



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**E RECURSOS NATURAIS**

**MESSE ELMER TORRES DA SILVA**

**BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS EM FUNGOS**  
**ENDOFÍTICOS DE *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*.**

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque  
Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior

**MANAUS**  
**2015**

**MESSE ELMER TORRES DA SILVA**

**BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS EM FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como Requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque  
Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior

**MANAUS - AM**

**2015**

## Ficha Catalográfica

S586a Silva, Messe Elmer Torres da  
Bioprospecção de moléculas tensoativas em fungos endofíticos de *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*. / Messe Elmer Torres da Silva -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2015.  
83 f. : il.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2015.  
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque  
Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior

1. Biossurfactantes 2.Fungos endofíticos 3.*Piper hispidum*  
4.*Myrcia guianensis* I. Título.

CDU: 604(043)

**MESSE ELMER TORRES DA SILVA**

**BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS EM FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como Requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação 12/02/2015

Banca Examinadora:

---

Patrícia Melchionna Albuquerque

Universidade do Estado do Amazonas

---

José Renato Pereira Cavallazzi

Universidade Federal do Amazonas

---

Rudi Emerson de Lima Procópio

Universidade do Estado do Amazonas

**MANAUS  
2015**

*Dedicatória*

A DEUS

“In memória” do meu avô Julio Fidelis da Silva, além de avô foi um pai dedicado que me criou e me ensinou a ser um homem com caráter bom e honesto.

A minha família que sempre me incentivou a cada dia para eu almejasse meus objetivos.

A minha mãe Eutália Torres da Silva.

“Epígrafe”

Pois a sabedoria entrará no teu coração e o conhecimento será suave a sua alma.

Provérbios 2:10

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que é o principio de tudo.

A minha orientadora Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque pela orientação, contribuição, confiança e apoio durante o mestrado.

Ao meu coorientador Dr. Sergio Duvoisin Junior pelas contribuições dadas ao trabalho, pelos ensinamentos e amizade construída.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA, pela oportunidade do exercício científico e apoio pela realização deste trabalho.

A todos os meus colegas da turma do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais.

A minha família, que sempre me apoiou e contribuiu em tudo para que ocorresse a realização de mais um sonho na minha vida.

Aos meus amigos e colegas de turma: Daniel da Silva, Marta Rodrigues de Oliveira e Jorge Luiz Rodrigues Manrique, pelas contribuições, conversas, estudos e pelas diversões.

Aos alunos de Doutorado Elissandro Banhos e Rafael Lopes pela força que deram para a realização desse trabalho.

A aluna de Ciências Biológicas Crislene Carvalho Nascimento pelo apoio dado nas atividades dos experimentos no laboratório ajudando na realização do mesmo.

A Técnica do laboratório de química Sara pelo apoio e ajuda dada nos meus experimentos

A todos, que de uma forma direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos apresentam um enorme potencial na produção de novas substâncias bioativas. Entre as substâncias de interesse comercial destacam-se os biossurfactantes, compostos com propriedades tensoativas produzidos por microrganismos. Os biossurfactantes apresentam uma ampla variedade de aplicações, que incluem biorremediação, biodegradação, limpeza de reservatórios de óleos, além de serem empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a produção de biossurfactantes em meios metabólicos de fungos isolados das espécies amazônicas *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*. Para verificar a produção de biossurfactante, foram realizados testes de colapso da gota e índice de emulsificação ( $E_{24}$ ). Para determinar a qualidade dos biossurfactantes produzidos foram avaliadas as características físico-químicas dos mesmos, como a diminuição da tensão superficial (TS) ao longo do cultivo e concentração micelar crítica (CMC). Foram isolados 117 fungos de *P. hispidum* e 50 foram utilizados na produção do biossurfactante. Destes, oito apresentaram resultados positivos no teste da gota colapsada e  $E_{24}$  variando entre 20 e 78%. Foram selecionados 32 cepas de endófitos de *M. guianensis* dos isolados da micoteca do Laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da EST/UEA, sendo que 12 apresentaram resultados positivos no teste da gota colapsada, com índices de emulsificação que variaram entre 60 e 75%. A partir dos melhores resultados os fungos foram recultivados em 1L de meio para extração e análises das características físico-químicas. A recuperação dos biossurfactantes foi realizada pelo método de extração em etanol a frio, sendo obtido entre 2,46 e 4,47 g/L de biossurfactantes. A diminuição da TS e os valores de CMC foram verificados somente para os meios metabólicos dos quatro fungos que apresentaram os melhores resultados de índice de emulsificação: MgRe 1.3.3; MgC 3.3.2; Ph II 22G e Ph III 23F. O meio metabólico que apresentou a maior diminuição da TS (37%) foi o do isolado de *M. guianensis* MgRe 1.3.3 (identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*), reduzindo-a de 61,0 para 39,0 mN.m<sup>-1</sup>. O menor valor de CMC foi encontrado para este mesmo endófito, de 4,6 mg.mL<sup>-1</sup>. Além desta linhagem, outras duas foram identificadas por técnicas de biologia molecular, sendo o isolado MgC 3.3.2 identificado como *Aspergillus niger* e o isolado Ph II 22G como *Glomerella cingulata*. Com base nesse resultados, foi possível identificar endófitos de *P. hispidum* e *M. guianensis* produtores de biossurfactantes, que apresentaram características físico-químicas promissoras para aplicação em diferentes setores industriais.

**Palavras-chaves:** Biossurfactantes, Fungos endofíticos, *P. hispidum*, *M. guianensis*.

## ABSTRACT

Fungi found in plant species, called endophytic fungi, present a great potential for the production of new bioactive substances. Among substances of commercial interest are the biosurfactants, compounds that present tensioactive properties and are produced by microorganisms. Biosurfactants comprise a wide variety of applications, which include bioremediation, biodegradation, cleaning of oil containers, and are also employed at the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Therefore, this work has evaluated the biosurfactant production on metabolic broths of endophytic fungi isolated from Amazon species *Piper hispidum* and *Myrcia guianensis*. In order to access the biosurfactant production it was carried out the drop collapsed test and the determination of the emulsification index ( $E_{24}$ ). Biosurfactant physical-chemical properties, such as the lowering of superficial tension (ST) and the critical micelle concentration (CMC) were determined in order to verify its efficiency. 117 endophytic fungi were isolated from *P. hispidum* and 50 were used for the production of tensioactive molecules. Of these, eight presented positive results at the drop collapsed test and  $E_{24}$  varied from 20 to 78%. It was selected 32 *M. guianensis* endophytic fungi from the Laboratory of Chemistry Applied to Technology (EST/UEA). Of these, 12 presented positive results at the drop collapsed test and  $E_{24}$  varied from 60 to 75%. Considering the best results, fungi were cultivated in 1L media for biosurfactant extraction and physical-chemical properties evaluation. Biosurfactant recovering was performed using cold ethanol and promoted a 2.46 to 4.47 g/L of tensioactive molecules. ST lowering and CMC values were only verified for the metabolic broths of the four fungi that presented the best results of emulsification index: MgRe 1.3.3; MgC 3.3.2; Ph II 22G and Ph III 23F. The metabolic media that presented the greater ST lowering (37%) was the one of *M. guianensis* isolate MgRe 1.3.3 (identified as *Colletotrichum gloeosporioides*), which reduced ST from 61.0 to 39 mN.m<sup>-1</sup>. The lowest CMC value was also found for this isolate, of 4.6 mg.mL<sup>-1</sup>. Other two fungi strains were identified using molecular biology techniques. MgC 3.3.2 was identified as *Aspergillus niger* and Ph II 22G as *Glomerella cingulata*. Considering these results, it was possible to access *P. hispidum* and *M. guianensis* endophytic fungi that produce biosurfactants which presented promising physical-chemical properties for being used in different industrial areas.

**Keywords:** Biosurfactant, Endophytic fungi, *P. hispidum*, *M. guianensis*.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de surfactantes comerciais e classificação quanto à porção hidrofílica..... 29

Tabela 2 - Classificação dos biossurfactantes de acordo com seu peso molecular produzidos por diferentes microrganismos..... 35

### CAPITULO I

Tabela 1 - Número de fungos endofíticos encontrados por espécime de *P. hispidum* e taxa de colonização dos tecidos vegetais..... 51

Tabela 2 - Resultados do teste da gota colapsada do meio metabólico de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* e *Piper hispidum*..... 54

Tabela 3 - Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) do meio líquido de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* e *Piper hispidum* após 7 dias de cultivo..... 56

Tabela 4 - Diminuição da tensão superficial (TS) dos meios metabólicos após 8 dias de cultivos dos fungos testados..... 59

Tabela 5 - Resultados de rendimento de extração dos biossurfactante..... 60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Piper hispidum</i> .....	20
Figura 2 - <i>Myrcia guianensis</i> .....	23
Figura 3 - Estrutura química do taxol.....	27
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura de um surfactante.....	28
Figura 5 - Representação da alocação dos surfactantes na superfície de um líquido polar.....	29
Figura 6 - Esquema mostrando as forças moleculares envolvidas na formação da membrana (tensão superficial).....	30
Figura 7 - Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.....	31
Figura 8 - Esquema representativo para tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante.....	33
Figura 9 - Glicolipídios: (a) Ramnolípídeo, (b) Trehalípídeo e (c) Soforolípídeo.....	36
Figura 10 - Estrutura de um fosfatidilglicerol.....	36
Figura 11 - Estrutura dos Lipopeptídeos: (a) Surfactina e (b) Emulsan.....	36
CAPITULO I	
Figura 1 - Crescimento dos fungos endofíticos de <i>Piper hispidum</i> .....	52
Figura 2 - Fungos endofíticos isolados de <i>Piper hispidum</i> após purificação.....	52
Figura 3 - Fungos de <i>Piper hispidum</i> conservados.....	53
Figura 4 - Teste de índice de emulsificação com os meios metabólicos de endófitos de <i>Piper hispidum</i> .....	55
Figura 5 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo MgC 3.3.2.....	57
Figura 6 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo Ph II 22G.....	58
Figura 7 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo PH III 23F.....	58

Figura 8 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo MgRe 1.3.3.....	58
Figura 9 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo MgC 3.3.2.....	61
Figura 10 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo Ph II 22G.....	62
Figura 11 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo Ph III 23F.....	62
Figura 12 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo MgRe 1.3.3.....	63
Figura 13 - Foto do gel de extração do DNA dos fungos endofíticos Ph III 23F, MgRe 1.3.3, MgC 3.3.2 e Ph II 22G.....	64
Figura 14 - Foto do gel de PCR dos fungos endofíticos Ph III 23F, MgRe 1.3.3, MgC 3.3.2 e Ph II 22G.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Ágar batata dextrose
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CMC	Concentração micelar crítica
E%	Índice de emulsificação
E24	Índice de emulsificação após 24 horas
EST	Escola Superior de Tecnologia
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Di- hidrógeno fosfato de potássio
M	Molar
MBT	Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais
$\text{MgSO}_4$	Sulfato de magnésio
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Hidrógeno fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
SB	Saboraud
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TI	Tensão interfacial
TS	Tensão Superficial
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
Da	Dalton

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1 FAMÍLIA PIPERÁCEA .....	18
2.1.1 <b>Gênero <i>Piper</i></b> .....	19
2.1.1.1 <i>Piper hispidum</i> .....	19
2.3 FAMÍLIA MYRTACEAE .....	20
2.3.1 <b>Gênero <i>Myrcia</i></b> .....	22
2.3.1.1 <i>Myrcia guianensis</i> .....	22
2.5 DIVERSIDADE DOS FUNGOS .....	23
2.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	25
2.7 SURFACTANTES .....	28
2.7.1 <b>Tensão Superficial</b> .....	30
2.8 BIOSSURFACTANTES .....	33
2.8.1 <b>Classificação dos Biossurfactantes</b> .....	34
2.8.2 <b>Aplicações dos Biossurfactantes</b> .....	37
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	41
3.1 OBJETIVO GERAL .....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>CAPÍTULO I</b> .....	42
<b>Resumo</b> .....	43
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	44
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	45
2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	45
2.2 PURIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS .....	46
2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	47
2.4 MANUTENÇÃO DOS FUNGOS .....	47
2.5 PREPARO DO INÓCULO .....	48
2.6 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO .....	48
2.7 TESTE DA GOTA COLAPSA .....	49
2.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO .....	49

2.9 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL .....	49
2.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)	50
2.11 EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....	51
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
3.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>P. hispidum</i> .....	51
3.2 TESTE DA GOTA COLAPSADA .....	53
3.3 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO.....	55
3.4 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL .....	57
3.5 EXTRAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES .....	60
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)..	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
ANEXOS.....	83

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos (fungos, bactérias, actinomicetos, entre outros) desempenham um papel fundamental na produção de novos produtos naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (humana e animal), alimentícia e agrícola. Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos ou fungos endófitos, apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas (CHAPLA et al., 2003).

O trabalho relacionado a microrganismos endofíticos isolados de plantas tropicais vem crescendo nas últimas décadas, sendo que algumas pesquisas são restritas a determinadas espécies do Brasil e da Índia, países nos quais poucos grupos de pesquisadores têm se empenhado na busca de novos microrganismos com propriedades de interesse biotecnológico (OLIVEIRA, 2010).

Dentre as espécies tropicais, a *Piper hispidum* L. ou pimenta de macaco, que ocorre naturalmente na Amazônia, tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido à produção de um óleo essencial, o safrol, que apresenta uma ação eficaz no controle de fitopatógenos tradicionais, como fungos e bactérias, além de comprovada ação analgésica e antiinflamatória com baixos níveis de toxicidade (MAIA et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; FONTES JUNIOR et al., 2002). Entretanto, trabalhos envolvendo a microbiota endofítica existente nesta planta ainda são incipientes.

As plantas do gênero *Myrcia* também têm despertado o interesse de pesquisadores, graças à presença de uma considerável quantidade de compostos biologicamente ativos em seus metabólitos secundários, tais como flavonóides, sesquiterpenos, monoterpenos, triterpenos e esteróides. Esses metabólitos podem ser encontrados nos óleos essenciais das folhas, flores e galhos da planta (CRUZ et al., 2002; KUSTER et al., 2003; CRUZ et al., 2004). Entre as plantas desse gênero, a espécie *M. guianensis*, conhecida popularmente na região norte do Brasil por pedrame-caá ou vassorinha, possui significativo potencial para dar origem a novas substâncias bioativas, sendo que poucos são os trabalhos relacionados especificamente à espécie em questão, tanto do ponto de vista de sua fitoquímica, quanto de sua bioprospecção (BANHOS, 2011).

Desta forma, há necessidade de desenvolver trabalhos cujo objetivo seja investigar a microbiota endofítica de *P. hispidum* e *M. guianensis*, uma vez que existem relatos na literatura de que microrganismos endofíticos podem gerar os mesmos compostos produzidos pela planta hospedeira, havendo assim a possibilidade de descobrir novos compostos de valor comercial interessante, além dos já produzidos pela própria planta (MESQUITA, 2005; FACUNDO et al., 2008).

Os surfactantes são moléculas anfifílicas ou anfipáticas, visto serem constituídas de duas frações distintas – apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). Por essa razão, os surfactantes possuem a capacidade de interagir com líquidos de diferentes características, como, por exemplo, misturas de óleo (apolar) e água (polar). Também podem se posicionar na superfície do fluido formando uma película ou filme, resultando na redução da tensão superficial na interface líquido/ar (ZANA, 2005). Essas características conferem aos surfactantes diversas possibilidades de aplicação para uso doméstico ou industrial, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (URUM e PEKDEMIR, 2004; MULLIGAN, 2005).

Os biossurfactantes de origem microbiana podem ser produzidos por biotransformações de hidrocarbonetos de petróleo, bem como de matérias primas renováveis, e se tem dado especial atenção aos resíduos industriais, como por exemplo: glicerol, óleos vegetais já utilizados em frituras, resíduos de monoculturas e de processamento vegetal, entre outros (DESAI e BANAT, 1997; MULLIGAN, 2005). Essa busca por insumos de menor custo se faz necessária, visto que os surfactantes químicos apresentam custo inferior aos biossurfactantes, sendo, por essa razão, mais comercializados.

Mesmo com o custo superior aos surfactantes químicos, os biossurfactantes possuem diversas características e propriedades, algumas comuns à maioria dos biossurfactantes, apresentando vantagens sobre as características de surfactantes convencionais, como por exemplo: atividades superficiais e interfaciais mais efetivas, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações; maior tolerância a temperatura, pH e força iônica; elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em condições mais drásticas; biodegradabilidade, diferente dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo; além de possuírem baixa toxicidade (LIN, SHARMA e GEORGION, 1993; NITSCHKE e

PASTORE, 2002; MUKHERJEE, DAS e SEM, 2006; JOSHI, BRARUCHA e DESAI, 2008).

As estruturas químicas dos biossurfactantes apresentam diversas combinações, principalmente aqueles produzidos por microrganismos na presença de hidrocarbonetos (LANG, 2002). Em sua grande maioria são lipídios, os quais apresentam uma estrutura típica de surfactante. A porção lipofílica normalmente é um hidrocarboneto com mais de um ácido graxo, os quais podem ser saturados, insaturados ou conter estruturas cíclicas. A porção polar do biossurfactante pode ser simples (carbonila, hidroxila) ou uma mistura complexa de fosfato, carboidratos, aminoácidos, dentre outros (COOPER, 1986; LANG, 2002). Banat, Makkar e Camerotra (2000) classificam os biossurfactantes em 5 grupos: glicolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, fosfolipídios e ácidos graxos.

Grande parte dos estudos envolvendo a produção de biossurfactantes descreve a obtenção destes compostos a partir de bactérias (TURKOVSKAYA, DMITRIEVA e MURATOVA, 1999; ARAÚJO, 2002; SOUZA et al., 2006; LIMA et al., 2007; JOSHI, BHARUCHA e DESAI, 2008; PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008). A produção de biossurfactantes fúngicos, entretanto, é pouco descrita na literatura, embora alguns trabalhos venham demonstrando a possibilidade de utilizar fungos na produção destes compostos (CASTIGLIONI, BERTOLIN e COSTA, 2009).

