aplicação do biorreator rotativo com rotação em 1 rpm, que obteve produção máxima de L-asparaginase de 19,96 U/gds.

Figura 17 – Avaliação do tempo FES para condição otimizada em biorreator estático e rotativo



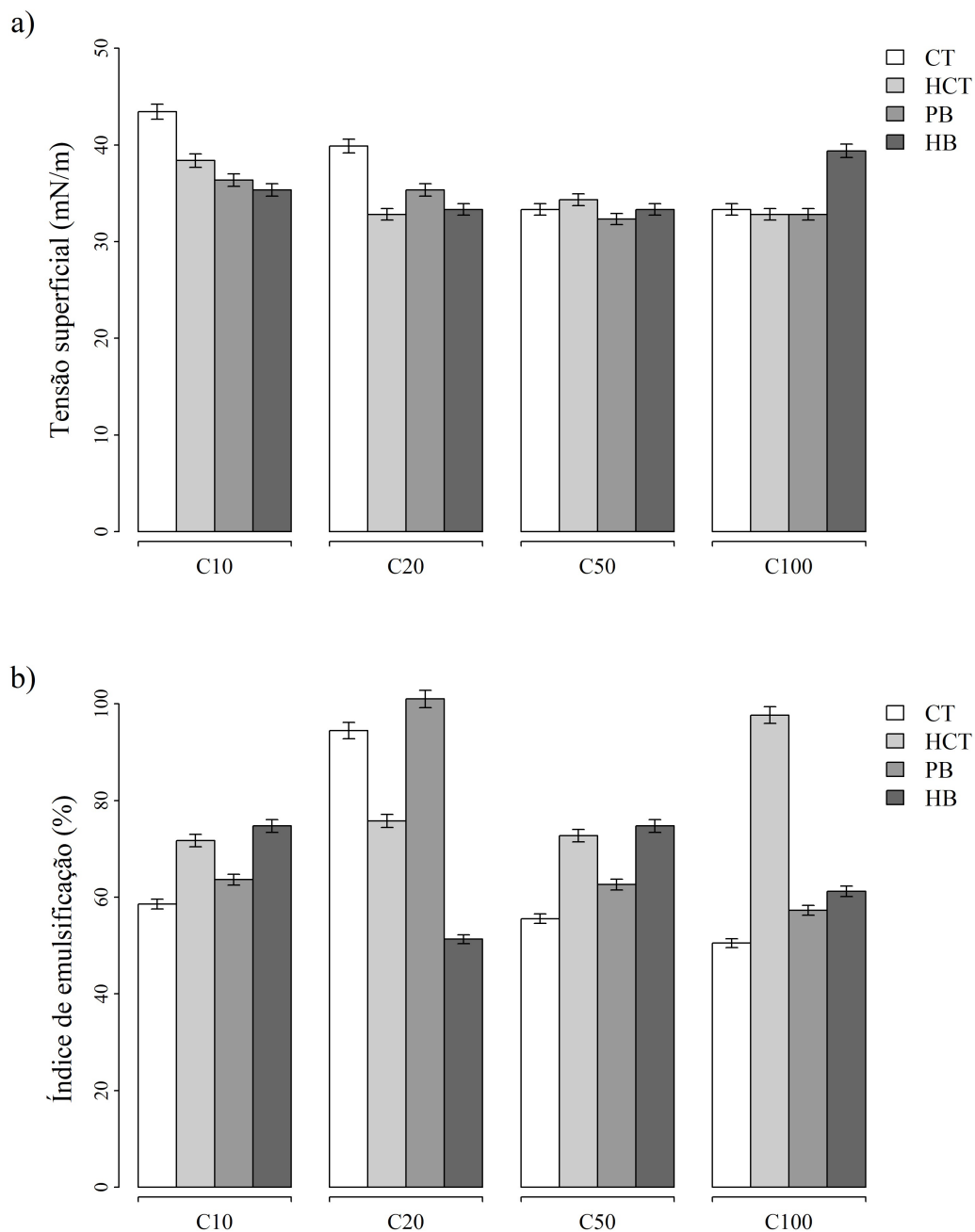
Nota: Condições de temperatura (25°C).

5.7 Avaliação do potencial da biomassa de *Tenebrio molitor* para descontaminação ambiental

A Figura 18 mostra o potencial do TMB em termos de seu uso na descontaminação ambiental associado às suas propriedades tensoativas e emulsificantes. Pode-se observar (Figura 18 a) a tensão superficial de 32,5 mN/m associada ao uso TMB hidrolisada (HCT) na concentração C100 e o resultado de tensão superficial de 32,0 mN/m associado ao uso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (C50, PB) que sugere semelhança das propriedades surfactantes de ambos produtos obtidos considerando que não há diferença entre esses resultados (teste de Tukey, $p=0,05$). Pode-se observar que os resultados de tensão superficial variaram de 32,0 a 43,0 mN/m, o que segundo a literatura é esperado segundo [Kourmentza et al. \(2017\)](#), que mostraram uma redução na tensão superficial para 37,7 mN/m usando óleo de cozinha derivado de girassol alterado por peptona e extrato de levedura como meio de cultura para a cepa *Burkholderia thailandensis*. [Sharuddin et al. \(2021\)](#), utilizaram rizobactérias

bifuncionais de borra de óleo para degradação de hidrocarbonetos, obtendo 32,3 mN/m como a maior capacidade de redução da tensão superficial.