Sabendo do potencial sintético dos fungos, torna-se fundamental ampliar os conhecimentos a respeito da produção de biossurfactantes produzidos por estes versáteis organismos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de biossurfactantes fúngicos, verificando o potencial de fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* e *M. guianensis* da Região Amazônica na obtenção de moléculas tensoativas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 FAMÍLIA PIPERÁCEA

Piperaceae é uma família de plantas dicotiledôneas, que pertence à ordem *Piperales*, que por sua vez, foi descrita por Paul Dietrich Giseke. É composta por 12 gêneros e cerca de 3000 espécies, sendo que, destes gêneros, apenas cinco são encontrados no Brasil (ROSA e SOUZA, 2004). Desses cinco, maior destaque é dado aos gêneros *Piper*, *Piperomia* e *Pothomorphe*, pela sua ampla distribuição e diversidade (LAGO et al., 2004; FAZOLIN et al., 2007).

A família Piperaceae é comum em diversas localidades, muitas vezes dominando a borda ou o extrato inferior das matas. Esta família é representada por ervas eretas ou escandentes, subarbustos, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas. Possui folhas estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas das mais diversas, tricomas muito variados, geralmente dotadas de glândulas translúcidas e sua inflorescência apresenta-se em forma de espiga com as flores (JARAMILLO e MANOS, 2001; LAGO et al., 2004; FAZOLIN et al., 2007).

As espécies da família Piperaceae possuem importância comercial, econômica e medicinal. Além do interesse ornamental por sua folhagem vistosa, as plantas desta família são mundialmente importantes para o mercado de condimentos. Os frutos maduros de *Piper nigrum* são a fonte da pimenta branca, enquanto os frutos imaturos da mesma espécie origina pimenta preta (PARMAR et al., 1997). As propriedades inseticidas de extratos da pimenta do reino (*P. nigrum* L.) são conhecidas desde 1924 e mostraram-se tóxicas para a mosca doméstica *Musa domestica* L. (Diptera: Muscidae), para o mosquito *Culex pipiens* Palearctica (Diptera: Culicidae) e o gorgulho-do-caupi *Callosobruchos chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidae) (ESTRELA et al., 2003). Além de apresentar importância econômica para o mercado de condimentos e atividade inseticida, esta família possui grande diversidade estrutural em relação aos seus constituintes químicos, contendo lignanas, flavonóides, alcalóides e amidas (SILVA et al., 2008). Muitas das espécies deste gênero são fontes ricas em compostos biologicamente ativos, que constituem matrizes para estudos biossintéticos importantes, principalmente para a indústria de fármacos (SILVA e BASTOS, 2007).

### 2.1.1 Gênero *Piper*

As plantas do gênero *Piper* são popularmente conhecidas como pimenteiras ou falsos-jaborandís. Este gênero é composto por arbustos, herbáceas, lianas ou pequenas árvores, com folhas alternadas, simples, inteiras, geralmente assimétricas, peninérveas ou palminérveas. O fruto é uma drupa pequena, em forma de espiga, com sementes minúsculas (JARAMILLO e MANOS, 2001).

As espécies deste gênero encontram-se extensamente distribuídas na vegetação secundária de florestas tropicais, particularmente na Ásia e na Amazônia (MOTA, COSTA e MAIA, 2001) e cerca de 1000 espécies estão distribuídas nos hemisférios. Dentre estas espécies, apenas 12% vêm sendo estudadas, sendo que grande parte delas são plantas pioneiras e estão envolvidas em processos de regeneração e manutenção da diversidade das matas. Como mencionado anteriormente, algumas espécies do gênero *Piper* despertam interesse por produzirem compostos bioativos, tais como alcalóides, flavonóides e lignóides que são utilizados na medicina popular e também em outras aplicações como, por exemplo, alimento, plantas ornamentais, especiarias, na produção de perfumes, inseticidas, fungicidas e bactericidas (HEGNAUER, 1990; JENSEN, HANSEN e BOLL, 1993; THIES e KALKO, 2004; LAGO et al., 2005).

#### 2.1.1.1 *Piper hispidum*

A espécie *P. hispidum* (Figura 1) constantemente confundida com outra espécie do mesmo gênero, a *Piper aduncum*, ocorre na Amazônia (GAIA et al., 2004) mas também pode ser encontrada no México, Suriname, Cuba, Sul da Flórida, Trinidad e Tobago e Jamaica, e é muito comum na Costa Rica (FAZOLIN et al., 2005). *P. hispidum*, ou pimenta de macaco, como é conhecida popularmente, possui grande potencial para exploração econômica devido à produção de safrol. Produtos naturais de *P. hispidum* têm apresentado ação eficaz no controle de fitopatógenos de culturas tradicionais, além de ação acaricida, bactericida, anti-molusco e larvicida, com a vantagem destes produtos serem biodegradáveis (ORJALA et al., 1994; WADT et al., 2004; BASTOS, 2004; MORANDIM et al., 2005), além de comprovada ação analgésica, diurética e antiinflamatória, apresentando baixos níveis de toxicidade (MAIA et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; FONTES JUNIOR et al., 2002).

Segundo Oliveira et al. (2014), *P. hispidum*, além de apresentar as atividades citadas anteriormente, possui fungos endofíticos que produzem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas. Oliveira (2010) ainda verificou que os endófitos dessa espécie produziram enzimas hidrolíticas de interesse comercial (amilase, celulase, xilanase, lipase, pectinase e protease). Dessa forma, confirma-se que esta espécie possui microrganismos endofíticos que podem gerar novos compostos de valor comercial interessante, além dos já produzidos pela própria planta (MESQUITA, 2005; FACUNDO et al., 2008).

Figura 1 - *Piper hispidum*.



Fonte: própria (2013).

### 2.3 FAMÍLIA MYRTACEAE

Myrtaceae é uma das famílias de maior riqueza de espécies nos neotrópicos, abrangendo cerca de 10-15% do total de espécies arbóreas nas florestas úmidas e no Cerrado do leste brasileiro (BARROSO, 1984). É formada por árvores ou arbustos, raramente subarbustos, tronco geralmente com córtex esfoliante; folhas opostas ou menos frequentemente alternas (em apenas gêneros não nativos), raramente verticiladas, simples, estípulas vestigiais ou ausentes, margem inteira, geralmente coriáceas ou subcoriáceas, com pontuações translúcidas e penínerves, geralmente com nervura marginal coletora. A inflorescência é geralmente cimosa, às vezes reduzida a uma única flor. Apresenta em geral flores vistosas, geralmente com coloração branca, bissexuadas

ou raramente unissexuadas (GRESSLER, 2005). As flores, que são hermafroditas e geralmente de cor clara, apresentam estames longamente exsertos e vistosos, numerosos, muito raramente em número igual ou duplo ao das pétalas. Seus frutos são carnosos e tanto estes como as flores são procurados por diversas espécies de animais (DURIGAN et al., 2005; GRESSLER, 2005). São majoritariamente dispersadas por abelhas, principalmente pelas subfamílias Meliponinae e Bombinae (Apidae) e seus frutos dispersos principalmente por aves e macacos. A família inclui cerca de 130 gêneros e 4000 espécies, sendo encontrados na flora brasileira 23 gêneros e 1000 espécies.

Os gêneros mais representativos dessa família, ou seja, aqueles com maior número de espécies conhecidas são *Eugenia*, *Myrcia* e *Calypttranthes* (BARROSO e PERÓN, 1994; LANDRUM e KAWASAKI, 1997). Muitas espécies de Myrtaceae brasileiras são conhecidas por numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente. Geralmente não produzem madeiras valiosas, se restringindo ao fornecimento de lenha e para a utilização de pequenas peças ou objetos de uso tradicional local (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; MARCHIORI e SOBRAL, 1997).

Na Amazônia encontram-se várias espécies da família Myrtaceae, que são utilizadas na medicina popular, como *Psidium guajava* L. (goiabeira), cujos frutos e, principalmente, as folhas são ricos em taninos, tendo o chá de suas folhas e brotos uso muito difundido no meio popular como antidiarréico (CRUZ, 1982). Faz parte também desta família a *Myrciaria jaboticaba* (jaboticabeira), que tem seus frutos comestíveis muito apreciados na confecção de licores e vinhos medicinais, sendo igualmente empregada como antidiarréica e contra inflamações de garganta (CRUZ, 1982). Também merece destaque a *Eugenia uniflora* (pitanga), que apresenta compostos fenólicos com ação antioxidante e algumas com ação hipoglicemiante e antirreumática, também utilizadas em distúrbios estomacais e como antihipertensiva (HORA, 1944).

Muitas investigações foram feitas acerca da espécie *Myrtus communis*, pertencente à família Myrtaceae, verificam-se resultados significativos tanto para seus extratos como para seu óleo essencial, inibindo o crescimento de microrganismos com conhecida importância médica como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens* (SALVAGNINI et al., 2008).

As espécies pertencentes especificamente ao gênero *Myrcia* possuem a capacidade de produzir uma grande quantidade de compostos, entre eles estão

flavonóides, sesquiterpenos, monoterpenos, triterpenos e esteróides. Esses metabólitos podem ser encontrados nos óleos essenciais e extratos das folhas, flores e galhos das plantas (CRUZ et al., 2002; KUSTER et al., 2003; CRUZ et al., 2004; LIMBERGER et al., 2004; CRUZ et al., 2007) evidenciando a capacidade dessa família na produção de diversos metabólitos secundários (DIJIPA, DELMEE e QUETIN-LECLERCQ, 2000; SERAFIN et al., 2007).

### 2.3.1 Gênero *Myrcia*

Para os metabólitos produzidos pelo gênero *Myrcia*, o que se sabe é que existem diferentes compostos produzidos por diferentes espécies de mesmo gênero, e que fatores como quantidade de chuvas e composição do solo são cruciais na presença desses compostos (LIMBERGER et al., 2004; CRUZ et al., 2007). Sabe-se também que alguns desses compostos possuem atividades biológicas interessantes (CRUZ et al., 2003; LIMBERGER et al., 2004; CRUZ et al., 2007). Como bom exemplo tem-se a espécie *M. myrtiflora*, que teve comprovada sua atividade antimicrobiana (CRUZ et al., 2007).

Segundo Yoshikawa, Matsuda e Nishida (2002), as plantas pertencentes a este gênero apresentam habilidade na produção de novos compostos com atividades biológicas como a myrciacitrina, obtida a partir dos extratos metanólicos de *M. multiflora*. Esse composto apresenta comprovada atividade hipoglicemiante.

#### 2.3.1.1 *Myrcia guianensis*

A espécie *M. guianensis* (Figura 2), conhecida popularmente na região norte do Brasil por pedra-ume-caá ou vassourinha, possui potencial para a obtenção de novas substâncias bioativas, sendo os trabalhos relacionados a espécie são insipientes.

Banhos et al. (2014) verificaram atividade antimicrobiana de extratos obtidos de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados de *M. guianensis*. Os extratos apresentaram efeito inibitório frente à diferentes cepas patogênicas. Os metabólitos do fungo endofítico *Nectria haematococca* apresentaram os resultados mais promissores, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Penicillium avelani*, sendo a inibição do crescimento fúngico comparável à observada na presença de cetoconazol.

Dessa forma, a investigação da diversidade de fungos de hospedeiros tropicais aponta claramente para novas perspectivas sobre o potencial que os fungos endofíticos representam para a biotecnologia (OLIVEIRA, 2010).

Figura 2 - *Myrcia guianensis*.



Fonte: Paulo Schwirkowski (Flora SBS).

## 2.5 DIVERSIDADE DOS FUNGOS

Os fungos constituem um vasto grupo de organismos hiperdiversos, podendo ser encontrados em todos os nichos ecológicos, como o solo, a água, os vegetais, os animais, e em diversos detritos (ALEXOPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

De acordo com Hawksworth (2001) o reino Fungi é considerado um reino análogo aos insetos em termos de riqueza de espécies, estimando-se a existência de aproximadamente 1,5 milhões de fungos.

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; têm parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino açúcares. São heterotróficos, dependendo das substâncias orgânicas disponíveis. Desprovidos de clorofila, são incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. São altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de substâncias de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores dos componentes primários da madeira - lignina e celulose - o que

resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MUELLER, BILLS e FOSTER, 2004).

Os fungos são encontrados em todos os ambientes, podendo infectar animais, incluindo humanos; parasitar plantas, causando doenças e morte das árvores ou se associar em simbiose entre as raízes de plantas leguminosas como fungos micorrízicos arbusculares onde colaboram com a planta para a absorção de água e sais minerais, aumentando a resistência da mesma ao estresse biótico e abiótico em que está exposta (ALEXOPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996; MUELLER, BILLS e FOSTER, 2004; GUIMARÃES, 2005).

Os fungos apresentam, ainda, grande importância econômica para as indústrias alimentícia, farmacêutica e para a agricultura. Com isso, os metabólitos secundários sintetizados pelos mesmos são de grande interesse farmacológico, a exemplo dos antibióticos, esteróides e inúmeras outras substâncias bioativas que apresentam diversas aplicações biotecnológicas, além de serem produtores de fitohormônios e constituírem promissores agentes de controle biológico de insetos e nematódeos (SILVA, 2009).

Apesar dos efeitos indesejáveis dos fungos serem enfatizados pela população leiga, vários são os benefícios que estes microrganismos oferecem: antibióticos como a penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, as fermentações biológicas envolvendo fungos, utilizadas pelo ser humano há milênios na fabricação de pães, queijo, bebidas fermentadas, como o vinho e a cerveja e outros produtos alimentícios (CARLILE e WATKINSON, 1997; AZEVEDO, 2001; HAWKSWORTH, 2001; MUELLER, BILLS e FOSTER, 2004).

De acordo com Alexopoulos, Mims e Blackwell (1996), o reino Fungi, quando baseado em uma classificação monofilética, compreende os reinos Stramenopila e Protista. Embora os indivíduos desses grupos não compartilhem um ancestral comum, eles apresentam algumas semelhanças quanto à morfologia, ao modo de nutrição e à ecologia, que os permitem ser considerados juntamente ao reino Fungi. Desse modo, o reino Fungi deve ser entendido como um grupo com 3 reinos e 11 filos relacionados: o Reino Fungi com os filos *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*; o Reino *Stramenopila* com os filos *Oomycota*, *Hyphochytriomycota* e *Labyrinthulomycota* e o Reino Protista com os filos *Plamodiophoromycota*, *Dictyosteliomycota*, *Acrasiomycota* e *Mycxomycota* (HAWKSWORTH et al., 1995; ALEXOPOULOS et al., 1996; MUELLER, BILLS e FOSTER, 2004).

## 2.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Desde a descoberta dos microrganismos endofíticos em Darnel na Alemanha, em 1904, diversos pesquisadores vêm estabelecendo definições para o termo fungo endofítico (STROBEL e DAISY, 2003). Um considerável desacordo existe sobre o que caracteriza um fungo endofítico (SAIKKONEN et al., 1998), mas conforme Strobel e Daisy (2003) esse conceito varia em função de como estes microrganismos são isolados e estudados.

Todas as partes de uma planta expostas ao ar, em contato com chuva ou orvalho, como caules, folhas, flores e frutos, estão sujeitos à infecção fúngica, incluindo as raízes (CARLILE e WATKINSON, 1997; CAO, YOU e ZHOU, 2002). Os fungos endofíticos pertencem, em sua maioria, ao filo *Ascomycota* e ao grupo dos fungos conidiais, existindo também, representantes dos filios *Zigomycota*, *Chytridiomycota*, *Basidiomycota* e *Glomeromycota* (SCHULZ et al., 1999).

O termo endófito originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. Petrini (1991) considerou microrganismos endofíticos aqueles que colonizam o interior de tecidos aéreos das plantas em alguma fase do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Uma interpretação mais recente de Azevedo e Araújo (2007) define como microrganismos endofíticos todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis. Essa definição foi ampliada por Mendes e Azevedo (2007) dividindo os endófitos em dois tipos, sendo: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiontes fixadoras de nitrogênio.

Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais. Eles ocorrem em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (ARNOLD, 2007; JALGAONWALA, MOHITE e MAHAJAN, 2011). Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias estudadas até o momento, foram encontradas bactérias e fungos endofíticos. Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isoladas de uma única planta, sendo que pelo menos

um é específico ao hospedeiro (TAN e ZOU, 2001).

Segundo Putzke e Putzke (2002), assim como os fungos micorrízicos (simbiose entre a raiz da planta e o micélio fúngico), os fungos endofíticos de raízes podem promover o crescimento da planta hospedeira, fato associado ao aumento da incorporação de elementos minerais pela planta. No entanto, estes últimos diferem dos fungos micorrízicos por não produzirem estruturas características como vesículas e arbúsculos (AZEVEDO et al., 2000; PUTZKE e PUTZKE, 2002).

A colonização, adaptação e propagação dos fungos endofíticos no hospedeiro podem ser beneficiadas com a produção de compostos que atuem na competição com outros microrganismos, animais herbívoros e promoção de crescimento vegetal. A produção de metabólitos secundários depende de fatores bióticos e abióticos, e estão intimamente relacionadas com o momento fisiológico do hospedeiro (AZEVEDO et al., 2002; ZHI-LIN et al., 2007).

O fungo endofítico, ao colonizar uma planta, sintetiza inicialmente metabólitos para competir com os fungos epifíticos, e em seguida, contra patógenos. Com isso, tem-se a regulação do metabolismo do hospedeiro para uma associação equilibrada (SCHULZ et al., 2002). Esses metabólitos são hidrolases, enzimas envolvidas no mecanismo de resistência que impedem a adesão às células do hospedeiro por patógenos, evitando, dessa maneira, o desvio de nutrientes da planta (TAN e ZOU, 2001; STROBEL, 2003; FIRÁKOVÁ, STURDÍKOVÁ e MÚCKOVÁ, 2007).

Segundo Vieira (2008), os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular, produzidos pelos microrganismos em resposta às condições ambientais. Acredita-se também que esses metabólitos não sejam essenciais ao crescimento do microrganismo, mas que estejam envolvidos em processos de comunicação entre microrganismo e planta hospedeira. São compostos extremamente diversos, com bioquímica única (BÉRDY, 2005).

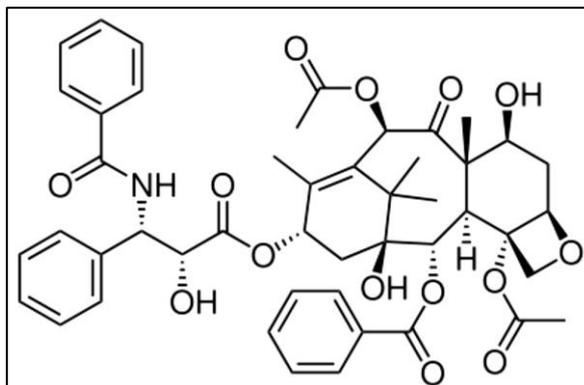
Estas substâncias são comumente produzidas em resposta às adaptações para uma função específica na natureza (STROBEL, 2003; STROBEL, DAISY e CASTILLO, 2005). Interações ambientais, contato com diversos hospedeiros e com outros fungos, sejam eles patogênicos ou não, resultam em uma enorme plasticidade fenotípica capaz de impulsionar o processo evolutivo dos fungos endofíticos (SCHULZ e BOYLE, 2005). A plasticidade fenotípica destes fungos é favorecida em biótopos como as florestas chuvosas de regiões tropicais. Nesses locais existem não somente

diversidade biológica, mas também diversidade de substâncias químicas (AZEVEDO et al., 2000; HAWKSWORTH, 2001; STROBEL et al., 2004).

Da mesma forma, os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos podem sofrer alterações quando cultivados em laboratório. Alguns fatores tais como temperatura, composição do meio de cultura e aeração, podem interferir na quantidade e no tipo de compostos que são produzidos (STONE, BACON e WHITE, 2000; STROBEL et al., 2004). Em culturas puras, a produção dos metabólitos secundários ocorre durante a fase estacionária, quando os nutrientes são exauridos e a taxa de crescimento do fungo declina (CARLILE e WATKINSON, 1997; GUIMARÃES, 2006.).

O principal exemplo de metabólito secundário produzido por fungo endofítico é o taxol, cuja estrutura química está apresentada na Figura 3. Este composto vem sendo utilizado no tratamento de câncer de mama e de útero. Sua principal fonte é a árvore *Taxus brevifolia*, encontrada em pântanos e alagadiços da costa oeste norte-americana (AZEVEDO et al., 2002).

Figura 3 - Estrutura química do taxol.



Fonte: Azevedo et al. (2002).

Os metabólitos secundários já isolados de extratos de fungos endofíticos pertencem a diversos grupos estruturais, sendo os principais: esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados perilenos, quinonas, furandionas, terpenóides, depsipeptídeos e citocalasinas (SCHULZ e BOYLE, 2005). Dentre as funções biológicas de alguns desses compostos pode-se destacar as ações antibacteriana, antiviral, antioxidante, antifúngica, anti-helmíntica, antitumoral, antimalárica, antiinflamatória, antituberculose, laxativa, antidiabética e imunossupressora, entre

outras (STROBEL e DAISY, 2003). Alguns metabólitos podem, ainda, serem utilizados como controles biológicos e biorremediadores (GUO et al., 2008).

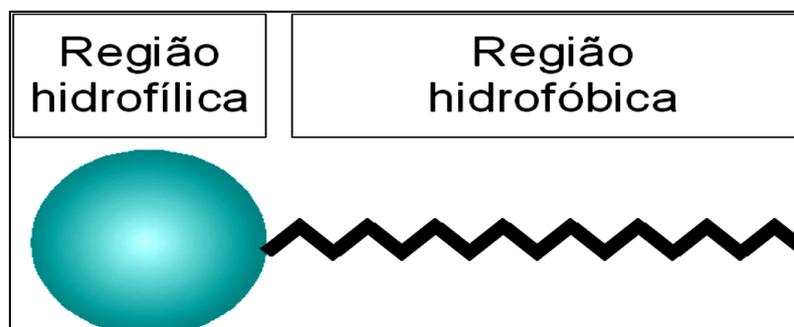
Fungos amazônicos, incluindo endofíticos, estudados por Barbosa (2011) apresentaram produção de moléculas tensoativas. Alguns desses fungos cultivados na presença de petróleo bruto, bem como na de óleo de soja, reduziram a tensão superficial do meio de cultivo e demonstraram resultados promissores de índice de emulsificação, na presença de querosene, indicando o grande potencial dos isolados fúngicos amazônicos para a produção de biossurfactantes.

Sabendo do potencial sintético dos fungos referente a uma grande diversidade de substâncias de valor comercial interessante (CALVO et al., 2009), torna-se fundamental ampliar os conhecimentos a respeito da produção de biossurfactantes produzidos por estes organismos.

## 2.7 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos anfifílicos, termo usado para denominar uma ampla classe de moléculas que em comum apresentam em sua estrutura uma parte hidrofílica (cabeça) e outra hidrofóbica (cauda) (Figura 4). A porção hidrofílica (solúvel em água) ou grupo polar pode ser iônica, não iônica ou anfotérica, ou seja, exibir características aniônicas ou catiônicas dependendo das condições de pH da solução aquosa (Tabela 1) (MANIASSO, 2001). A porção hidrofóbica (solúvel em óleo) ou não polar é frequentemente uma cadeia de hidrocarbonetos composta de ácidos graxos saturados e insaturados (CARA, 2009).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura de um surfactante.



Fonte: Cara (2009).

Em função da presença desses dois grupos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade tais como óleo/água e ar/água (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000).

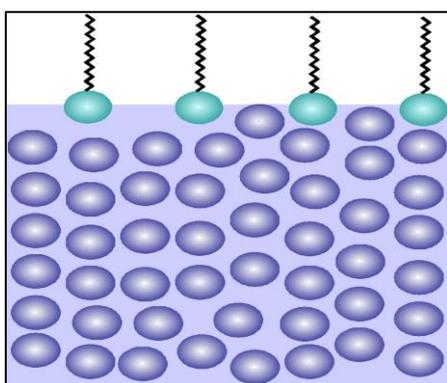
Tabela 1 - Exemplos de surfactantes comerciais e classificação quanto à porção hidrofílica.

<b>Tipo</b>	<b>Agente Tensoativo</b>
<b>Catiônico</b>	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB) Cloreto de cetilpiridino (CICP)
<b>Aniônico</b>	Dodecil sulfato de sódio (SDS) Dihexadecil fosfato (DHF) Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)
<b>Não iônico</b>	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100) Polioxietileno (23) dodecanol (brij 35) Polisorbatos (Incluindo Tween)

Fonte: Maniasso (2001); Hamme, Singh e Ward (2006).

A característica do surfactante é responsável pelo seu comportamento peculiar em água, visto que as porções hidrofóbicas são energeticamente desfavoráveis no que diz respeito ao contato com a água, pois esta é polar (ZANA, 2005). Em água, os surfactantes tendem a se alocar na superfície do sistema, na interface água/ar: a região polar do surfactante se situa na água e a região apolar voltada para a interface com o ar (Figura 5). Esse comportamento ocasiona a redução da tensão superficial da água.

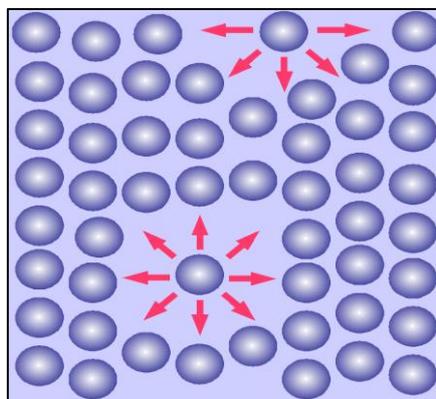
Figura 5 - Representação da alocação dos surfactantes na superfície de um líquido polar.



Fonte: Zana (2005).

No interior do líquido, as moléculas da água interagem com as moléculas vizinhas, em todos os sentidos, o que possibilita a aproximação das moléculas, por conta das forças de atração, mas a ação das forças repulsivas impede que duas ou mais moléculas ocupem o mesmo espaço ao mesmo tempo, criando um distanciamento entre elas (Figura 6). Por outro lado, as moléculas situadas na superfície livre do líquido interagem apenas com as moléculas situadas lateralmente e as localizadas bem abaixo da superfície.

Figura 6 - Esquema mostrando as forças moleculares envolvidas na formação da membrana (tensão superficial).



Fonte: Zana (2005).

A formação de uma película molecular nas interfaces reduz a tensão nessa região, sendo essa uma particularidade única dos surfactantes. Além disso, surfactantes formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água como também a água pode ser solubilizada em hidrocarbonetos (DESAI e BANAT, 1997; BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000).

### 2.7.1 Tensão Superficial

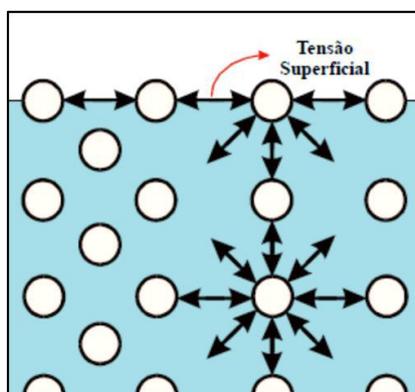
O fenômeno da tensão superficial está presente em toda parte na natureza e é de extrema relevância em tecnologia. É do conhecimento comum que a tensão superficial é responsável pela forma esférica de pequenas gotas de água, como as gotas de orvalho, ou pelo fato de um mosquito ou um palito horizontal sobre uma superfície de água não se afundar (FERREIRA, 2004).

Os líquidos tendem a adotar uma forma que minimize sua área de superfície em uma tentativa de manter as moléculas com um maior número possível de vizinhos

semelhantes. As gotas de líquidos tendem a assumir a forma esférica, pois a esfera é a forma com a menor razão superfície/volume (HEWITT, 2002).

As forças coesivas entre as moléculas no interior de um líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. As moléculas presentes na superfície não têm átomos vizinhos acima delas e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado tensão superficial (HEWITT, 2002). Na Figura 7 é apresentado um esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.

Figura 7 - Esquema das forças intermoleculares no interior e na superfície do líquido.



Fonte: Piróllo (2006).

A adição de um soluto a um líquido altera a sua tensão superficial, tornando-a maior ou menor que a tensão superficial do solvente puro. Quando o soluto se concentra na interface, então a tensão superficial da solução é menor, verificando-se o oposto quando o soluto evita a interface (FERREIRA, 2004).

Estes comportamentos podem ser explicados com base nas interações intermoleculares. Se as interações soluto-solvente são mais fortes que as soluto-fase gasosa, então o soluto evita a interface e a tensão superficial da solução é aumentada. Todavia, se o soluto atrai fracamente o solvente, ou apenas interage favoravelmente com uma parte da sua molécula, a tensão superficial é diminuída (BEZERRA, 2012).

Entre os solutos que fazem aumentar a tensão superficial da água incluem-se os sais iônicos solúveis e os carboidratos. Os primeiros formam interações íon-dipolo com a água, enquanto o segundo, tendo muitos grupos hidroxila, formam ligações de hidrogênio com a água (FERREIRA, 2004). Os solutos que diminuem a tensão superficial são designados agentes tensoativos ou surfactantes.

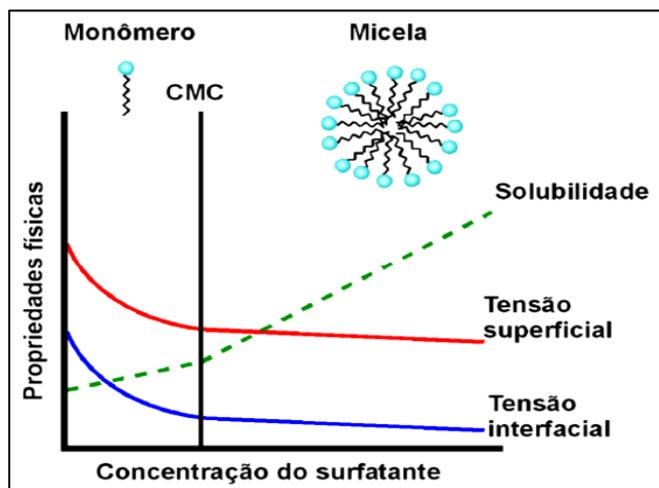
A eficácia dos surfactantes é definida através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 1978 *apud* MULLIGAN, 2005). Devido à presença de surfactantes, menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida. Por exemplo, um bom surfactante pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m (PIRÔLLO, 2006). De modo análogo, a presença de surfactante pode reduzir a energia entre dois líquidos imiscíveis, denominada tensão interfacial. Por isso, a eficácia de um surfactante costuma ser determinada por sua capacidade de reduzir a tensão superficial ou a tensão interfacial dos sistemas (CARA, 2009).

Um dos índices mais utilizados para avaliar a eficiência de um surfactante é a concentração micelar crítica (CMC). A CMC é a concentração mínima de surfactante requerida para alcançar os valores mais baixos de tensão interfacial ou de tensão superficial (LIN, 1996). A partir dessa concentração os surfactantes se associam em estruturas como micelas, vesículas ou lamelas e não ocorrerá maior redução na tensão superficial ou interfacial (DESAI e BANAT, 1997; MAIER, 2003). Vale salientar que a medida da tensão superficial do sobrenadante é o método mais empregado para determinar indiretamente a atividade surfactante (MATSUURA, 2004).

Observa-se na Figura 8 que os surfactantes encontram-se na forma monomérica abaixo da concentração micelar crítica; todavia, acima da CMC, grandes agregados moleculares de dimensões coloidais são formados. Estas micelas, assim denominadas, são termicamente estáveis, facilmente reprodutíveis e são destruídas pela diluição com água (MAKKAR e ROCKNE, 2003).

A redução da tensão interfacial torna estes compostos adequados para várias aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade de molhabilidade, solubilização e dispersão de fases. Muitos surfactantes são sintetizados quimicamente a partir do petróleo, o que leva a um processo de produção ambientalmente nocivo. Além disso, muitos surfactantes sintéticos apresentam baixa biodegradabilidade, o que limita seu uso em diversas aplicações industriais e ambientais (MAKKAR E CAMEOTRA, 2002). Os surfactantes compõem uma importante classe de compostos químicos utilizados tanto em escala doméstica quanto industrial (MAKKAR, CAMEOTRA e BANAT, 2011).

Figura 8 - Esquema representativo para tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante.



Fonte: Mulligan (2005), adaptado por Cara (2009).

Dessa forma, uma alternativa que vem ao longo dos anos sendo estudada é a síntese dos biossurfactantes, pois estes demonstram equivalentes propriedades emulsificantes e são biodegradáveis (CARA, 2009).

## 2.8 BIOSSURFACTANTES

De acordo com Matsuura (2004), os biossurfactantes foram descobertos na década de 60 como compostos extracelulares anfifílicos em pesquisas de fermentações de hidrocarbonetos.

Os chamados biossurfactantes são compostos biológicos (metabólitos) produzidos por uma grande variedade de microrganismos procariontes e eucariontes. Assim como seus similares sintéticos, possuem em sua estrutura molecular porções hidrofílicas (polares) e hidrofóbicas (apolares), sendo por isso considerados moléculas anfipáticas que permitem a formação de estruturas especializadas, e apresentam diversas funções naturais com diferentes aplicações vitais à sua ação (MATSUURA, 2004; SINGH et al., 2007).

Os biossurfactantes são produzidos principalmente durante o crescimento aeróbio ou em fase estacionária do desenvolvimento dos microrganismos, em meios de cultura a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes (ÚBEDA, 2004; PIRÔLLO, 2006).

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida através da

presença de compostos lipídicos, por variações de pH, temperatura, aeração e agitação ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse como baixas concentrações de nitrogênio e alterações nas condições ótimas de pH e temperatura (ÚBEDA, 2004). Quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e transposição de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999).

Todos os biossurfactantes são do tipo não-iônico ou aniônico. Não há na literatura registros de estruturas catiônicas, embora, algumas vezes, a presença de grupos de nitrogênio confira certo grau catiônico a estes metabólitos (BOGNOLO, 1999).

A produção de biossurfactante por diversos microrganismos tem sido amplamente estudada, apresentando uma gama de dados bastante relevantes sobre a produção, tipo, bem como suas propriedades (MUKHERJEE, DAS e SEN, 2006).

### **2.8.1 Classificação dos Biossurfactantes**

Ao contrário dos surfactantes sintetizados quimicamente, onde são classificados pela natureza do seu grupo polar, biossurfactantes são classificados por sua composição química e também pela origem microbiana (FATHABAD, 2010).

As principais classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI e BANAT, 1997; KOSARIC, 1992; DUBEY e JUWARKAR, 2001; GAUTAM e TYAGI, 2006). Alguns autores preferem agrupar os biossurfactantes de acordo com seu peso molecular conforme mostra a Tabela 2 onde as moléculas de baixa massa molecular baixam a tensão superficial de forma mais eficiente, enquanto as de alta massa molecular se caracterizam por formar emulsões de sistemas óleo/água mais estáveis. A massa molecular dos biossurfactantes, geralmente, situa-se entre 500 e 1500 Da e seu valor de CMC varia de 1 a 300 mg/L (RON e ROSENBERG, 2002; BACH, BERDICHEVSKY e GUTNICK, 2003; HAMME, SINGH e WARD, 2006).

Tabela 2 - Classificação dos biossurfactantes de acordo com seu peso molecular produzidos por diferentes microrganismos.