Figura 18 – Índice de emulsão e teste de tensão superficial



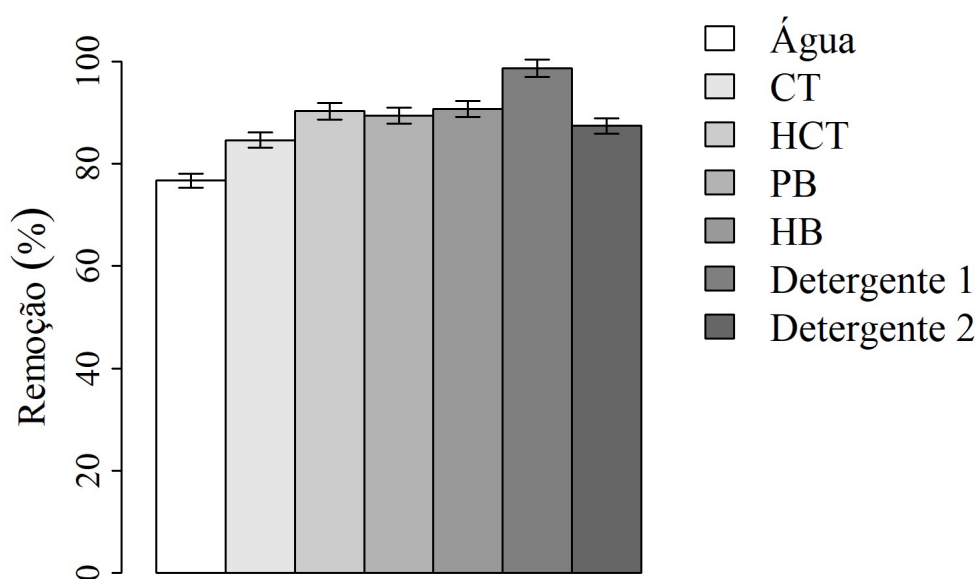
Nota: Índice de emulsão e teste de tensão superficial avaliados com concentrações de 10, 20, 50 e 100 g/L de TMB. Índice de emulsão: querosene como solvente orgânico; temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; tempo de fermentação (48h); $\text{pH} = 5,8 \pm 0,2$.

Na Figura 18 também pode ser observado que o uso do TMB se destaca em termos

de potencial emulsificante. Observa-se que a melhor emulsificação foi 100% no teste PB e 93,5% no teste CT, 20 g/L, e 97% no teste HCT, 100 g/L (Figura 18 b). Esses valores são semelhantes aos resultados descritos na literatura que se referem ao biossurfactante. [Costa et al. \(2010\)](#) obtiveram um índice de emulsificação de 100% usando querosene para diferentes concentrações de surfactante *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 de efluente de mandioca, [Haidar et al. \(2020\)](#) utilizando uma mistura de biossurfactantes de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* obtiveram índice máximo de emulsificação de 75% e [Liu et al. \(2021\)](#) utilizando *Bacillus licheniformis* L20 obtiveram índice de emulsificação de 96% utilizando lactose como fonte de carbono. Assim, pode-se inferir o potencial do *Tenebrio molitor* como tensoativo e como fonte de carbono.

O potencial de uso ambiental do TMB também pode ser observado em termos de propriedades de detergência, conforme mostrado na Figura 19. A biomassa sozinha (CT) foi capaz de remover manchas de óleo de motor com uma remoção de 83,84%, o que comprova seu potencial como agente surfactante, resultado semelhante ao encontrado por [Fei et al. \(2019\)](#), que utilizaram surfactina de *Bacillus subtilis* HSO121 e obtiveram uma taxa de remoção de 77,36%. A taxa de descontaminação do óleo de motor por biomassa hidrolisada (HCT), por biomassa pura como fonte de carbono (PB) e hidrolisado (HB) foi de 89,40%, 88,57% e 89,86%, respectivamente, mostrando que não houve diferença significativa.

Figura 19 – Testes de detergência



Nota: Testes realizados com biomassa de TMB com 50 g/L; temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

6 Conclus

Neste estudo foi investigado o uso da biomassa de inseto referente a sua aplicação como matéria-prima para produção de biomoléculas por extração e fermentação. O *Tenebrio molitor* se mostrou uma biomassa promissora como meio nutritivo em FES, principalmente quando passou por processo de hidrólise, obtendo 2,75 U/gds de atividade para L-asparaginase de *Penicillium* sp. LAMAI-505.