<b>Classe</b>	<b>Biossurfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
Baixa massa molecular	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
	Trealolipídios	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
	Soforolipídios	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Torulopsis bombicola</i>
	Celobioselipídios	<i>Ustila maydis</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. papumilis</i>
	Fosfolipídios	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
	Lipopeptídios	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. papumilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. fluorescens</i>
	Flavolipídios	<i>Flavobacterium sp.</i>
Alta massa molecular	Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter redioresistens</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

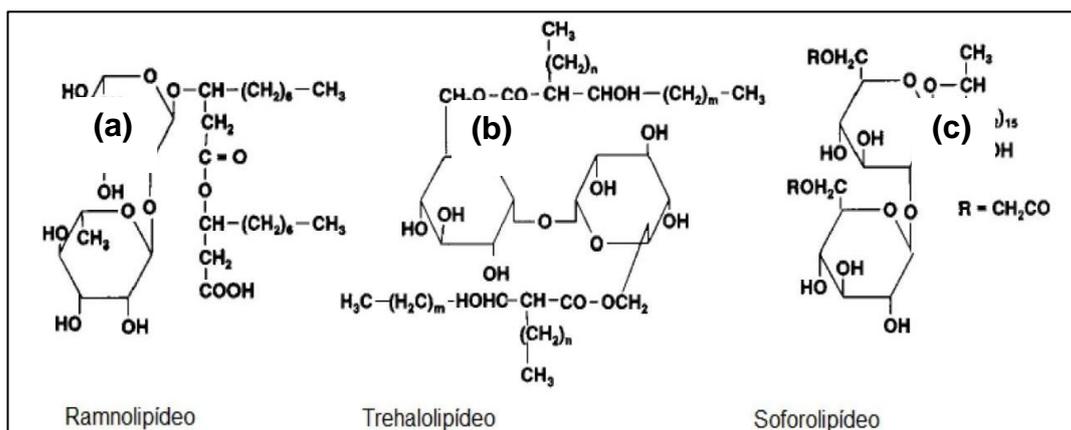
Fonte: Hamme, Singh e Ward (2006).

A presença de diferentes porções hidrofílicas faz com que os biossurfactantes sejam agrupados em diferentes classes, de acordo com sua composição, e entre eles os principais biossurfactantes estudados são:

**Glicolipídios** – São os biossurfactantes mais conhecidos. São constituídos por carboidratos (açúcares) combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos (DESAI e BANAT, 1997). Por vezes, a mesma espécie microbiana é capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídios, dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento (DESAI e BANAT, 1997; COSTA et al., 2009). Algumas estruturas de glicolipídios são apresentadas na Figura 9.

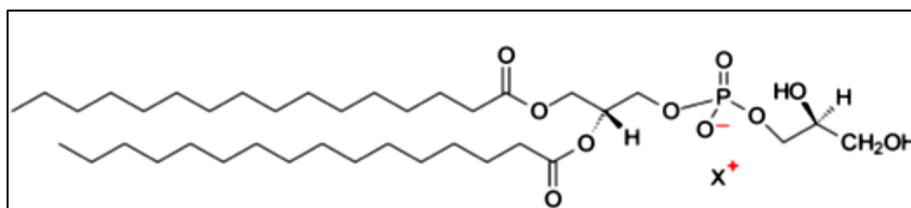
**Fosfolipídios** – São formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos por meio de ligações éster e a um grupamento fosfato. Quando determinadas espécies de bactérias e leveduras são crescidas em meio com grandes concentrações de hidrocarbonetos, ocorre um aumento considerável do teor de fosfolipídios dentro das células microbianas (BOGNOLO, 1999). Beebe e Umbreit (1971) relataram a produção de três diferentes fosfolipídios em meio exaurido (após o crescimento) para *Acidithiobacillus thiooxidans* tendo substrato insolúvel como fonte de energia. O fosfolipídio encontrado em maior proporção foi o fosfatidilglicerol (Figura 10).

Figura 9 - Glicolipídios: (a) Ramnolipídeo, (b) Trehalipídeo e (c) Soforolipídeo.



Fonte: Desai e Banat, 1997.

Figura 10 - Estrutura de um fosfatidilglicerol.

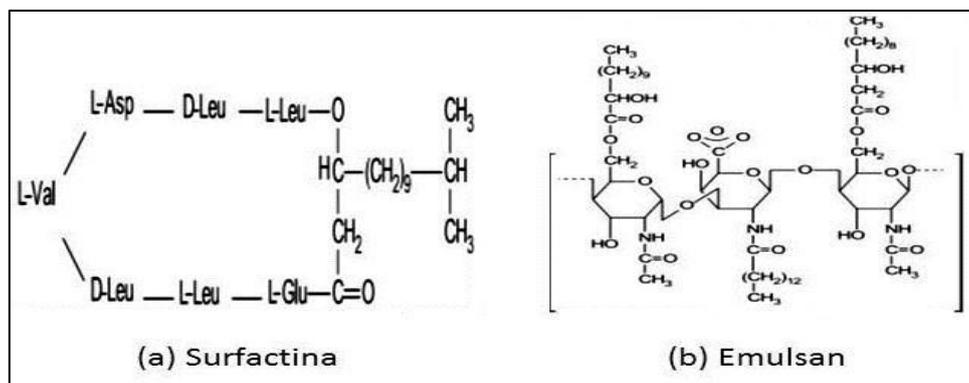


Fonte: Beebe e Umbreit, 1971.

Lipopeptídeos – São compostos produzidos, principalmente, por espécies do gênero *Bacillus*. Essas moléculas apresentam propriedades tensoativas, sendo que algumas também possuem propriedades antimicrobianas. São exemplos de lipopeptídeos: viscosina, subtilisina e surfactina (Figura 11a) (DESAI e BANAT, 1997).

Poliméricos - Emulsan (Figura 11b) é o biossurfatante polimérico mais estudado. É formado por um complexo de polissacarídeos e proteínas. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produz este potente bioemulsificador (DESAI e BANAT, 1997).

Figura 11 - Estrutura dos Lipopeptídeos: (a) Surfactina e (b) Emulsan.



Fonte: Desai e Banat, 1997.

## 2.8.2 Aplicações dos Biossurfactantes

O crescente interesse nas aplicações de compostos tensoativos microbianos é baseado em suas variadas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, desemulsificação, separação de fases, molhabilidade, formação de espumas, solubilização e redução de viscosidade de óleos pesados. Essas características são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de microrganismos com potencial de produção destes agentes (DELEU e PAQUOT, 2004).

Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas dessas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (ABU-RUWAIDA et al., 1991; STAMPFLI e NERSTEN, 1995):

- ✓ atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações. A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente;
- ✓ tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75°C, por até 140, horas e pHs entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de sal, enquanto que 2% de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais;
- ✓ biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos;
- ✓ baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicação em vários processos industriais:

- a) Limpeza de reservatório de óleos

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões O/A, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000).

#### b) Biorremediação

O acúmulo de materiais tóxicos na água e no solo representa um dos principais problemas a ser enfrentado nos últimos anos (KOSARIC, 2001). Do ponto de vista ambiental, biossurfactantes são mais aceitáveis para o processo de remediação, tanto no mar, quanto em terra (CAMEOTRA e MAKKAR, 2010). Como os biotensoativos aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Métodos biológicos se mostram mais vantajosos e mais eficientes em degradar compostos orgânicos em processos aeróbios e/ou anaeróbios. Entretanto, para a degradação de compostos recalcitrantes, a adaptação das culturas de microrganismos se faz necessária (KOSARIC, 2001).

Outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos são também indicadas para descontaminar ambientes poluídos, todavia, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos.

#### c) Aplicações terapêuticas e agentes de saúde

Os biossurfactantes têm algumas aplicações terapêuticas. Estas incluem aplicações possíveis dos ramnolípídeos produzidos por *P. aeruginosa* entre outros microrganismos como agentes biocidas. Makkar e Cameotra (2002) descrevem como possíveis aplicações dos biossurfactantes a formação de uma emulsão para o transporte de droga ao local da infecção, para suplementar o surfactante pulmonar e como adjuvantes para vacinas.

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral

(SEYDLOVÁ e SVOBODOVA, 2008). O biossurfactante produzido por *Rhodococcus erythropolis* inibiu o vírus do herpes simples e o vírus parainfluenza (BARROS et al., 2008).

Mimee et al. (2005) isolaram um glicolípido produzido a partir da levedura *Pseudozyma flocculosa*, chamado flocculosin. O biotensoativo mostrou atividade contra diversas leveduras patogênicas associadas a micoses humanas.

Ramnolípídeos produzidos a partir de resíduos de óleo de soja apresentaram atividade antimicrobiana contra várias bactérias e fungos, entre eles, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehei* e *Neurospora crassa* (NITSCHKE et al., 2010).

Uma deficiência no surfactante natural pulmonar (complexo proteico fosfolipídico) é responsável pela morte de bebês prematuros. Biossurfactantes produzidos por bactérias têm sido aplicados em medicamentos para esta enfermidade (GAUTAM e TYAGI, 2006).

#### d) Biossurfactantes na indústria de alimentos

Biossurfactantes têm sido amplamente aplicados na indústria alimentícia (NITSCHKE e COSTA, 2007). Lecitina e seus derivados, ésteres de ácidos graxos contendo glicerol, sorbitol, ou etileno glicol, derivados etoxilados de monoglicerídeos incluindo recentes oligopeptídeos sintetizados, são usados como emulsificantes na indústria de alimentos (PROMMACHAN, 2002; GAUTAM e TYAGI, 2006). Os biossurfactantes também são aplicados na panificação e em produtos de carne onde influenciam nas características reológicas da farinha e na emulsificação de gordura (NITSCHKE e PASTORE, 2002; PROMMACHAN, 2002; GAUTAM e TYAGI, 2006).

Biossurfactantes atuam no controle da consistência, solubilização e também na emulsificação em produtos de padaria e sorveteria. Também serve como estabilizadores de gordura e antiaderentes no cozimento de óleos e gorduras (KOSARIC, 2001).

Uma melhoria de estabilidade de massa, textura, volume e conservação de produtos de padaria também foram descritos por Van Haesendonck e Vanzeveren (2004) através da adição de ramnolípídeos.

#### e) Biossurfactantes na indústria de cosméticos

As indústrias de cosméticos utilizam uma larga quantidade de biossurfactantes em uma variedade de produtos. Eles são usados como emulsificantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes umidificantes e de limpeza. Vários produtos contêm

biossurfactantes na sua formulação, como por exemplo, repelentes, xampus anticaspas, soluções para lentes de contato, pastas de dente, cremes faciais, entre outros (PROMMACHAN, 2002; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

f) Outras aplicações

Outras aplicações destes metabólitos incluem a propriedade emulsificante no processamento de matérias-primas, formulação de herbicidas e pesticidas, para a agricultura; no setor de mineração são utilizados no processo de separação dos minerais; na indústria de tintas são empregados por gerar uma maior dispersão dos componentes e aumentar as propriedades da mistura (KOSARIC, 2001). Há ainda aplicações na indústria têxtil, de papel, construção civil, entre outros (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Portanto, o estudo da produção de biossurfactantes por fungos amazônicos mostra-se promissor no que diz respeito à obtenção de novas fontes dessas moléculas de ampla aplicação industrial.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar fungos endofíticos de *P. hispidum* e *M. guianensis* produtores de biossurfactantes e avaliar as características físico-químicas dos tensoativos produzidos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar fungos endofíticos de caule e folhas de *P. hispidum*;
- ✓ Utilizar fungos endofíticos de *P. hispidum* e *M. guianensis* para a produção de biossurfactantes em meio líquido contendo óleo de soja;
- ✓ Verificar a produção de biossurfactantes através do teste do colapso da gota e do índice de emulsificação ( $E_{24\%}$ );
- ✓ Determinar as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes produzidos, como tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC);
- ✓ Extrair o tensoativo produzido pelas linhagens fúngicas mais promissoras;
- ✓ Identificar as espécies fúngicas mais promissoras.

**CAPÍTULO I****BIOPROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS EM FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*.**

## Bioprospecção de moléculas tensoativas em fungos endofíticos de *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*

Silva, M. E.T<sup>1</sup>; Duvoisin Junior, S<sup>2</sup>; Albuquerque, P.M<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Amazonas – ESA;

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Amazonas - EST.

### Resumo

Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos apresentam um enorme potencial na produção de novas substâncias bioativas. Entre as substâncias de interesse comercial destacam-se os biossurfactantes, compostos com propriedades tensoativas produzidos por microrganismos. Os biossurfactantes apresentam uma ampla variedade de aplicações, que incluem biorremediação, biodegradação, limpeza de reservatórios de óleos, além de serem empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a produção de biossurfactantes em meios metabólicos de fungos isolados das espécies amazônicas *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*. Para verificar a produção de biossurfactante, foram realizados testes de colapso da gota e índice de emulsificação ( $E_{24}$ ). Para determinar a qualidade dos biossurfactantes produzidos foram avaliadas as características físico-químicas dos mesmos, como a diminuição da tensão superficial (TS) ao longo do cultivo e concentração micelar crítica (CMC). Foram isolados 117 fungos de *P. hispidum* e 50 foram utilizados na produção do biossurfactante. Destes, oitos apresentaram resultados positivos no teste da gota colapsada e  $E_{24}$  variando entre 20 e 78%. Foram selecionados 32 cepas de endófitos de *M. guianensis* dos isolados da micoteca do Laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da EST/UEA, sendo que 12 apresentaram resultados positivos no teste da gota colapsada, com índices de emulsificação que variaram entre 60 e 75%. A partir dos melhores resultados os fungos foram recultivados em 1L de meio para extração e análises das características físico-químicas. A recuperação dos biossurfactantes foi realizada pelo método de extração em etanol a frio, sendo obtido entre 2,46 e 4,47 g/L de biossurfactantes. A diminuição da TS e os valores de CMC foram verificados somente para os meios metabólicos dos quatro fungos que apresentaram os melhores resultados de índice de emulsificação: MgRe 1.3.3; MgC 3.3.2; Ph II 22G e Ph III 23F. O meio metabólico que apresentou a maior diminuição da TS (37%) foi o do isolado de *M. guianensis* MgRe 1.3.3 (identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*), reduzindo-a de 61,0 para 39,0 mN.m<sup>-1</sup>. O menor valor de CMC foi encontrado para este mesmo endófito, de 4,6 mg.mL<sup>-1</sup>. Além desta linhagem, outras duas foram identificadas por técnicas de biologia molecular, sendo o isolado MgC 3.3.2 identificado como *Aspergillus niger* e o isolado Ph II 22G como *Glomerella cingulata*. Com base nesse resultados, foi possível identificar endófitos de *P. hispidum* e *M. guianensis* produtores de biossurfactantes, que apresentaram características físico-químicas promissoras para aplicação em diferentes setores industriais.

**Palavras-chaves:** Biossurfactantes, Fungos endofíticos, *P. hispidum*, *M. guianensis*.

## 1 INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos com atividade tensoativa, produzidos por várias espécies de microrganismos. Esses compostos compreendem uma grande diversidade de moléculas quimicamente diferentes como glicolipídios, lipossacarídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídios (BOGNOLO, 1999; LANG, 2002; MAIER, 2003) e alguns polímeros (DESAI e DESAI, 1993; MAIER, 2003).

Na medida em que possuem alta atividade tensoativa, os biossurfactantes apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (KOSARIC, 1992; BANAT, 1995). Diversos setores demandam compostos com estas características, tais como: petróleo, petroquímico, alimentos, bebidas, cosméticos, farmacêutico, mineração, metalúrgico, agroquímico, fertilizantes, ambiental, papel e celulose, entre outros (KOSARIC, 1992; DESAI e BANAT, 1997; BANAT, 1995; BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; MULLIGAN, 2005). Entre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente os produzidos pelo *Bacillus subtilis* (BOGNOLO, 1999).

Grande parte dos estudos envolvendo a produção de biossurfactantes descreve a obtenção destes compostos a partir de bactérias (TURKOVSKAYA, DMITRIEVA e MURATOVA, 1999; ARAÚJO, 2002; SOUZA et al., 2006; LIMA et al., 2007; JOSHI, BHARUCHA e DESAI, 2008; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008). A produção de biossurfactantes fúngicos, entretanto, é pouco descrita na literatura, embora alguns trabalhos venham demonstrando a possibilidade de utilizar fungos na produção destes compostos (CASTIGLIONI, BERTOLIN e COSTA, 2009).

Alguns trabalhos relacionados a microrganismos endofíticos isolados de plantas tropicais vêm crescendo nas últimas décadas, sendo que algumas pesquisas são restritas a determinadas espécies do Brasil e da Índia, países nos quais poucos grupos de pesquisadores têm se empenhado na busca de novos microrganismos com propriedades de interesse biotecnológico (OLIVEIRA et al., 2014).

Dentre as espécies tropicais, a *Piper hispidum* L. ou pimenta de macaco, que ocorre naturalmente na Amazônia, tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido à produção de um óleo essencial, o safrol, que apresenta uma ação eficaz no controle de fitopatógenos tradicionais, como fungos e bactérias, além de comprovada ação analgésica e antiinflamatória com baixos níveis de toxicidade (MAIA

et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; FONTES JUNIOR et al., 2002). Entretanto, trabalhos envolvendo a microbiota endofítica existente nesta planta ainda são incipientes.

As plantas do gênero *Myrcia* também têm despertado o interesse de pesquisadores, graças à presença de uma considerável quantidade de compostos biologicamente ativos em seus metabólitos secundários, tais como flavonóides, sesquiterpenos, monoterpenos, triterpenos e esteróides. Esses metabólitos podem ser encontrados nos óleos essenciais das folhas, flores e galhos da planta (CRUZ et al., 2002; KUSTER et al., 2003; CRUZ et al., 2004;). Banhos et al. (2014) verificaram atividade antifúngica e antibacteriana de extratos obtidos de metabólitos secundários de fungos endofíticos da espécie *M. guianensis*. Os extratos apresentaram efeito inibitório frente às cepas patogênicas *Candida albicans*, *Penicillium avelani* e *Staphylococcus aureus*.

Sabendo do potencial sintético dos fungos torna-se fundamental ampliar os conhecimentos a respeito da produção de biossurfactantes produzidos por estes versáteis organismos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de biossurfactantes fúngicos, verificando o potencial de fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* e *M. guianensis* da Região Amazônica na obtenção de moléculas tensoativas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.

A coleta do material vegetal foi realizada segundo a metodologia descrita por Araújo e colaboradores (2002). As coletas de três espécimes de *P. hispidum* ocorreram no período chuvoso, na estação experimental de hortaliças do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) que fica localizado no Km 14 da estrada AM-010.