A TMB também mostrou bons resultados como fonte nutritiva para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sendo capaz atingir índice de emulsificação de 100% e redução da tensão superficial para 32,0 mN/m. Além disso, foi demonstrado que as propriedades do biossurfactante bruto extraído da biomassa de insetos apresenta baixa tensão superficial resultando em 32,5 mN/m, alto índice de emulsificação, 97%, resultados semelhantes ao biossurfactante produzido em FS de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. No que diz respeito aos ensaios de detergência a TMB se mostrou promissora para remoção de óleo em tecidos de algodão contaminados, sendo que o ensaio HCT conseguiu melhores taxas de remoção em relação a um dos detergentes comerciais avaliados.

ABBOT, V. et al. A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals. **Heliyon**, Elsevier BV, v. 8, n. 8, p. e10149, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10149>>.

ABERKANE, A. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press (OUP), v. 50, n. 5, p. 719–722, set. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkf187>>.

ALJAMMAS, H. A.; FATHI, H. A.; ALKHALAF, W. Study the influence of culture conditions on rennin production by rhizomucor miehei using solid-state fermentations. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 16, n. 1, p. 213–216, jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.004>>.

AZAGOH, C.; HUBERT, A.; MEZDOUR, S. Insect biorefinery in europe: ‘DESigining the insect bioRefinery to contribute to a more sustainABLE agro-food industry’. **Journal of Insects as Food and Feed**, Wageningen Academic Publishers, v. 1, n. 2, p. 159–168, jan. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3920/jiff2014.0009>>.

AZEVEDO, A. R. G. de et al. Possibilities for the application of agro-industrial wastes in cementitious materials: A brief review of the brazilian perspective. **Cleaner Materials**, Elsevier BV, v. 3, p. 100040, mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clema.2021.100040>>.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Optimization of endoglucanase production from trichoderma harzianum strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Springer Science and Business Media LLC, v. 8, n. 2, p. 305–316, ago. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13399-017-0285-3>>.

BASSET, Y. et al. Arthropod diversity in a tropical forest. **Science**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 338, n. 6113, p. 1481–1484, dez. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.1226727>>.

BATOOL, T. et al. A comprehensive review on l-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 178, n. 5, p. 900–923, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-015-1917-3>>.

BERG, H. van den. Asparaginase revisited. **Leukemia & Lymphoma**, Informa UK Limited, v. 52, n. 2, p. 168–178, fev. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/10428194.2010.537796>>.

BONGAARTS, J. United nations department of economic and social affairs, population Division World family planning 2020: Highlights, united nations publications, 2020. 46 p. **Population and Development Review**, Wiley, v. 46, n. 4, p. 857–858, dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/padr.12377>>.

- BORGES, M. et al. Natural dyes extraction from cochineal (*dactylopius coccus*). new extraction methods. **Food Chemistry**, Elsevier BV, v. 132, n. 4, p. 1855–1860, jun. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.018>>.
- BORGES, M. M. et al. Edible insects as a sustainable alternative to food products: an insight into quality aspects of reformulated bakery and meat products. **Current Opinion in Food Science**, Elsevier BV, v. 46, p. 100864, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100864>>.
- BOUHAMED, S. B. H.; KRICHEN, F.; KECHAOU, N. Feather protein hydrolysates: A study of physicochemical, functional properties and antioxidant activity. **Waste and Biomass Valorization**, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 1, p. 51–62, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0451-2>>.
- BRUMANO, L. P. et al. Development of l-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frontiers Media SA, v. 6, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00212>>.
- BULAK, P. et al. Biogas generation from insects breeding post production wastes. **Journal of Cleaner Production**, Elsevier BV, v. 244, p. 118777, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118777>>.
- CACHUMBA, J. J. M. **Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido**. Tese (Doutorado), 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/d.97.2017.tde-30062017-200104>>.
- CÁRDENAS, G. et al. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and sup13/supc cross polarization/mass angle spinning NMR. **Journal of Applied Polymer Science**, Wiley, v. 93, n. 4, p. 1876–1885, jun. 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/app.20647>>.
- CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, dez. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>>.
- CERDA, A. et al. Innovative production of bioproducts from organic waste through solid-state fermentation. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Frontiers Media SA, v. 3, ago. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00063>>.
- _____. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 243, p. 1059–1068, nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.076>>.
- CHAKRAVARTY, N. et al. Biochemical and molecular insights on the bioactivity and binding interactions of bacillus australimaris NJB19 l-asparaginase. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier BV, v. 215, p. 1–11, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.110>>.
- CHAPRÃO, M. J. et al. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal**

of Biotechnology, Elsevier BV, v. 18, n. 6, p. 471–479, nov. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.005>>.

CHEN, C. et al. Optimization and characterization of biosurfactant production from kitchen waste oil using *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Science and Pollution Research**, Springer Science and Business Media LLC, v. 25, n. 15, p. 14934–14943, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1691-1>>.

CHO, H.-R.; LEE, S.-O. Novel hepatoprotective peptides derived from protein hydrolysates of mealworm (*Tenebrio molitor*). **Food Research International**, Elsevier BV, v. 133, p. 109194, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109194>>.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 53, n. 2, p. 224–229, feb 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>>.

COSTA, S. G. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* I2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, Elsevier BV, v. 45, n. 9, p. 1511–1516, set. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.033>>.

CRUZ, R. M. S. da et al. Composition and oxidative stability of oils extracted from *Zophobas morio* and *Tenebrio molitor* using pressurized n-propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, Elsevier BV, v. 181, p. 105504, fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105504>>.

CUNHA, M. C. da. **L-asparaginase fúngica: produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação em café para redução dos teores de acrilamida**. Tese (Doutorado), 2020. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/20.500.12733/1642037>>.

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, Propriedades e Aplicações**. São Paulo: Edgar Blucher, 2011.

DAS, M. M. et al. Production of bio-fungicide, *Trichoderma harzianum* CH1 under solid-state fermentation using coffee husk. **Bioresource Technology Reports**, Elsevier BV, v. 15, p. 100708, set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100708>>.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, American Society for Microbiology, v. 61, n. 1, p. 47–64, mar. 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/mmbr.61.1.47-64.1997>>.

DIAS, F. F. G.; AGUILAR, J. G. dos S.; SATO, H. H. L-asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech**, Springer Science and Business Media LLC, v. 9, n. 7, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1814-5>>.

DINIZ, C. C. **Repositório Institucional da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (RIUT): Síntese e caracterização de surfactantes zwitterionicos derivados de triazol — repositório.utfpr.edu.br**. 2019. <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/13260>>. [Accessed 14-Sep-2022].

DIVINO, B. Tese (Doutorado), 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/d.9.2016.tde-15122015-172127>>.

DOMÍNGUEZ, A. et al. **Biotechnology Letters**, Springer Science and Business Media LLC, v. 25, n. 15, p. 1225–1229, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/a:1025068205961>>.

DORIYA, K. et al. Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of l-asparaginase. In: **Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part I - Production of Enzymes**. Elsevier, 2016. p. 115–135. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>>.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Solid state fermentation of mixed substrate for l-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier BV, v. 138, p. 188–196, out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.024>>.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus aspergillus nidulans. **Journal of General Microbiology**, Microbiology Society, v. 98, n. 2, p. 493–501, feb 1977. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00221287-98-2-493>>.

EFSA. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. **EFSA Journal**, EFSA, n. 2015;13(10):4257, 2015. ISSN 1831-4732. Disponível em: <<https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2015.4257>>.

EL-BAKRY, M.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Inoculation effect of thermophilic microorganisms on protease production through solid-state fermentation under non-sterile conditions at lab and bench scale (SSF). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Springer Science and Business Media LLC, v. 39, n. 4, p. 585–592, jan. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-016-1540-x>>.

EL-GENDY, M. M. A. A. et al. Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular l-asparaginase produced by fusarium equiseti AHMF4. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Elsevier BV, v. 28, n. 4, p. 2540–2548, abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.058>>.

EL-NAGGA, N. E.-A.; EL-EWASY, S. M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial l-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: The pros and cons. **International Journal of Pharmacology**, Science Alert, v. 10, n. 4, p. 182–199, maio 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3923/ijp.2014.182.199>>.

ELSHAFEI, A. Purification, characterization and antitumor activity of l-asparaginase from penicillium brevicompactum NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, Sciencedomain International, v. 2, n. 3, p. 158–174, jan. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.9734/bmrj/2012/1735>>.

EMADI, A.; ZOKAEE, H.; SAUSVILLE, E. A. Asparaginase in the treatment of non-ALL hematologic malignancies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 73, n. 5, p. 875–883, fev. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00280-014-2402-3>>.

ES-SBATA, I. et al. Production of prickly pear (opuntia ficus-indica) vinegar in submerged culture using acetobacter malorum and gluconobacter oxydans: Study of volatile and polyphenolic composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, Elsevier BV, v. 112, p. 104699, set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104699>>.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T. M. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 29, n. 2, p. 393–394, fev. 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jcm.29.2.393-394.1991>>.

FAO. Looking at edible insects from a food safety perspective. abr. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/cb4094en>>.

FARAG, A. M. et al. Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine aspergillus terreus. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, Elsevier BV, v. 41, n. 4, p. 295–302, dez. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.002>>.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier BV, v. 52, p. 179–188, dez. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.092>>.

FEI, D. et al. Low-toxic and nonirritant biosurfactant surfactin and its performances in detergent formulations. **Journal of Surfactants and Detergents**, Wiley, v. 23, n. 1, p. 109–118, oct 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/%2Fjsde.12356>>.

FENG, P. et al. Effect of dietary tenebrio molitor protein on growth performance and immunological parameters in macrobrachium rosenbergii. **Aquaculture**, Elsevier BV, v. 511, p. 734247, set. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734247>>.

FERRONATO, N.; TORRETTA, V. Waste mismanagement in developing countries: A review of global issues. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, MDPI AG, v. 16, n. 6, p. 1060, mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph16061060>>.

FINKLER, A. T. J. et al. Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by aspergillus niger grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier BV, v. 121, p. 1–12, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.011>>.