Após a coleta, o material vegetal de *P. hispidum* foi acondicionado em sacos plásticos identificados com local e data de coleta, e transportado sob temperatura de 4°C para o laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da EST-UEA, onde foi processado num tempo máximo de 24 h após a coleta. O material vegetal coletado foi lavado com detergente líquido e água corrente. Em seguida, foi feita, em câmara asséptica, esterilização superficial com álcool 70%, tratamento com hipoclorito de sódio a 4% por

4 minutos, novamente imersão em álcool 70% e finalmente lavagem em água destilada estéril para o controle da assepsia.

As amostras de *P. hispidum* foram então cortadas em pequenos fragmentos, inoculadas em placas de Petri contendo meio Sabouraud acrescido de amoxicilina (0,5 g/L) para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. As placas com os fragmentos foram incubadas sob temperatura de 28°C por 7 a 14 dias, conforme observação macroscópica do crescimento dos fungos (ARAÚJO et al., 2002; GUIMARÃES, 2005).

Após sete dias, foi determinada a taxa de colonização (TC) (PETRINI, STONE e CARROLL, 1992), onde TC = número total de segmentos com um ou mais isolados/total de segmentos da amostra, expressa em percentagem determinada a partir da seguinte equação:

$$TC = \frac{n^{\circ} \text{ de fragmentos vegetais com crescimento fúngico}}{n^{\circ} \text{ total de fragmentos vegetais}}$$

Os fungos endofíticos de *M. guianensis* que foram utilizados neste trabalho foram isolados do material vegetal coletado por Banhos (2011) na Comunidade de São Pedro, localizada no município de Santarém/PA, em fevereiro de 2009. Esses fungos hoje fazem parte da micoteca do laboratório de Química Aplicada à Tecnologia da Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas (EST-UEA).

## 2.2 PURIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para purificação dos fungos foi utilizada a técnica por esgotamento em estrias para obtenção das colônias isoladas. Essa técnica consiste em fazer estrias, com auxílio de uma alça de platina, em meio sólido, onde, por esgotamento, se obtêm colônias isoladas no final das estrias. O meio utilizado para purificação foi o mesmo utilizado na inoculação inicial: BDA (Batata – Dextrose - Agar) para endófitos de *M. guianensis* e SB (Sabouraud) para os de *P. hispidum*, permitindo assim a manutenção das características de cada fungo. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 a 2 dias a 28°C. Posteriormente, foi retirada a colônia isolada, a qual foi inoculada no centro de outra placa com o mesmo meio de cultura. Assim, foi possível identificar as características de crescimento de cada fungo (ARAÚJO et al., 2002).

Os isolados foram identificados após a purificação com o número dos indivíduos (I, II ou III), por um código que consiste nas iniciais da planta PH (*P. hispidum*), o

número que indica a ordem de purificação, e uma letra representando o tecido do qual foi retirado (F para Folha, G para galho).

Os isolados fúngicos de *P. hispidum*, bem como os de *M. guianensis*, foram armazenados conforme a metodologia de Castellani (1939) e em óleo mineral.

### 2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

A identificação dos microrganismos endofíticos foi realizada através de análises das regiões do DNA ribossomal: ITS (ALBERTO et al., 2011) apenas para as linhagens que se apresentaram mais promissoras na produção de biossurfactantes.

Para a extração do DNA genômico foi adotado o procedimento de extração conforme o protocolo do Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™.

Os produtos de amplificação das regiões ITS 1- 4, do rDNA dos fungos endofíticos isolados foram purificados utilizando-se o kit ExoSAP-IT® e submetidos ao sequenciamento no sequenciador 3500 Series Genetic Analyzer da LIFE Technologies, com oito capilares. Após o sequenciamento, as amostras foram analisadas e editadas. Para a identificação dos isolados, as sequências nucleotídicas encontradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies (MAGNANI et al., 2005).

### 2.4 MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

A manutenção dos microrganismos foi feita em meio de cultura SB para os isolados de *P. hispidum* e BDA para os de *M. guianensis*. Para reativar o metabolismo dos fungos, estes foram cultivados em placas de Petri. O meio de cultivo foi preparado seguindo as orientações descritas pelo fabricante de cada meio. O mesmo foi submetido à autoclavagem a 121°C e 1 atm durante 20 min. Passado o tempo, o meio esterilizado foi levado para a câmara de fluxo laminar e vertido em placas de Petri onde foram repicados os fungos. Após devidamente seladas, as placas foram levadas à incubadora tipo BOD e mantidas a uma temperatura de 28°C de 3 a 5 dias, que foi tempo necessário para o crescimento dos fungos.

## 2.5 PREPARO DO INÓCULO

Para a obtenção do inóculo de fungos isolados de *P. hispidum*, foi preparado um meio sólido contendo ágar SB seguindo a recomendação descrita pelo fabricante do meio, acrescido de óleo de soja (0,5 g/L) como fonte indutora da produção de biossurfactante.

Para os fungos de *M. guianensis* foi feito um inóculo utilizando meio BDA e óleo de soja (0,5 g/L).

Após o crescimento dos fungos em meio sólido, foi preparada uma suspensão de  $1 \times 10^8$  esporos/mL (COSTA et al., 2012) dos fungos de *M. guianensis* a qual foi inoculada em meio líquido, a fim de verificar a produção de biossurfactantes.

Para os fungos de *P. hispidum* foram retirados fragmentos do meio SB com 6 x 6 mm de tamanho, que foram inoculados em meio líquido para observar a produção de biossurfactantes.

## 2.6 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

O meio líquido, descrito por Jacobucci (2000), foi composto por  $MgSO_4$  (0,5 g/L),  $Na_2HPO_4$  (3,0 g/L),  $KH_2PO_4$  (1,0 g/L) e extrato de levedura (1,3 g/L). Após autoclavagem, 0,5 g/L de óleo de soja foi adicionado ao meio e o mesmo foi homogeneizado. Em seguida inoculou-se 1,0 mL da suspensão de esporos ao meio líquido, para fungos de *M. guianensis* ou dois fragmentos contendo micélio dos fungos de *P. hispidum*.

Os fungos foram cultivados em incubadora tipo shaker a 28°C sob agitação constante de 170 rpm, durante 7 dias. No final do experimento, o meio metabólico foi filtrado para separação do micélio. O meio foi filtrado utilizando membrana filtrante com auxílio de bomba a vácuo. Em seguida os meios livres de células foram utilizados para o teste qualitativo da produção de biossurfactantes de colapso da gota e para determinação do índice de emulsificação (E%). Os cultivos foram realizados em triplicata.

## 2.7 TESTE DA GOTA COLAPSA

De acordo com Bodour e Miller-Maier (1998), para realização deste teste 5  $\mu\text{L}$  do extrato filtrado obtido de cada meio foi inoculado separadamente em "poços" de placas de poliestireno com 96 micropoços (placa de ELISA) previamente preenchidos com 1,8  $\mu\text{L}$  de óleo mineral deixado a temperatura ambiente por 24 horas. O resultado foi determinado visualmente após 1 minuto de reação. Foram considerados positivos os resultados observados nos poços em que houve o colapso da gota de óleo mineral e para os que não colapsaram o resultado foi negativo. O controle positivo foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) a 25% e o controle negativo foi o próprio meio de cultivo. Antes da utilização de cada placa, as mesmas foram lavadas três vezes cada com água quente, etanol, e água destilada, e em seguida foram secas para o uso. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Uma mistura de 6 mL de solvente (querosene) e 4 mL de solução do surfactante sintético (controle) ou de meio de cultivo contendo biossurfactante foi misturada em agitador tipo vórtex durante 2 minutos. A atividade emulsificante foi investigada após 24 h e o índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) foi calculado dividindo-se a medida da altura da camada de emulsão pela altura total da mistura, multiplicando-se por 100. Quanto maior o índice de emulsificação, maior a atividade emulsificante do surfactante avaliado (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata.

O índice de emulsificação do SDS a 1% também foi determinado para fins de comparação.

## 2.9 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL

Os fungos que apresentaram resultados promissores nos testes de gota colapsada e de índice de emulsificação foram recultivados em meio líquido como descrito no item 2.6 durante 20 dias e de 2 em 2 dias foi retirada uma amostra desses meios para determinação da tensão superficial.

As medidas de tensão superficial foram realizadas pelo método da gota, segundo a metodologia descrita por Teixeira Neto et al. (2009). O método da gota consiste no

ajuste da vazão do líquido verificado para razão de 1 gota por minuto. Em um frasco pequeno com o auxílio de uma pipeta foram coletadas 5 gotas de água ultrapura, as quais foram pesadas. Em seguida foram coletadas mais 10 gotas, totalizando 15 gotas. O peso das 5 gotas foi subtraído do das 15 gotas, resultando então no peso de 10 gotas. O peso destas foi dividido por 10 e assim encontrou-se a massa de uma gota. Partindo-se dessa massa verificou-se com o auxílio da tabela apresentada no Anexo 1, o raio da pipeta. Tendo em vista que há uma relação entre o raio da pipeta e o volume da gota, verificado com o auxílio da tabela apresentada no Anexo 2, encontrou-se um fator de correção usado no cálculo da tensão superficial. Este fator de correção é necessário, visto que 40% do líquido que forma a gota permanece ligado ao tubo, neste caso, na pipeta. Logo, a partir da equação apresentada abaixo, foi possível determinar a tensão superficial apenas com a massa da gota.

$$\gamma = \frac{m_i \cdot g}{2 \cdot \pi \cdot r \cdot f}$$

Onde:

$\gamma$  = tensão superficial;

$r$  = raio da pipeta;

$g$  = aceleração da gravidade;

$f$  = fator de correção;

$m_i$  = massa da gota.

As linhagens fúngicas que se mostraram mais promissoras, ou seja, aquelas que produziram biossurfactantes com maior índice de emulsificação e maior diminuição na tensão superficial ao longo do tempo de cultivo foram selecionadas e cultivadas em maior escala, com um 1L de meio, de onde foi extraída a molécula tensoativa.

## 2.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

As CMCs foram determinadas construindo-se gráficos da tensão superficial versus diferentes concentrações dos biossurfactantes, após serem extraídos dos meios de cultivo. O ponto central de inflexão da curva irá determinar a CMC (SHEPPARD e MULLIGAN, 1987). Os resultados foram comparados com a CMC do SDS.

## 2.11 EXTRAÇÃO DO BIOSURFACTANTE

Os compostos tensoativos foram isolados do meio de cultura livre de células utilizando a precipitação com etanol como método de extração. Nesta técnica o caldo livre de células foi misturado com quatro volumes de etanol a frio (1: 4 v/v) e mantido a 4°C durante 48 h. O precipitado formado foi coletado por centrifugação a 5000 rpm durante 20 min e tratado com clorofórmio-metanol (2:1, v/v), a fim de remover os óleos residuais, e seco a 60°C, até que o peso se tornasse constante (MONTEIRO et al., 2010).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *P. hispidum*

Para os três espécimes de *P. hispidum*, foram utilizados 25 fragmentos de cada tecido vegetal (caule e folha). Foi obtido um total de 117 fungos endofíticos encontrados a partir de 150 fragmentos, demonstrando a eficiência do método de isolamento empregado (78% do total de fragmentos apresentaram crescimento fúngico). A taxa de colonização (TC) dos tecidos vegetais por espécime está apresentada na Tabela 1.

De acordo com os dados representados na Tabela 1, o tecido vegetal que mais apresentou crescimento fúngico foi a folha, com TC dos indivíduos I e III de 92% e 100%, respectivamente. Os indivíduos I e II apresentaram TC de colonização nos galhos próxima à observada nas folhas, enquanto a TC dos galhos da espécime III foi mais baixa que a das folhas.

Tabela 1 - Número de fungos endofíticos encontrados por espécime de *P. hispidum* e taxa de colonização dos tecidos vegetais.

Amostras	Número de isolados		Taxa de Colonização (%)	
	Folhas	Galhos	Folhas	Galhos
I	23	20	92	80
II	18	18	72	72
III	25	13	100	52

Guimarães (2006) sugeriu que existem duas maneiras para disseminação dos fungos na planta: a transferência vertical quando os fungos são transmitidos através da semente e a transferência horizontal quando as colônias fúngicas são passadas de planta para planta. Considerando a disseminação horizontal dos fungos, pode-se justificar a obtenção de um maior número de isolados fúngicos nas folhas. Além disso, os tecidos de galhos apresentam maior resistência frente às alterações no habitat natural, oferecendo então um ambiente menos favorável ao fluxo de microrganismos nesses tecidos.

Assim que fungos começaram a se desenvolver apresentando crescimento entre 7 e 14 dias (Figura 1), o processo de purificação foi realizado. Alguns dos fungos purificados estão apresentados na Figura 2. Os fungos purificados estão conservados pelo método de Castellani (1939) e estão apresentados na Figura 3.

Figura 1 - Crescimento dos fungos endofíticos de *Piper hispidum*.

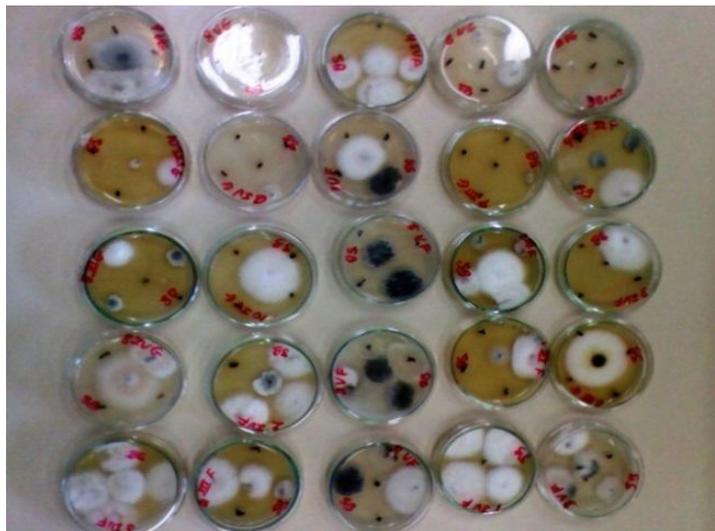


Figura 2 - Fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* após purificação.

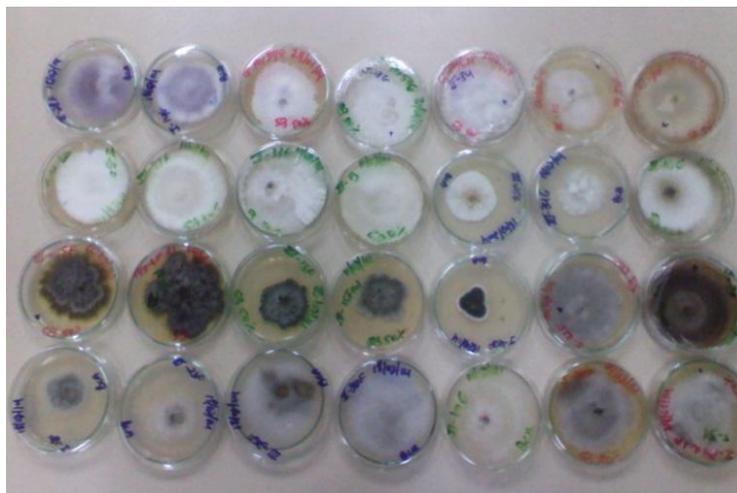


Figura 3 - Fungos de *Piper hispidum* conservados.



### 3.2 TESTE DA GOTA COLAPSADA

Para esse teste foram selecionadas aleatoriamente 32 cepas dos fungos endofíticos de *M. guianensis* e 50 cepas dos fungos isolados de *P. hispidum*. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Conforme a Tabela 2, observa-se que das 32 cepas isoladas de *M. guianensis*, 12 apresentaram resultado positivo para a produção de biossurfactantes, mostrando assim que os fungos endofíticos de *M. guianensis* têm potencial para produzir moléculas tensoativas. Dos 50 isolados de *P. hispidum* avaliados, 8 apresentaram produção de biossurfactantes no teste da gota colapsada.

Youssef et al. (2004) compararam este método de triagem com vários testes para verificar a produção de biossurfactantes por microrganismos. Os autores afirmam que o teste do colapso da gota é um método rápido e confiável para a detecção de biossurfactantes.

Os dados obtidos no presente estudo comprovam os resultados de produção positiva de biossurfactante encontrados por Tugrul e Cansunar (2005), que utilizaram a mesma metodologia para demonstrar a capacidade de produção de biossurfactantes por bactérias.

Tabela 2 - Resultados do teste da gota colapsada do meio metabólico de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* e *Piper hispidum*.