GHALY, A.; ALKOAİK, F. The yellow mealworm as a novel source of protein. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, Science Publications, v. 4, n. 4, p. 319–331, abr. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.3844/ajabssp.2009.319.331>>.

GHOSH, S. et al. Optimization of l-asparaginase production by serratia marcescens (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. **Sustainable Chemical Processes**, Springer Science and Business Media LLC, v. 1, n. 1, jul. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-9>>.

_____. Nutritional composition of five commercial edible insects in south korea. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Elsevier BV, v. 20, n. 2, p. 686–694, jun. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.003>>.

GIROTTTO, E.; COSSU, R. Role of animals in waste management with a focus on invertebrates' biorefinery: An overview. **Environmental Development**, Elsevier BV, v. 32, p. 100454, dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envdev.2019.08.001>>.

- GOLD, M. et al. Biowaste treatment with black soldier fly larvae: Increasing performance through the formulation of biowastes based on protein and carbohydrates. **Waste Management**, Elsevier BV, v. 102, p. 319–329, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.10.036>>.
- GONZÁLEZ-MULERO, L. et al. Assessment of the acrylamide bioaccessibility in cereal and potato-based foods after in vitro digestion. **Food Research International**, Elsevier BV, p. 111820, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111820>>.
- GRAAFE, J. H. H. de; ROELOFS, W. G.; BOMMEL, M. van. **The colourful past**. London, England: Archetype Publications, 2004.
- GRAU, T.; VILCINSKAS, A.; JOOP, G. Sustainable farming of the mealworm *itenebrio molitor*/i for the production of food and feed. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Walter de Gruyter GmbH, v. 72, n. 9-10, p. 337–349, maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/znc-2017-0033>>.
- GURJAR, J.; SENGUPTA, B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *bacillus subtilis* MTCC 2423. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 189, p. 243–249, ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.013>>.
- HAIDAR, C. N. et al. Biosurfactants produced by *pseudomonas syringae* pv *tabaci*: A versatile mixture with interesting emulsifying properties. **Process Biochemistry**, Elsevier BV, v. 97, p. 121–129, out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.010>>.
- HEO, Y.-A.; SYED, Y. Y.; KEAM, S. J. Pegaspargase: A review in acute lymphoblastic leukaemia. **Drugs**, Springer Science and Business Media LLC, v. 79, n. 7, p. 767–777, abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01120-1>>.
- HOLMBERG BO JONSSON, B. K. K.; LINDMAN, B. **Polymers in solution. In: Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. West Sussex, England: John Wiley e Sons, Ltd, 2002.
- HONG, J.; HAN, T.; KIM, Y. Y. Mealworm (*tenebrio molitor* larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: A review. **Animals**, MDPI AG, v. 10, n. 11, p. 2068, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani10112068>>.
- HU, Q. et al. Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review. **Food Control**, Elsevier BV, v. 56, p. 135–146, out. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.021>>.
- HU, Y. et al. Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. **Process Safety and Environmental Protection**, Elsevier BV, v. 118, p. 133–142, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.009>>.
- HUIS, A. van. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual Review of Entomology**, Annual Reviews, v. 58, n. 1, p. 563–583, jan. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>>.
- HUSSAIN, S. M. S. et al. Fluorinated surfactants: A review on recent progress on synthesis and oilfield applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, Elsevier BV, v. 303, p. 102634, maio 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102634>>.

- IACONISI, V. et al. Dietary inclusion of tenebrio molitor larvae meal: Effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (pagellus bogaraveo). **Aquaculture**, Elsevier BV, v. 476, p. 49–58, jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.007>>.
- JAJIĆ, I. et al. Chemical composition of mealworm larvae (tenebrio molitor/l) reared in serbia. **Contemporary Agriculture**, Walter de Gruyter GmbH, v. 68, n. 1-2, p. 23–27, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2478/contagri-2019-0005>>.
- JALÓN, M.; PEÑA, M.; RIVAS, J. C. Liquid chromatographic determination of carminic acid in yogurt. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, Oxford University Press (OUP), v. 72, n. 2, p. 231–234, mar. 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jaoac/72.2.231>>.
- JIMÉNEZ-PEÑALVER, P. et al. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier BV, v. 115, p. 93–100, nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.006>>.
- JOINT, F. et al. Combined compendium of food additive specifications. **FAO JECFA Monographs**, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), n. 1, 2006.
- KASHIE, A. et al. Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – a critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, Elsevier BV, v. 306, p. 102718, ago. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>>.
- KAVITHA, A.; VIJAYALAKSHMI, M. A study on l-asparaginase of *nocardia levis*/iMK-VL_113. **The Scientific World Journal**, Hindawi Limited, v. 2012, p. 1–5, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1100/2012/160434>>.
- KAYA, M.; BARAN, T.; KARAARSLAN, M. A new method for fast chitin extraction from shells of crab, crayfish and shrimp. **Natural Product Research**, Informa UK Limited, v. 29, n. 15, p. 1477–1480, abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1026341>>.
- KENARI, S. L. D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of l-asparaginase from *escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. **Food and Bioprocess Processing**, Elsevier BV, v. 89, n. 4, p. 315–321, out. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.11.002>>.
- KIM, S.-K.; WEAVER, C. M.; CHOI, M.-K. Proximate composition and mineral content of five edible insects consumed in korea. **CyTA - Journal of Food**, Informa UK Limited, p. 1–4, dez. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1223172>>.
- KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. l-asparaginase from *erwinia chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, Elsevier BV, v. 127, n. 4, p. 657–669, jan. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.037>>.
- KOURMENTZA, C. et al. Microbial conversion of waste and surplus materials into high-value added products: The case of biosurfactants. In: **Microbial Applications Vol.1**. Springer International Publishing, 2017. p. 29–77. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52666-9_2>.

- KUMAR, D. S.; SOBHA, K. L-asparaginase from microbes: a comprehensive review. **Advances in BioResearch**, SOE, Índia, v. 3, p. 137–157, dez. 2012. Disponível em: <https://soeagra.com/abr/abrdec_2012/22>.
- KUMAR, N. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. Production and optimization of l-asparaginase from cladosporium sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, Elsevier BV, v. 43, p. 150–158, maio 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.023>>.
- KUMAR, S.; DASU, V. V.; PAKSHIRAJAN, K. Purification and characterization of glutaminase-free l-asparaginase from pectobacterium carotovorum MTCC 1428. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 102, n. 2, p. 2077–2082, jan. 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.114>>.
- KUMARI, S. et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. **Environmental Technology & Innovation**, Elsevier BV, v. 3, p. 77–85, abr. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>>.
- KUMIRSKA, J. et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, MDPI AG, v. 8, n. 5, p. 1567–1636, abr. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md8051567>>.
- LEITE, P.; BELO, I.; SALGADO, J. M. Co-management of agro-industrial wastes by solid-state fermentation for the production of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, Elsevier BV, v. 172, p. 113990, nov. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113990>>.
- LIU, Q. et al. Production, characterization and application of biosurfactant produced by bacillus licheniformis l20 for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Cleaner Production**, Elsevier BV, v. 307, p. 127193, jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127193>>.
- LOPES, A. M. et al. Therapeuticscp/ scp-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, Informa UK Limited, v. 37, n. 1, p. 82–99, dez. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1120705>>.
- MADAU, F. A. et al. Insect farming for feed and food production from a circular business model perspective. **Sustainability**, MDPI AG, v. 12, n. 13, p. 5418, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su12135418>>.
- MAHAJAN, R. V. et al. Efficient production of l-asparaginase from bacillus licheniformis with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 125, p. 11–16, dez. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>>.
- MAKKY, E. A.; ALI, M. J. Microbial fermentation biotechnology of cooked chicken bone novel substrate for l-asparaginase production. **Karbala International Journal of Modern Science**, University of Kerbala - KIJOMS, v. 3, n. 4, p. 202–211, dez. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.08.007>>.
- MARCELINO, P. R. F. **Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado), 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/t.97.2017.tde-06022017-102452>>.

- MARÍN, M.; ARTOLA, A.; SÁNCHEZ, A. Optimization of down-stream for cellulases produced under solid-state fermentation of coffee husk. **Waste and Biomass Valorization**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 10, p. 2761–2772, maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0327-5>>.
- MARIOD, A. A.; MIRGHANI, M. E. S.; HUSSEIN, I. Tenebrio molitor mealworm. In: **Unconventional Oilseeds and Oil Sources**. Elsevier, 2017. p. 331–336. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809435-8.00050-0>>.
- MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. a review. **Biotechnology Advances**, Elsevier BV, v. 29, n. 3, p. 365–373, maio 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>>.
- MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of l-asparaginase by fusarium culmorum (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Elsevier BV, v. 11, p. 124–130, jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.001>>.
- MOTTRAM, D. S.; WEDZICHA, B. L.; DODSON, A. T. Acrylamide is formed in the maillard reaction. **Nature**, Springer Science and Business Media LLC, v. 419, n. 6906, p. 448–449, out. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/419448a>>.
- NAGESWARA, S.; GUNTUKU, G.; TADIMALLA, P. Production of l-asparaginase by solid state fermentation using marine fungus. **BioMed Res [Internet]**, Citeseer, p. 1–9, 2014.
- NARAYANA, K. J. P.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M. L-asparaginase production by streptomyces albidoflavus. **Indian Journal of Microbiology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 48, n. 3, p. 331–336, jun. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12088-008-0018-1>>.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Elsevier BV, v. 61, n. 3, p. 208–221, mar. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.07.009>>.
- NAZARETH, T. C. et al. Bioconversion of low-cost brewery waste to biosurfactant: An improvement of surfactin production by culture medium optimization. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier BV, v. 172, p. 108058, ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108058>>.
- NGUYEN, H. C. et al. Direct transesterification of black soldier fly larvae (hermetia illucens) for biodiesel production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Elsevier BV, v. 85, p. 165–169, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.01.035>>.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, FapUNIFESP (SciELO), v. 25, n. 5, p. 772–776, set. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-40422002000500013>>.
- OONINCX, D. G. A. B.; BOER, I. J. M. de. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans – a life cycle assessment. **PLoS ONE**, Public Library of Science (PLOS), v. 7, n. 12, p. e51145, dez. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051145>>.