N <sup>0</sup>	Linhagem	CG	N <sup>0</sup>	Linhagem	CG	N <sup>0</sup>	Linhagem	CG	N <sup>0</sup>	Linhagem	CG	N <sup>0</sup>	Linhagem	CG
1	MgC 2.1.2	-	18	MgC 3.1.3	-	35	Ph I 10 F	-	52	Ph I 32 F	-	69	Ph III 13 F	-
2	MgC 3.1.1	+	19	MgC 3.3.1	-	36	Ph I 34 F	-	53	Ph I 39 F	-	70	Ph I 2 G	-
3	MgRe 2.3.1	+	20	MgCe 1.1.2	+	37	Ph I 18 F	-	54	Ph II 35 G	-	71	Ph I 35 G	-
4	MgRe 2.1.1	+	21	MgRe 1.1.1	-	38	Ph I 16 F	-	55	Ph II 26 F	-	72	Ph I 19 F	-
5	MgRe 1.3.3	+	22	MgF 2.3.2	-	39	Ph III 12 G	-	56	Ph III 15 F	-	73	Ph I 25 F	-
6	MgC 3.3.2	+	23	MgCe 3.1.2	-	40	Ph I 44 F	-	57	Ph II 19 F	+	74	Ph I 14 G	-
7	MgRe 1.3.1	+	24	MgF 3.1.1	-	41	Ph I 28 G	-	58	Ph I 43 G	+	75	PH I 14 G	-
8	MgCe 2.2.1	+	25	MgF 1.1.2	-	42	Ph II 6 F	+	59	Ph II 22 G	+	76	PH I 18 F	-
9	MgCe 2.2.3	-	26	MgCe 3.3.1	+	43	Ph I 39 F	+	60	Ph III 12 G	+	77	PH III 12 G	-
10	MgRe 1.3.2	-	27	MgC 3.1.2	-	44	Ph III 1 G	-	61	Ph I 40 F	-	78	PH II 34 F	-
11	MgF 1.2.1	-	28	MgF 2.3.1	-	45	Ph II 2 G	-	62	Ph III 30 F	-	79	PH III 25 G	-
12	MgRe 1.1.2	-	29	MgF 1.2.3	-	46	Ph I 31 G	-	63	Ph II 31 G	-	80	PH I 21 G	-
13	MgRe 1.2.2	-	30	MgCe 1.2.2	-	47	Ph III 33 F	-	64	Ph I 22 G	-	81	PH I 7 F	-
14	MgRe 2.2.1	-	31	MgCe 2.3.1	+	48	Ph III 28 G	+	65	Ph III 34 G	-	82	PH II 28 F	-
15	MgR 3.1.3	+	32	Ph III 31 F	-	49	Ph II 17 G	-	66	Ph II 9 G	-	CP	SDS 25%	+
16	MgC 2.2.1	-	33	Ph I 17 F	-	50	Ph II 30 F	-	67	Ph I 13 G	-	CN	Meio de cultivo	-
17	MgC 3.1.2	+	34	Ph III 26 F	-	51	Ph III 23 F	+	68	Ph II 34 G	-			

Mg = *Myrcia guianensis*; C = caule; Re = parte externa da raiz; Ce = parte externa do caule; F = folha; R = raiz; Ph = *Piper hispidum*; - = não apresentou produção de biossurfactantes; + = apresentou produção de biossurfactantes; SDS = dodecil sulfato de sódio; CP = controle positivo; CN = controle negativo; CG = colapso da gota.

### 3.3 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

O teste de índice de emulsificação é um teste qualitativo e quantitativo para avaliar a produção de biossurfactantes. Os resultados obtidos com os meios metabólicos dos 32 fungos endofíticos de *M. guianensis* e dos 50 fungos de *P. hispidum* podem ser observados na Tabela 3.

Como pode ser observado na Tabela 3, o SDS é um surfactante com elevado poder emulsificante ( $E_{24} = 88\%$ ), uma das razões para ser amplamente utilizado em diferentes indústrias (FERREIRA, 2006).

Os resultados do índice de emulsificação dos meios metabólicos foram comparados com o surfactante sintético SDS. Algumas cepas se mostraram promissoras em comparação ao SDS, formando emulsões com valor de  $E_{24}$  próximas do mesmo na presença de querosene. A cepa que mais se destacou dos isolados de *M. guianensis* foi a MgC 3.3.2, isolado do caule, com 75% de índice de emulsificação, seguida do isolado MgRe 1.3.3, com  $E_{24} = 62\%$ .

Para os fungos de *P. hispidum*, alguns resultados de  $E_{24}$  foram próximos do obtido com o SDS. A cepa fúngica que mais se aproximou desse resultado foi a Ph III 23 F com 78% de índice de emulsificação, seguida do isolado Ph II 22G, com  $E_{24} = 73\%$ .

A Figura 4 representa os testes de índice de emulsificação que foram realizados com os meios metabólicos dos fungos endofíticos de *P. hispidum*.

Figura 4 - Teste de índice de emulsificação com os meios metabólicos de endófitos de *Piper hispidum*.



Tabela 3 - Índice de emulsificação (E<sub>24</sub>) do meio líquido de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* e *Piper hispidum* após 7 dias de cultivo.

N <sup>0</sup>	Linhagem	E <sub>24</sub> %	N <sup>0</sup>	Linhagem	E <sub>24</sub> %	N <sup>0</sup>	Linhagem	E <sub>24</sub> %	N <sup>0</sup>	Linhagem	E <sub>24</sub> %	N <sup>0</sup>	Linhagem	E <sub>24</sub> %
1	MgC 2.1.2	-	18	MgC 3.1.3	-	35	Ph I 10 F	-	52	Ph I 32 F	-	69	Ph III 13 F	-
2	MgC 3.1.1	67	19	MgC 3.3.1	-	36	Ph I 34 F	-	53	Ph I 39 F	-	70	Ph I 2 G	-
3	MgRe 2.3.1	64	20	MgCe 1.1.2	58	37	Ph I 18 F	-	54	Ph II 35 G	-	71	Ph I 35 G	-
4	MgRe 2.1.1	72	21	MgRe 1.1.1	-	38	Ph I 16 F	-	55	Ph II 26 F	-	72	Ph I 19 F	-
5	MgRe 1.3.3	73	22	MgF 2.3.2	-	39	Ph III 12 G	-	56	Ph III 15 F	-	73	Ph I 25 F	-
6	MgC 3.3.2	75	23	MgCe 3.1.2	-	40	Ph I 44 F	-	57	Ph II 19 F	50	74	Ph I 14 G	-
7	MgRe 1.3.1	60	24	MgF 3.1.1	-	41	Ph I 28 G	-	58	Ph I 43 G	49	75	PH I 14 G	-
8	MgCe 2.2.1	61	25	MgF 1.1.2	-	42	Ph II 6 F	60	59	Ph II 22 G	62	76	PH I 18 F	-
9	MgCe 2.2.3	-	26	MgCe 3.3.1	55	43	Ph I 39 F	20	60	Ph III 12 G	51	77	PH III 12 G	-
10	MgRe 1.3.2	-	27	MgC 3.1.2	-	44	Ph III 1 G	-	61	Ph I 40 F	-	78	PH II 34 F	-
11	MgF 1.2.1	-	28	MgF 2.3.1	-	45	Ph II 2 G	-	62	Ph III 30 F	-	79	PH III 25 G	-
12	MgRe 1.1.2	-	29	MgF 1.2.3	-	46	Ph I 31 G	-	63	Ph II 31 G	-	80	PH I 21 G	-
13	MgRe 1.2.2	-	30	MgCe 1.2.2	-	47	Ph III 33 F	-	64	Ph I 22 G	-	81	PH I 7 F	-
14	MgRe 2.2.1	-	31	MgCe 2.3.1	58	48	Ph III 28 G	60	65	Ph III 34 G	-	82	PH II 28 F	-
15	MgR 3.1.3	61	32	Ph III 31 F	-	49	Ph II 17 G	-	66	Ph II 9 G	-	CP	SDS 1%	88
16	MgC 2.2.1	-	33	Ph I 17 F	-	50	Ph II 30 F	-	67	Ph I 13 G	-	CN	Meio de cultivo	-
17	MgC 3.1.2	62	34	Ph III 26 F	-	51	Ph III 23 F	78	68	Ph II 34 G	-			

Mg = *Myrcia guianensis*; C = caule; Re = parte externa da raiz; Ce = parte externa do caule, F = folha; R = raiz; G = galho, Ph= *Piper hispidum*; - = não apresentou produção de biossurfactantes; + = apresentou produção de biossurfactantes; SDS = dodecil sulfato de sódio; CP = controle positivo; CN = controle negativo.

Estes resultados foram similares aos resultados obtidos por Benuto et al. (2013), que avaliaram a produção de biossurfactantes de 54 fungos filamentosos pelo teste físico-químico de índice de emulsificação, sendo que seus resultados de  $E_{24}$  variaram entre 50 e 80% na presença de querosene como solvente.

Os índices de emulsificação apresentados na Tabela 3 resultaram em valores bem próximos, o que pode ser explicado pela capacidade similar dos avaliados na produção de biossurfactantes e também pela utilização da mesma fonte de carbono como agente apolar. Entretanto, este teste foi realizado para atestar a formação de emulsões entre os biossurfactantes e o contaminante (solvente). Segundo alguns autores os biossurfactantes que apresentam baixa massa molecular baixam a tensão superficial de forma mais eficiente, enquanto as de alta massa molecular se caracterizam por formar emulsões de sistemas óleo/água mais estáveis (RON e ROSENBERG, 2002; BACH, BERDICHEVSKY e GUTNICK, 2003; HAMME, SINGH e WARD, 2006).

#### 3.4 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL

Os fungos que foram utilizados neste teste são os que apresentaram os melhores resultados no índice de emulsificação: Ph III 23F, MgC 3.3.2 Ph II 22G e MgRe 1.3.3, com  $E_{24} = 78\%$ ,  $75\%$ ,  $73\%$  e  $62\%$  respectivamente. Estes fungos foram recultivados em meio líquido como descrito no item 2.6 durante 20 dias.

As medidas de tensão superficial dos meios metabólicos dos endófitos MgC 3.3.2, Ph II 22G, Ph III 23F e MgRe 1.3.3, ao longo do tempo de cultivo estão apresentadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Figura 5 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo endófito de *Myrcia guianensis* MgC 3.3.2.

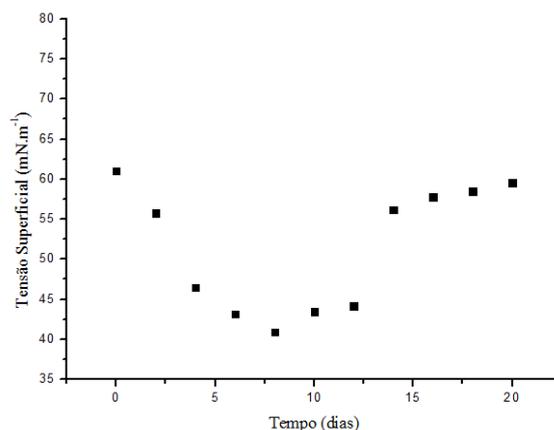


Figura 6 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo endofítico de *Piper hispidum* Ph II 22G.

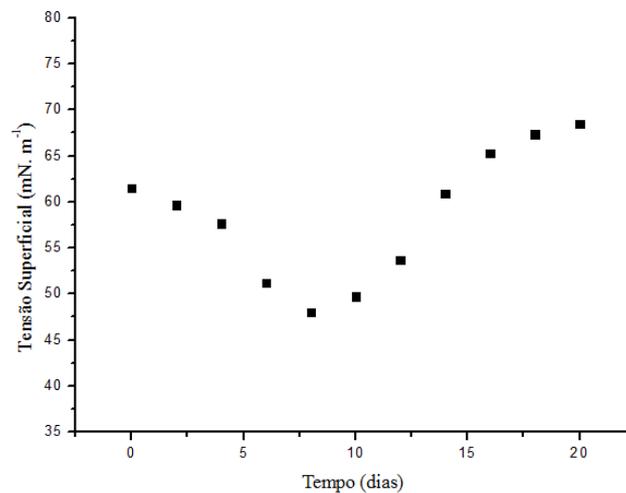


Figura 7- Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo endofítico de *Piper hispidum* PH III 23F.

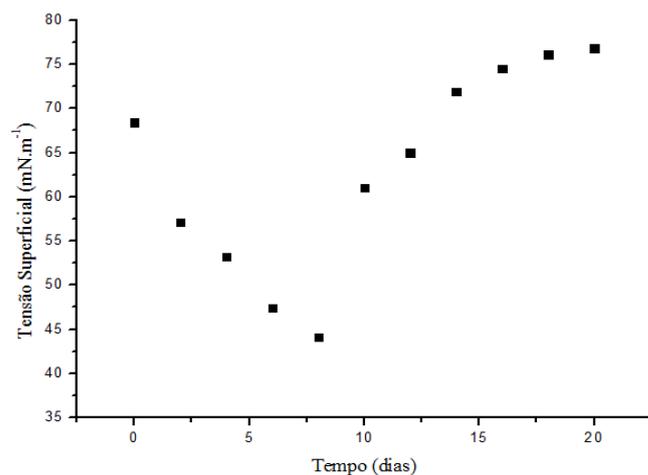
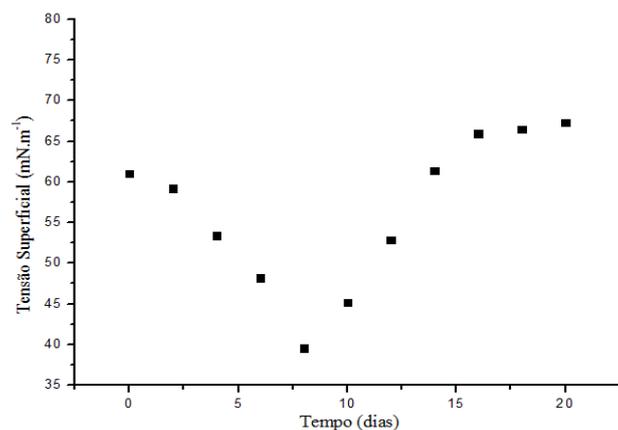


Figura 8- Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo endofítico de *Myrcia guianensis* MgRe 1.3.3.



Nas Figuras 5, 6, 7 e 8 observa-se que para todos os meios metabólicos houve diminuição da tensão superficial já no segundo dia de cultivo, e que os valores mínimos foram alcançados após 8 dias de cultivo. Dessa forma, pode-se inferir que com 8 dias de crescimento em meio líquido contendo óleo de soja, os endófitos analisados neste estudo apresentaram a produção máxima de moléculas tensoativas.

Na Tabela 4, estão apresentados os percentuais de diminuição da tensão superficial dos meios de cultivo após 8 dias de crescimento dos fungos endofíticos de *M. guianensis* e *P. hispidum*.

Tabela 4 - Diminuição da tensão superficial (TS) dos meios metabólicos após 8 dias de cultivos dos fungos testados.

Fungos Endofíticos	TS inicial (mN.m <sup>-1</sup> )	TS após 8 dias de cultivo (mN.m <sup>-1</sup> )	Diminuição da TS (%)
MgC 3.3.2	61,0	40,0	35
Ph II 22 G	61,5	48,0	22
Ph III 23 F	68,4	44,0	36
MgRe 1.3.3	61,0	39,0	37

Na Tabela 4 observa-se que ocorreu a diminuição da tensão superficial dos meios de cultivos dos quatro fungos testados, indicando que os fungos produziram moléculas com propriedades tensoativas. Por outro lado, observa-se também nas Figuras 6, 7, 8 e 9 que depois de 8 dias de cultivo ocorreu um aumento da tensão superficial dos meios, reduzindo assim a quantidade de moléculas tensoativas no meio. Segundo Makkar e Rockne (2003) o biossurfactante também é uma fonte de carbono e muitas vezes mais assimilável que a fornecida para a sua produção, portanto o aumento na tensão superficial pode ser explicado pelo fato dos isolados possivelmente terem consumido o biossurfactante por eles inicialmente sintetizado, permitindo assim a continuidade do crescimento dos isolados e redução das moléculas tensoativas.

O meio metabólico do fungo MgRe 1.3.3 apresentou a maior diminuição da TS após 8 dias de cultivo, de 37%, reduzindo de 61,0 para 39,0 mN.m<sup>-1</sup>. O meio metabólico do fungo MgC 3.3.2 apresentou 35% de redução da TS, de 61,0 para 40,0 mN.m<sup>-1</sup>. Segundo Haba et al. (2000), os microrganismos ditos bons produtores de biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial a 40 mN.m<sup>-1</sup> ou menos.

Segundo Deleu e Paquot (2004), a redução da tensão superficial ou interfacial é considerada o principal parâmetro para detecção de um composto tensoativo em um determinado meio.

Barbosa (2011) avaliou a TS do fungo UEA\_119 durante 30 dias de cultivo na presença de óleo de soja e verificou redução da tensão superficial, de 78,05 mN.m<sup>-1</sup> para 50,68 mN.m<sup>-1</sup>, ou seja, 35,1% de redução, comparável aos resultados observados no presente estudo.

### 3.5 EXTRAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Os compostos tensoativos foram extraídos do meio de cultura livre de células dos fungos Mgc 3.3.2, MgRe 1.3.3, Ph III 23F e Ph II 22G, utilizando a precipitação com etanol como método de extração. Os resultados obtidos para os rendimentos dos biossurfactantes extraídos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de rendimento de extração dos biossurfactante.

N <sup>o</sup>	Linhagem	Rendimento (g/L)
1	Mgc 3.3.2	4,47
2	MgRe 1.3.3	4,22
3	Ph III 23F	2,66
4	Ph II 22G	2,46

Verifica-se que os rendimentos ficaram bem próximos aos observados por Mukherjee, Das e Sen (2006), que também utilizaram o óleo de soja como fonte de carbono no cultivo dos fungos. Os autores obtiveram um rendimento para os biossurfactantes produzidos entre 2,98 e 4,31 g/L.

Observando a Tabela 5 percebe-se que a linhagem fúngica MgC 3.3.2 foi a que promoveu o maior rendimento na extração dos biossurfactantes, com valor superior ao encontrado por Mukherjee, Das e Sen (2006).

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A adição de moléculas tensoativas à água tende a saturar todas as interfaces, de modo que a partir de uma concentração denominada Concentração Micelar Crítica (CMC) tem-se a saturação das superfícies e, conseqüentemente, a formação de micelas. A CMC é a menor concentração onde ocorre a formação de micelas de um biossurfactante. A micela é a um agregado de moléculas de tensoativo com melhor estabilidade em solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas e a parte hidrofílica das moléculas voltada para a água (SANTOS et al., 2007), no caso de soluções aquosas. A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes pode ser utilizada para determinar sua eficiência. A CMC dos biossurfactantes brutos produzidos no presente estudo, foi determinada através das medidas de tensão superficial, para várias concentrações dos mesmos, obtidas através de diluições sucessivas. As Figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam os resultados de CMC obtidos no presente estudo para os biossurfactantes brutos extraídos dos meios metabólicos dos fungos endofíticos MgC 3.3.2, Ph II 22G, Ph III 23F e MgRe 1.3.3, respectivamente.

Figura 9 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo endofítico de *Myrcia guianensis* MgC 3.3.2.

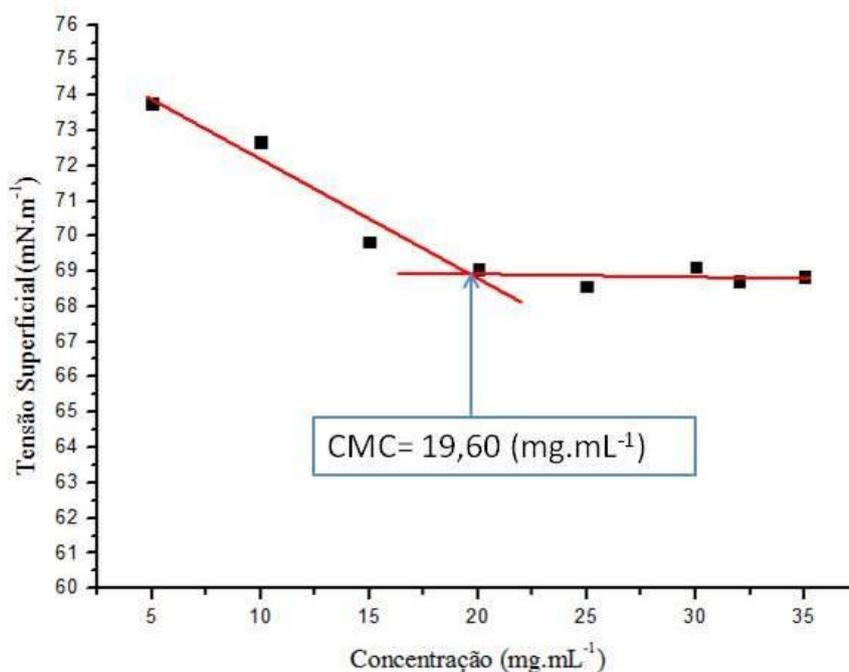


Figura 10 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo endofítico de *Piper hispidum* Ph II 22G.

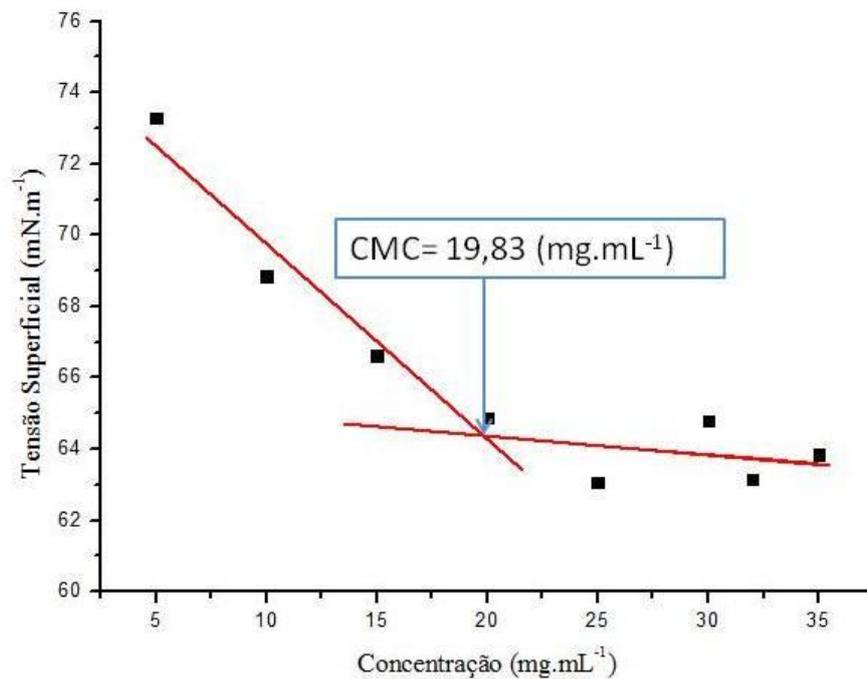


Figura 11 - Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo endofítico de *Piper hispidum* Ph III 23F.

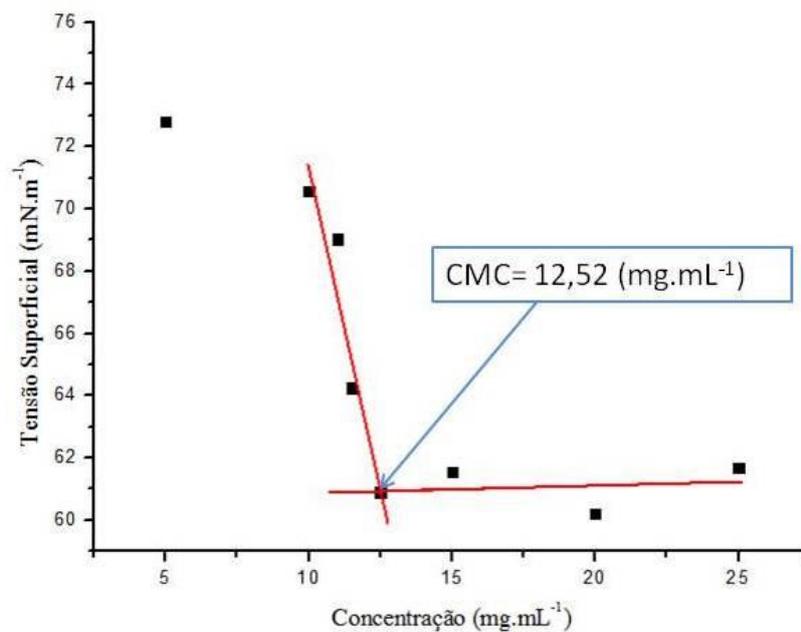
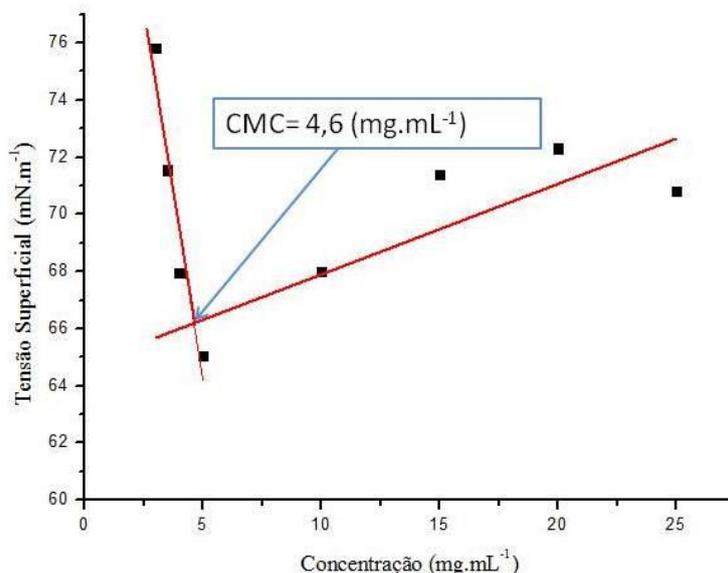


Figura 12- Variação da tensão superficial em função da concentração de biossurfactante bruto produzido pelo fungo endofítico de *Myrcia guianensis* MgRe 1.3.3.



Nas Figuras 9, 10, 11 e 12 observa-se que a CMC dos biossurfactantes produzidos pelos fungos endofíticos MgC 3.3,2, Ph II 22G, Ph III 23F e MgRe 1.3.3 foram de 19,63 mg.mL<sup>-1</sup>; 19,83 mg.mL<sup>-1</sup>; 12,52 mg.mL<sup>-1</sup> e 4,6 mg.mL<sup>-1</sup> respectivamente.

A menor CMC dos biossurfactantes testados foi a obtida com o biossurfactante produzido pelo fungo MgRe 1.3.3 (4,6 mg.mL<sup>-1</sup>, Figura 12). Isso indica que essa é a concentração de saturação de toda a superfície da água, reduzindo a TS do líquido de 74 para 65 mN.m<sup>-1</sup>.

As concentrações micelares críticas dos biossurfactantes obtidos neste estudo são altas, quando comparadas a outros biossurfactantes reportados na literatura. Entretanto, vale ressaltar que os resultados de CMC aqui obtidos foram calculados para as amostras brutas dos biossurfactantes extraídos dos meios de cultivo dos fungos endofíticos, sem nenhuma etapa de purificação.

Nitschke et al. (2010) determinaram a CMC de um biossurfactante semipurificado produzido por *B. subtilis* LB5 e encontraram o valor de 0,033 mg.mL<sup>-1</sup>. Em outro estudo, Ciapina (2008) avaliou a CMC de biossurfactantes brutos produzidos por *Rhodococcus* spp e encontrou o valor de 0,42 mg.mL<sup>-1</sup>. Costa (2005) determinou a CMC de biossurfactantes purificados produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* e encontrou um valor médio de 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>.

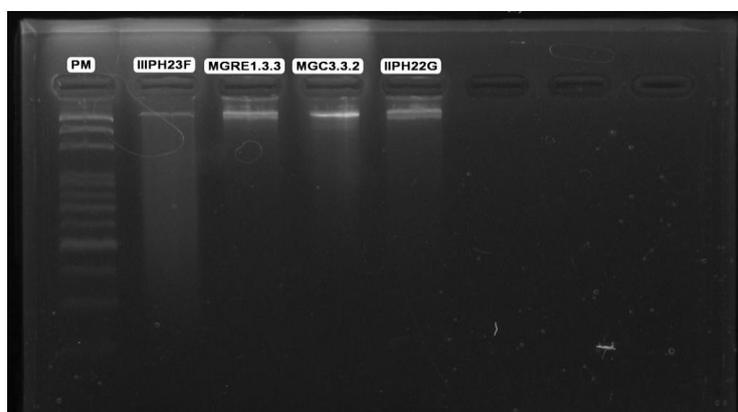
Zhang e Miler (1992) e Monteiro (2007) relataram que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está tipicamente entre 1 e 2000 mg.L<sup>-1</sup> (0,001 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>) para biossurfactantes purificados. Embora os biossurfactantes obtidos no presente trabalho apresentem CMC acima do que é considerado ideal, por outro lado, os valores de índice de emulsificação foram muito bons, quando comparados com o SDS, um dos surfactantes químicos mais utilizados nas maiorias das indústrias que possui CMC de 8,2 mM, ou 2,365 mg.mL<sup>-1</sup> (MUKERJEE e MYSELS, 1971).

Ainda para fins comparativos, cabe mencionar o trabalho de Sen et al. (2005) que avaliaram a CMC da surfactina padrão comercial (Sigma – 98% de pureza), e encontraram o valor de 0,013 mg.mL<sup>-1</sup>. Este biossurfactante reduziu a tensão superficial da água de 70 para aproximadamente 31 mN.m<sup>-1</sup>, mostrando uma alta eficiência tensoativa da substância purificada.

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Os fungos endofíticos que se mostraram mais promissores em relação à produção de biossurfactantes foram identificados por meio de técnicas de biologia molecular. Observa-se pela foto do gel (Figura 13) que o DNA dos quatro fungos foram extraídos. Na sequência os DNAs extraídos foram submetidos à reação por PCR (Polymerase Chain Reaction).

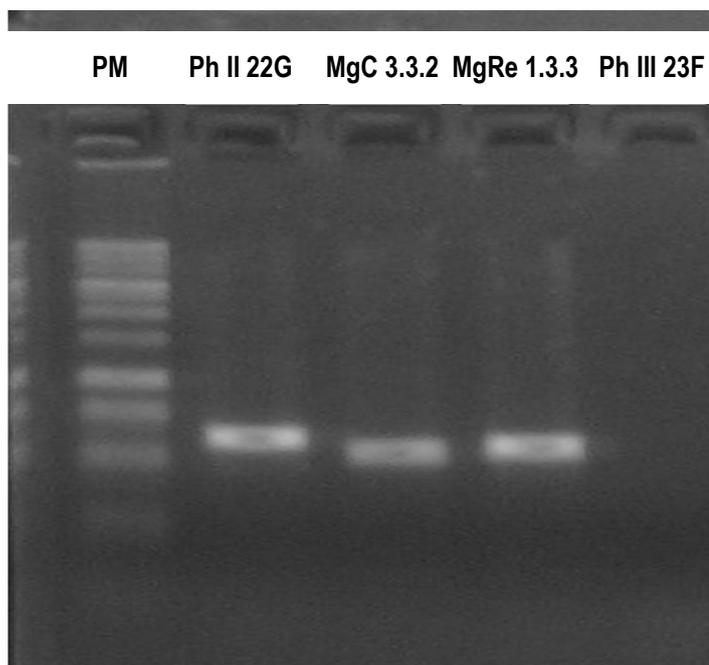
Figura 13 - Foto do gel de extração do DNA dos fungos endofíticos Ph III 23F, MgRe 1.3.3, MgC 3.3.2 e Ph II 22G.



PM = Marcador de Peso Molecular

Após a PCR analisou-se a foto do gel (Figura 15) e observou-se que para o DNA do fungo Ph III 23F não ocorreu a amplificação das regiões de interesse (regiões ITS, 1 e 4). Isso pode ter acontecido pelo fato de que o protocolo para a PCR não está adequado para esse fungo, sendo necessário otimizar a metodologia, ou ainda pode ter ocorrido a contaminação da amostra. Para os demais fungos foi possível obter as regiões de interesse amplificadas, como observado na Figura 14.

Figura 14 - Foto do gel de PCR dos fungos endofíticos Ph III 23F, MgRe 1.3.3, MgC 3.3.2 e Ph II 22G.



PM = Marcador de Peso Molecular

Após o sequenciamento e comparação com o banco de dados, o fungo MgRe 1.3.3 foi identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*, com 86% de identidade. *Colletotrichum gloeosporioides* é uma espécie de fungo pertencente à ordem Melanconiales, da classe Coelomycetes. Os fungos deste gênero, juntamente com sua fase perfeita, são considerados os maiores patógenos de plantas em todo o mundo. Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, causadores de uma diversidade de doenças como antracnose, podridão de pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão (BAILEY e JEGER, 1992).

A espécie *C. gloeosporioides* é encontrada frequentemente como endófito. Santos et al. (2010) reportaram que esta espécie foi a isolada com maior frequência de colonização (27,77%) a partir da planta hospedeira *Indigofera suffruticosa* Mill.

Este gênero também vem sendo utilizado para aplicações biotecnológicas. Cavalcante et al. (2006) cultivaram em meio sólido fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* e seu metabolitos foram extraídos e utilizados em bioensaios alelopáticos frente a plantas invasoras de pastagens..

O isolado MgC 3.3.2 foi identificado como *Aspergillus niger*, com 93% de identidade. O gênero *Apergillus* apresenta mais de 185 espécies encontradas nos mais diversos habitats. O grupo é caracterizado por possuir cabeças conidiais escuras geralmente negros com conidióforos hialinos acinzentados e cabeças globais (ELIZEI, 2009).

O *Aspergillus niger* faz parte dos fungos filamentosos que constitui um grupo de microrganismos aeróbios fisiologicamente diversos. Estes fungos podem se desenvolver em meio líquidos e sólidos. Em seu ambiente natural são encontrados frequentemente em superfícies de líquidos e sólidos de tal maneira que uma grande parte de suas hifas é aérea. É um fungo ascomiceto imperfeito (classes dos fungos mitosporicos) por possuir coloração preta (*niger*: preto em latim), tendo uma grande variedade de cepas e subespécies (RODRIGUES, 2006).

Esse fungo tem a capacidade de produzir diversas substâncias bioativas, e é muito utilizado para a produção comercial de enzimas, especialmente por possuir a capacidade de crescer em substratos de baixo custo (SANTOS, 2005; SLIVINSKI, 2007).

Segundo Kannahi e Sherley (2012), esse fungo foi capaz de produz biosurfactantes da classe dos glicolipídeos, utilizando pH (7), temperatura (45 ° C), fonte de carbono (amido) e fonte de nitrogênio (uréia).

Esta espécie também é comumente encontrada como endofítica. Souza et al. (2004) identificaram a espécie *A. niger*, bem como fungos dos gêneros *Colletotrichum*, e *Guignardia*, entre 571 fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia, (*Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*).

O fungo Ph II 22G foi identificado como *Glomerella cingulata*, com 95% de identidade. Este fungo é conhecido como um dos principais patógenos de plantas, o mesmo apresenta na sua fase assexuada, ou imperfeita, micélio septado, ramificado e sua coloração fica negra com o envelhecimento (CHAVES, 1980). Os conídios são

hialinos, unicelulares, de alongados a cilíndricos, eretos, sem ramificação e medem de 40 a 60  $\mu\text{m}$  de comprimento, apresentando as extremidades arredondadas ou uma delas pontiagudas. Normalmente, medem de 4,4 a 5,3  $\mu\text{m}$  de raio e o seu perímetro varia entre 13 a 22  $\mu\text{m}$ . Geralmente apresentam, na parte central, uma área clara semelhante a um vacúolo. Um conídio, ao germinar, pode emitir de um a quatro tubos germinativos, sendo mais freqüente dois, os quais formam apressórios em seus ápices por ocasião da penetração do hospedeiro. Os conídios são produzidos nos acérvulos, que são os corpos de frutificação do patógeno. Em condições favoráveis à doença, o patógeno esporula abundantemente, formando uma massa de conídios de cor rósea. As setas podem, às vezes, ser encontradas mergulhadas nos tecidos do hospedeiro e quase sempre estão presentes quando o patógeno é cultivado em meio de cultura. Estas setas, que são produzidas entre os conidióforos ou nas margens dos acérvulos, são pontiagudas, rígidas, de cor castanha e seu comprimento varia de 30 a 100  $\mu\text{m}$  (CHAVES, 1980).

Oliveira (2010) isolou fungos endofíticos de *P. hispidum* e caracterizou macromorfológicamente os isolados, tendo também encontrado o gênero *Glomerella* dentre os grupos morfológicos caracterizados.

## CONCLUSÃO

A partir dos tecidos vegetais das espécies amazônicas *P. hispidum* e *M. guianensis* foi possível isolar fungos endofíticos produtores de biossurfactantes, os quais foram extraídos do meio de cultivo e caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas.

O isolamento dos fungos endofíticos de caule e folha de *P. hispidum* se mostrou eficiente, obtendo-se 117 fungos de 125 fragmentos vegetais (78% de eficiência).