- OONINCX, D. G. A. B. et al. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. **PLoS ONE**, Public Library of Science (PLOS), v. 5, n. 12, p. e14445, dez. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014445>>.
- PARODI, A. et al. Black soldier fly reared on pig manure: Bioconversion efficiencies, nutrients in the residual material, greenhouse gas and ammonia emissions. **Waste Management**, Elsevier BV, v. 126, p. 674–683, maio 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.04.001>>.
- PAUL, V.; TIWARY, B. N. An investigation on the acrylamide mitigation potential of l-asparaginase from BV-c strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Elsevier BV, v. 27, p. 101677, ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101677>>.
- PAULINO, A. T. et al. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier BV, v. 64, n. 1, p. 98–103, abr. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.032>>.
- PHULPOTO, I. A. et al. Bioprospecting of rhamnolipids production and optimization by an oil-degrading pseudomonas sp. s2we isolated from freshwater lake. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 323, p. 124601, mar. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124601>>.
- PINHEIRO, T. **Produção de biossurfactantes e l-asparaginase pelo uso de fungos**. Tese (Doutorado), 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.14393/ufu.te.2017.159>>.
- PRADHAN, D.; PADHY, S.; SAHOO, B. Enzyme classification using multiclass support vector machine and feature subset selection. **Computational Biology and Chemistry**, Elsevier BV, v. 70, p. 211–219, out. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.08.009>>.
- QIN, L. et al. Advancements in the application of surfactants in microalgal production, harvesting and processing: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Elsevier BV, v. 10, n. 3, p. 107504, jun. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107504>>.
- RABODONIRINA, S. et al. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using pseudomonas and bacillus strains isolated from oil spill sites. **Journal of Environmental Management**, Elsevier BV, v. 232, p. 1–7, fev. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.005>>.
- RAJENDRAN, K. et al. Insect-based biorefinery for bioenergy and bio-based products. In: **Waste Biorefinery**. Elsevier, 2018. p. 657–669. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63992-9.00022-7>>.
- RAKSASAT, R. et al. A review of organic waste enrichment for inducing palatability of black soldier fly larvae: Wastes to valuable resources. **Environmental Pollution**, Elsevier BV, v. 267, p. 115488, dez. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115488>>.
- RAMOS-ELORDUY, J. et al. Use of *Tenebrio molitor* (coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. **Journal of Economic Entomology**, Oxford University Press (OUP), v. 95, n. 1, p. 214–220, fev. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.214>>.

- RASTOGI, S. et al. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its synergistic application in biosorption of pb2. **Bioresource Technology Reports**, Elsevier BV, v. 15, p. 100706, set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100706>>.
- RUMBOS, C. I. et al. Evaluation of various commodities for the development of the yellow mealworm, *tenebrio molitor*. **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 1, jul. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-67363-1>>.
- RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Molecular Nutrition & Food Research**, Wiley, v. 57, n. 5, p. 802–823, mar. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>>.
- SAMI, B. et al. Application of a novel natural surfactant extracted from *avena sativa* for enhanced oil recovery during low salinity water flooding: Synergism of natural surfactant with different salts. **Journal of Molecular Liquids**, Elsevier BV, v. 362, p. 119693, set. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119693>>.
- SHARUDDIN, S. S. N. et al. Potential bifunctional rhizobacteria from crude oil sludge for hydrocarbon degradation and biosurfactant production. **Process Safety and Environmental Protection**, Elsevier BV, v. 155, p. 108–121, nov. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.09.013>>.
- SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Elsevier BV, v. 100, p. 1–10, abr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002>>.
- SIEMIANOWSKA, E. et al. Larvae of mealworm (&lti&lt;tenebrio molitor&lt/i&lt;t.) as european novel food. **Agricultural Sciences**, Scientific Research Publishing, Inc., v. 04, n. 06, p. 287–291, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4236/as.2013.46041>>.
- SILVA, S. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier BV, v. 79, n. 1, p. 174–183, ago. 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>>.
- SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier BV, v. 44, n. 1, p. 13–18, abr. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>>.
- SIROHI, R. et al. Cellulase production from pre-treated pea hulls using *trichoderma reesei* under submerged fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 9, p. 2651–2659, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0271-4>>.
- SIYAL, A. A. et al. A review on recent developments in the adsorption of surfactants from wastewater. **Journal of Environmental Management**, Elsevier BV, v. 254, p. 109797, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109797>>.
- SMETANA, S.; SPYKMAN, R.; HEINZ, V. Environmental aspects of insect mass production. **Journal of Insects as Food and Feed**, Wageningen Academic Publishers, v. 7, n. 5, p. 553–571, ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3920/jiff2020.0116>>.

- SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, Editora Cubo, v. 1, n. 1, p. 52–71, jan 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>>.
- SON, Y.-J. et al. Could defatted mealworm (*tenebrio molitor*) and mealworm oil be used as food ingredients? **Foods**, MDPI AG, v. 9, n. 1, p. 40, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods9010040>>.
- SOON, C. Y. et al. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from zophobas morio larvae in varying sodium hydroxide concentration. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier BV, v. 108, p. 135–142, mar. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.138>>.
- SPANG, B.; FRANCIS, K. Insects as food : Assessing the food conversion efficiency of the mealworm (*tenebrio molitor*). In: . [S.l.: s.n.], 2013.
- STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A. et al. Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. **LWT**, Elsevier BV, v. 99, p. 231–237, jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.055>>.
- TAREKE, E. et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 50, n. 17, p. 4998–5006, jul. 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf020302f>>.
- THENMOZHI, C. et al. L-asparaginase production by mangrove derived bacillus cereus MAB5: optimization by response surface methodology. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Medknow, v. 4, n. 6, p. 486–491, jun. 2011. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60132-6](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60132-6)>.
- THOMAS, A.; THOMAS, A. Acrylamide- a potent carcinogen in food. In: . [S.l.: s.n.], 2014.
- TWIGG, M. S. et al. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. **Microbial Biotechnology**, Wiley, v. 14, n. 1, p. 147–170, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13704>>.
- VAIDYA, S. V.; NARVÁEZ, A. R. Understanding interactions between immunoassay excipient proteins and surfactants at air–aqueous interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Elsevier BV, v. 113, p. 285–294, jan 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.025>>.
- Van de Velde, Kathleen and Kiekens, Paul. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state C-13 NMR. **CARBOHYDRATE POLYMERS**, ELSEVIER SCI LTD, 58, n. 4, p. 409–416, 2004. ISSN 0144-8617.
- VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. 2004. <https://www.uricer.edu.br/eal_hp/DissertPDF/Turma2002/DissertGeanVargas.pdf>. [Accessed 12-Sep-2022].
- VELDKAMP, T. et al. Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets : a feasibility study = insecten als duurzame diervoedergrondstof in varkens- en pluimveevoeders : een haalbaarheidsstudie. 01 2012.

- VERVLIET, T.; PARYS, J. B. L-asparaginase-induced apoptosis in ALL cells involves IP3 receptor signaling. **Cell Calcium**, Elsevier BV, v. 83, p. 102076, nov. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102076>>.
- VIEIRA, I. M. M. et al. An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Elsevier BV, v. 100, p. 1–18, ago. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.017>>.
- VIEIRA, W. F. et al. A novel multiple reactor system for the long-term production of l-asparaginase by penicillium sp. LAMAI 505. **Process Biochemistry**, Elsevier BV, v. 90, p. 23–31, mar. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.012>>.
- WLODARCZYK, S. R. **Efeitos de osmólitos na L- asparaginase II de <i>Erwinia chrysanthemi</i> em meio aquoso**. Tese (Doutorado). Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/t.9.2017.tde-21112017-154228>>.
- WONG, C. Y. et al. Rhizopus oligosporus-assisted valorization of coconut endosperm waste by black soldier fly larvae for simultaneous protein and lipid to biodiesel production. **Processes**, MDPI AG, v. 9, n. 2, p. 299, fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pr9020299>>.
- YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**, Elsevier BV, v. 8, n. 3, p. e09173, mar. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>>.
- YANG, S.-S. et al. Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of tenebrio molitor linnaeus (coleoptera: Tenebrionidae). **Chemosphere**, Elsevier BV, v. 212, p. 262–271, dez. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.078>>.
- YAP, L. S.; LEE, W. L.; TING, A. S. Y. Optimization of l-asparaginase production from endophytic fusarium proliferatum using OFAT and RSM and its cytotoxic evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, Elsevier BV, v. 191, p. 106358, dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106358>>.
- YASSIN, M. A. et al. Thermostable chitosan-l-asparaginase conjugate from aspergillus fumigatus is a novel structurally stable composite for abolishing acrylamide formation in french fried potatoes. **LWT**, Elsevier BV, v. 162, p. 113494, jun. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113494>>.
- YAZID, N. A. et al. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review. **Sustainability**, MDPI AG, v. 9, n. 2, p. 224, fev. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su9020224>>.
- YI, L. et al. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. **Food Chemistry**, Elsevier BV, v. 141, n. 4, p. 3341–3348, dez. 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.115>>.
- ZHANG, Z. et al. Attenuation of veterinary antibiotics in full-scale vermicomposting of swine manure via the housefly larvae (musca domestica). **Scientific Reports**, Springer Science and Business Media LLC, v. 4, n. 1, out. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep06844>>.

ZHAO, T. et al. Semi-hydrolysis with low enzyme loading leads to highly effective butanol fermentation. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 264, p. 335–342, set. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.056>>.

ZHAO, X. et al. Yellow mealworm protein for food purposes - extraction and functional properties. **PLOS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 11, n. 2, p. e0147791, fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147791>>.