O óleo de soja se apresentou como uma fonte adequada para a produção de biossurfactantes pelos fungos endofíticos de *P. hispidum* e *M. guianensis*, sendo que 8 isolados de *P. hispidum* e 12 de *M. guianensis* apresentaram produção de biossurfactantes, identificados por meio dos testes de gota colapsada e índice de emulsificação.

O meio metabólico do fungo endofítico MgRe 1.3.3 apresentou a maior diminuição da tensão superficial, de 61 para 30  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , com uma redução de 37%, e após a extração do biossurfactante determinou-se uma CMC de 4,6  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Os rendimentos da etapa de extração dos tensoativos a partir dos meios metabólicos dos fungos MgC 3.3.3, MgRe 1.3.3, Ph III 23F e Ph II 22g foram satisfatórios, entre de 2,46 e 4,47 g/L.

Dos quatro isolados considerados promissores na produção de moléculas tensoativas, três foram identificados por técnicas de biologia molecular como as espécies *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* e *Glomerella cingulata*, amplamente reportadas como fitopatógenos e encontrados como endófitos, com grande potencial biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

- ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant- producing bacteria: product characterization and evaluation. **Acta Biotecnologica**, v. 4, p. 315-324, 1991.
- ALBERTO, R. N.; CASSAROTI, R.; ALMEIDA, T. T. J.; PAMPHILE, A. Identificação molecular de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum*. **VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica**. CESUMAR Maringá – Paraná – Brasil.; 2011. ISBN 978-85-8084-055-1.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ARAÚJO, M. M. S. **Estudo de vias biotecnológicas aplicadas à tecnologia de petróleo**. Monografia (Conclusão do Curso de Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2002.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002, 86p.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants**. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Eds.). *Fungi: multifaceted microbes*. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. **Biotechnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. **Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais**. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. *Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria*. Caxias do Sul: Educs, 2002. p. 269-294.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-64, 2000.
- BACH, H.; BERDICHEVSKY Y.; GUTNICK, D. An exocellular protein from the oildegrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier Emulsan. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69 n. 5, p. 2608-2615, 2003.
- BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. 388p.

- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potencial Commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BANHOS, E. F. **Atividade antimicrobiana de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) e de seus fungos endofíticos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 100 f. 2011.
- BANHOS, E. F.; SOUZA, A. Q. L.; ANDRADES, J. C.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 153-161, 2014.
- BARBOSA, S. B. S. **Prospecção de linhagens fúngicas produtoras de biossurfactantes**. Monografia (Graduação em Engenharia Química) Universidade do Estado do Amazonas. 2011. 64 p.
- BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. **Production of biosurfactant by *Bacillus Subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate**. J. Ind Microbiology Biotechnology v. 35; p. 1071-1078. 2008
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol. 2. Viçosa: Imprensa Universitária, 1984. 377 p.
- BARROSO, G. M.; PERÓN, V. **Myrtaceae** In: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Aspectos florísticos das espécies vasculares. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.1, p. 261-302, 1994.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 441-443, 2004.
- BEEBE, J. L.; UMBREIT, W. W. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**. v. 108, p. 612-614, 1971.
- BENUTO, B. C.; CORSINO, D. L. M.; FLORENTINO, G. B.; REZENDE, M. I. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes provenientes de solo e turfa contaminados com petróleo**. Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina, 2013.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-26. 2005.
- BEZERRA, M. S., **Estudos da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manípueira como fonte de carbono**. Tese (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2012, 125 p.

BODOUR, A. A; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n.1, p. 273-280, 1998.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 152, p. 41-52, 1999.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure Applied Chemistry**, v. 82, p. 97-116, 2010.

CAO, S. X.; YOU, J. L.; ZHOU, S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 169-171, 2002.

CARA, D. V. C. **Produção de biossurfactantes por *Flavobacterium* sp. a partir de óleo de soja de residual e fertilizante comercial**. Dissertação (Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. New York: Academic Press, 1997.

CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in destiled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CASTIGLIONI, G. L; BERTOLIN, T. E; COSTA, J. A. V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p.292-295, 2009.

CAVALCANTE, F. O. R.; SANTOS, J. C. L.; SOUZA, A. P. S.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES, E.; SANTOS, L. S. **Atividade alelopática da biomassa produzida pelo fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides***. 29<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP. 2006.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHAVES, G. La antracnosis. In: SCHUARTZ, H. F.; GALVEZ, G. E. (Ed.) **Problemas de producion de frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticos de *Phaseolus vulgaris***. Cali: CIAT, 1980. p. 37-53.

CIAPINA, E. M. P. **Produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do seu efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo**. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, v. 3, p. 145-149, 1986.

COSTA, L. A.; VELOSO, L. J. O.; SANTOS, J. O.; LIMA, T. M. S. **Influência de diferentes emulsificantes na produção de lipases por diferentes fungos filamentosos por fermentação submersa.** 64<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2012.

COSTA, S. G. V. A. O.; MILOT, F. L. S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 36, p. 1063-1072, 2009.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** Campinas, 2005. 87 p. Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES M. L. S. **Composição química dos óleos voláteis de *Myrcia rotundifolia* (Myrtaceae) em diferentes meses do ano.** 26<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; ROQUE, N. F. MARTINS, D. GUEDES, M. L. S.; MARQUES, E. J. **Componentes voláteis de quatro espécies do gênero *Myrcia* (Myrtaceae).** 25<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; ROQUE, N. F. MARTINS, D. GUEDES, M. L. S.; MARQUES, E. J. **Composição química dos óleos voláteis de *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae) em diferentes meses do ano.** XXVI Congresso Latinoamericano de Química, 2004.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** 2a. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**. v. 7, p. 641-646, 2004.

DESAI, J. D., BANAT, I. M., Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DIJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307-313, 2000.

DUBEY, K., JUWARKAR, A., Distillery and curd wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 61-69, 2001.

MAGNANI, M., FERNANDES, T.; PRETE, C. E. C.; HOMECHIM, M.; ONOI, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, v. 62, p. 45-49, 2005.

ELIZEI, V. G. **Avaliação da viabilidade de fungos encapsulados e armazenados em diferentes temperaturas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Lavras, 2009. 50p.

ESTRELA, J. L. V.; GUEDES, R. N. C.; MALTHA, C. R. A.; FAZOLIN, M. Toxicidade de amidas análogas a Piperina a larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepdoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 343-346, 2003.

FACUNDO, V. A; POLLI, A. R; RODRIGUES, R. V; MILITÃO, J. S. L. T; STABELLI, R. G; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v. 38, p. 743-748, 2008.

FATHABAD, E. G. Biosurfactants in pharmaceutical industry (a mini-review). **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, p. 58-69, 2010.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA; M. S.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC., *P. aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758(1). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.113-120, 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA; M. S.; ALÉCIO, M. R. Toxicidade do óleo de *P. aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 485-489, 2005.

FERREIRA, A. H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição, UNICAMP, Campinas-SP, 2006.

FERREIRA, J. P. M. Tensão superficial – sua natureza e efeitos. Boletim n° 93. **Sociedade Portuguesa de Química**, p. 43-48, 2004.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produces by microorganisms associated with plants. **Biologia Bratislava**. v. 62, p. 251-257, 2007.

FONTES JUNIOR, E. A.; SOUSA, P. J. C.; SOUSA, R. C.; MAIA, J. G. S.; SANTOS, A. M. S. **Atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Piper aduncum*** In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002, Salvador, 2002. 66p.

GAIA, J. M. D.; MOTA, M. G. C.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; COSTA, M. R.; MAIA, J. G. S. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p.686-689, 2004.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K.; Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**. v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

GRESSLER E. **Floração e frutificação de Myrtaceae de floresta atlântica: limitações ecológicas e filogenéticas**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, Brasil: 2005, 102 p.

GUIMARÃES, A. C. **Estudo químico e biológico de *Cladocolea micrantha*, uma planta medicinal da região amazônica**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005, 330f.

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2006, 236f.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HAMME, J. D. V.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects : Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 604-620, 2006.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p.1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. M. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 8. ed. Egham: CAB International, 1995.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Birkhäuser Verlag: Stuttgart, 1990. 100p.

HEWITT, P. G. **Física Conceitual**, 9a ed. Bookman, 2002.

HORA, S. L.; NAIR, K. K. Pollution of streams and conservation of fisheries. **Proceedings of the National Institute of Science of India**, n. 10, p 147-166, 1944.

JACOBUCCI, D. F. C. **Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, p. 21-32, 2011.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 4, p. 706-716, 2001.

JENSEN, S.; HANSEN, J.; BOLL, P. M. Lignans and neolignans from Piperaceae. **Hytochemistry**, v. 3, p. 523-530, 1993.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4603-4608, 2008.

KANNAHI, M.; SHERLEY, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas putida* and *Aspergillus niger* from oil contaminated site. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3 n. 4, p. 37-42, 2012.

KOSARIC N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology Biotechnology**, v. 39, p. 295-304, 2001.

KOSARIC, N., Biosurfactants in Industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.

KUSTER, R. M.; NETO, J. C.; SILVA, A. J. R.; AMORIM, M. B.; FELIX, C. F.; SANTOS, P. S.; SCOFANO, H. M. **Flavonóides inibidores de ATPases de *Myrcia uniflora* (Myrtaceae)**. 26<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, 2003.

LAGO, J. G. L.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, C. C. D.; MORANDIM, A. A.; BERGAMO, C. D.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. M. C.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p.1783-1788, 2004.

LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; YOUNGC, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 153-156, 2005.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil – an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508-536, 1997.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LIMA, C. J. B.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactante. **Ciência e Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 73-79, 2007.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, n. 27, p. 6, 2004.

LIN, S. C.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* IF-2. **Biotechnology Program**, v. 9, p.138-145. 1993.

LIN, S. C. Biosurfactants: Recent advances – review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

MAIA, J. G. S.; ZOHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N. Constituents of the essential oil of *P. aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 269-272, 1998.

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, 1:5, 2011.

MAKKAR, R. S.; ROCKNE, J. K. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2280-2292, 2003.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas – Myrtales**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004, 98f.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. **Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico**. In: MAIA, L. C.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. N. (Orgs.). *Micologia: avanços no conhecimento*. 1. ed. Recife: Editora Universitária da UEPE, 2007.

MESQUITA, J. M. O. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 6-12, 2005.

MIMEE, B.; LABBE', C.; PELLETIER, R.; BE'LANGER, R. R. Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 4, p. 1597-1599, 2005.

MONTEIRO, G. M.; LIRA, D. S.; MAIA, J. G. S.; BARROS, C. A. L.; SOUSA, P. J. C. **Acute and sub-acute toxicity of the essential oil of *P. aduncum*** In: Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, Águas de Lindóia, 2001.

MONTEIRO, S. A. **Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná- Curitiba, 2007.

MONTEIRO, A. S; BONFIM, M. R. Q; DOMINGUES, V. S.; CORREA JR, A.; SIQUEIRA, E. P; ZANI, C. L; SANTOS V. L. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5186-5193, 2010.

MORANDIM, A. A; BERGAMO, D. C. B; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *P. aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 282-286, 2005.

MOTA, M. G. C.; COSTA, C. C. C.; MAIA, J. G. S. **Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *P. aduncum* na Amazônia Brasileira**. In: Simpósio de Recursos Genéticos da América Latina e Caribe. Londrina, 2001. 89p.

MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Bodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods**. In: STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. J. Endofitic Fungi. Elsevier Academic Press, p. 241-270, 2004.

MUKHERJEE, S., DAS, P., SEN, R., Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MUKERJEE, P.; MYSELS, K. J. Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems, **National Bureau of Standards**. Washington-DC, 1971.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

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

NITSCHKE, M; COSTA, S. G; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 2066-2074, 2010.

OLIVEIRA, R. F. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Piper hispidum***. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010, 95p.

OLIVEIRA, R. L.; DUVOISIN JUNIOR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. Screening of *Piper hispidum* endophytic fungi that produce terpenes and antibacterial substances. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 4002-4012, 2014.

ORJALA, J.; WRIGHT, A. D.; BEHREND, H.; FOLKERS, G.; STICHER, O.; RUEGGER, H.; RALI, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*, **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 18-26, 1994.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796, 1992.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag. 1991, p. 179-197.

PIRÔLLO, M. P. S.; **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro. 2006. 73f.

PORNSUNTHORNTAWEE, O. WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M. RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1589-1595, 2008.

PROMMACHAN, O.; **Production and application of biosurfactant from *Bacillus MUV4***. Tese de Doutorado, Prince of Songkla University, Biotechnology, Índia. 2002. 107f.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Editora EDUNISC, Rio Grande do Sul, v. 2, p. 617-829, 2002.

RODRIGUES, C. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica**. Dissertação (Mestrado em processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. 107p.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.

ROSA, S. M.; SOUZA, L. A.; Estruturas de reprodução de *Piper amalago* var. *medium* Linnaeus (Piperaceae). **Acta Científica Venezuelana**, v. 55, p. 27-34, 2004.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 241-244, 2008.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; BARROS NETO, E. L. **Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo**. In. Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás Natural, v. 4, 9 p., Campinas, 2007.

SANTOS, I. P.; SILVA, A. P. S.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M.; CALCANTE, M. S.; LIMA, V. L. M. **Atividade antibacteriana do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* isolados da planta *Indigofera suffruticosa* Mill.** 62<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC. Natal-RN, 2010.

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Lorena, 2005. 63p

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**. v. 109, p.661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**. v. 106, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A-K.; DAMMANN, U.; AUST, H-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. **Mycological Research**, v. 10, p.1275-1283, 1999.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, B. A.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 578-582, 2007.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, p.123-133, 2008.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p.43-145, 2007.

SILVA, I. L. S. S.; RESENDE, M. L. V.; JUNIOR, P. M. R.; COSTA, J. C. B.; CAMILO, R. F.; BAPTISTA, J. C.; SALGADO, S. M. L. Efeito de nutrientes combinados com indutores de resistência na proteção contra a vassoura-de-bruxa no cacauero, **Ciência Agrotécnica**, v. 32, p.61-67, 2008.

SILVA, M. S **Fungos endofíticos: fontes promissoras de novas substâncias com atividades antioxidante e antiviral**. Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SINGH, A.; VANHAME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2009.

SLIVINSKI, C. T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2007. 70p.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, S. A.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PERREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica** v. 34, p. 185-195. 2004.

SOUZA, M. C. M. BENEDICTO, S. C. L. ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. **Uso de células imobilizadas para produção de biosurfactantes utilizando como substrato suco de caju**. Rio Oil & Gas Expo and Conference, 2006.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v. 52, p. 353- 360, 1995.

STONE, J. K., BACON, C. W.; WHITE, J. F. **An overview of endophytic microbes: endophytism defined**. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Eds.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker. p. 3-30, 2000.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U. The biological promise of microbial endophytes and natural products. **Plant Pathology Journal**. v. 4, p.161-176, 2005.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p. 448. 2001.

TEIXEIRA NETO, E.; MALTA, M. M.; SANTOS, R. G. Medidas de tensão superficial pelo método de contagens de gotas: descritas do método e experimentos com tensoativos não-iônicos etoxilados. **Química Nova**, v. 32, p. 223-227, 2009.

THIES, W.; KALKO, E. K. V. Phenology of neotropical pepper plants (Piperaceae) and their association with their main dispersers, two shorttailed fruit bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea* (Phyllostomidae). **Oikos**, v. 104, p. 326-376, 2004.

TUGRUL, T.; CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 851-853, 2005.

TURKOVSKAYA, O. V.; DMITRIEVA, T.; MURATOVA, A. Y. A Biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n.1, p.71-75, 1999.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da produção de biosurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila***. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas/SP, 2004, 99f.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v. 57, p. 1139-1150, 2004.

VAN HAESSENDONCK, I. P. H.; VANZEVEREN, E. C. A. Rhamnolipids in bakery products. W. O. 2004/040984, **International Application Patent (PCT)**, 2004.

VIEIRA, M. L. A. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* vell. (Solanaceae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008, 117p.

WADT, L. H.; DE, O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P.Y. Genetic diversity of “Pimenta Longa” genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p.74-82, 2004.

YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H.; NISHIDA, N. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC.(2): Structures of Myrciacitrins III, IV, V. **Chemical Pharmacology Bulletin**, v. 50, p. 429-431, 2002.

YOUSSEF, N. H.; DUCAN, K. E.; D. P.; SARVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCIRNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiology Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZANA, R. Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases. **Surfactant Science Series**, v. 125. P. 539, New York: CRC Press, 2005.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3276-3282, 1992.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1266-1271, 2007.

## ANEXOS

**Anexo 1** - Massa de uma gota de água que se desprende de tubos de diferentes diâmetros.

massa da gota (g)	Raio do tubo (cm)	massa da gota (g)	Raio do tubo (cm)
0.033450	0.09946	0.90467	0.31891
0.042347	0.13062	0.091620	0.32362
0.046901	0.14769	0.096392	0.34188
0.054678	0.17750	0.096918	0.34385
0.059700	0.19666	0.09868	0.35022
0.068026	0.23052	0.10623	0.37961
0.069869	0.23790	0.10966	0.39262
0.072682	0.23135	0.11161	0.39968
0.007753	0.26802	0.11957	0.42765
0.079680	0.27605	0.12522	0.44755
0.084270	0.29423	0.12575	0.44980
0.084880	0.29694	0.14142	0.50087

**Anexo 2** - Fator de correção para o método da gota.

$r/V^{1/3}$	f	$r/V^{1/3}$	f	$r/V^{1/3}$	f <sub>a</sub>
0.00	(1.0000)	0.75	0.6032	1.225	0.656
0.30	0.7256	0.80	0.6000	1.25	0.652
0.35	0.7011	0.85	0.5992	1.30	0.640
0.40	0.6828	0.90	0.5998	1.35	0.623
0.45	0.6669	0.95	0.6034	1.40	0.603
0.50	0.6515	1.00	0.6098	1.45	0.583
0.55	0.6362	1.05	0.6179	1.50	0.567
0.60	0.6250	1.10	0.6280	1.55	0.551
0.65	0.6171	1.15	0.6407	1.60	0.535
0.70	0.6093	1.20	0.6535		