

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS
ISOLADOS DO SOLO AMAZÔNICO

HELLEN HOLANDA SENA

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HELLEN HOLANDA SENA

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS ISOLADOS DO SOLO
AMAZÔNICO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal do Amazonas como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS
2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

H722p	Holanda Sena, Hellen Produção de biossurfactantes por fungos isolados do solo amazônico / Hellen Holanda Sena. 14 67 f.: il.; 30 cm. Orientador: João Vicente Braga de Souza Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas. 1. biossurfactantes. 2. solo. 3. fungos. 4. Emulsão. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	---

HELLEN HOLANDA SENA

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS ISOLADOS DO
SOLO AMAZÔNICO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal do Amazonas como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Prof. Dr. Ormezinda Fernandes

FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Karen Regina Carim da Costa Magalhães

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

AGRADECIMENTOS

Agradecida sou em primeiro lugar a Deus, nosso Criador, que me permitiu chegar ao fim de mais esta etapa acadêmica. Deu-me saúde e todas as ferramentas necessárias para concluir meu objetivo.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram a chegar até aqui. Acreditaram que seria possível, apesar dos obstáculos que surgiram ao longo desses dois anos.

Ao maior presente que recebi enquanto estava cursando a pós-graduação. Sophia, você foi minha maior incentivadora, Agradeço-te por encontrar em você a vontade de ir muito além, especialmente quando o cansaço surgia.

Ao meu Orientador, João Vicente, que me mostrou que ser pesquisador vai muito além da pesquisa. Humildade, companheirismo e a busca por nossa auto-análise fizeram a diferença, marcou-me positivamente e permitiu uma convivência harmoniosa.

Aos colegas de laboratório, Jessyca Celestino, Ana Karla Freire, Amaury Jr, Diego Fernando; aos Técnicos do Laboratório Dona Lili e Seu Rosalvo. Todos que contribuíram de alguma forma, com pensamentos positivos, agradecida sou a todos vocês que me fizeram chegar até aqui.

RESUMO

Os surfactantes são muito demandados pelas indústrias farmacêutica, alimentos e de petróleo. Os surfactantes sintéticos, que são convencionalmente utilizados, apresentam problemas relacionados a sua toxicidade e recalcitrância. Isso aumenta o interesse nos surfactantes de origem natural produzidos por microorganismos (biosurfactantes). Poucos trabalhos foram realizados investigando a produção dessas substâncias por fungos isolados da Região Amazônica. Diante dessa situação, o presente trabalho investigou a produção de biosurfactantes por fungos isolados de solo da floresta amazônica. Foi realizado o isolamento de microorganismos de amostras de solo do Bosque do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo método de diluições sucessivas. A identificação dos isolados foi realizada investigando-se as características micromorfológicas das colônias (técnica de microcultivo). Para seleção dos isolados produtores de biosurfactantes, os mesmos foram cultivados em bioprocessos submersos e os filtrados das culturas foram submetidos à investigação pelas técnicas de colapso da gota e índice de emulsificação. O isolado selecionado foi submetido à otimização da produção do biosurfactante por meio de um delineamento fatorial 2^4 a fim de avaliar a influência da concentração das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, bem como, pH e tempo de tratamento das amostras. Por fim, o biosurfactante produzido pelo isolado selecionado foi semi-purificado e submetido a ensaios de estabilidade térmica e iônica. A partir dos métodos desenvolvidos, foi possível isolar 100 amostras fúngicas, das quais, 9 apresentaram bom índice de emulsificação ($E_{24} > 40$) e *Penicillium 8CC2* foi considerado o melhor produtor de biosurfactante. A investigação da influência dos fatores do bioprocessos mostraram que a melhor condição para obtenção de biosurfactante foi utilizando óleo de soja (20 g/L), extrato de levedura (30g/L), pH 6,0 por 9 dias. A avaliação da estabilidade térmica (100°C por 60 min) e iônica (NaCl 30%) demonstrou que nenhum dos dois fatores desestabilizaram o emulsificado produzido. As principais contribuições aqui alcançadas no presente trabalho foram o isolamento da linhagem produtora biosurfactante de *Penicillium 8CC2* e a definição preliminar dos parâmetros de bioprocessos.

Palavra-chave: Solo amazônico, Biosurfactantes, Fungos, otimização.

ABSTRACT

Surfactants play an important role in pharmaceutical, food and oil industries. Synthetic surfactants have been presenting problems related to their toxicity and recalcitrance. This situation increases the interest on natural surfactants produced by microorganisms (biosurfactants). Just a few studies were conducted investigating the production of these substances by fungi isolated from the Amazon region. The aim of this study was investigate the production of biosurfactants by fungi isolated from soil in the Amazon forest. The isolation of micro-organisms of the soil samples was performed by the method of successive dilutions. The identification of the isolates was performed by investigating the micromorphological characteristics (microculture technique). For selection of biosurfactants producers, the strains were submitted submerged bioprocess and the filtrated from the cultures were subjected to investigation by techniques “collapse of the drop” and “emulsification index”. The selected isolate was subjected to optimize the production of the biosurfactant by a factorial design 2^4 evaluating the influence of the concentration of carbon and nitrogen sources, pH and bioprocess time. Finally, the biosurfactant produced by the selected strain was semi-purified and tested for stability (thermal and ionic). It was isolated 100 fungal strains, 9 of them showed good emulsification index ($E_{24} > 40$) and *Penicillium* 8CC2 was screened as the best biosurfactant producer. The investigation of the influence of the bioprocess factors showed that the best condition for obtaining the biosurfactant was by using soybean oil (20 g/L), yeast extract (30 g/L) pH 6.0 and 9 days. The evaluation of thermal (100 ° C for 60 min) and ionic (30% NaCl) stability showed that none of the two factors destabilized emulsified produced. The main contributions that were achieved in the present work was the isolation of biosurfactant producer *Penicillium* 8CC2 and a preliminary definition of bioprocess parameters.

Keyword: Amazon Solo, Biosurfactants, Fungi, optimization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos	30
Tabela 2 Níveis utilizados para concentração de glicose, biomassa, pH e tempo no planejamento experimental 2^4 com arranjo tipo estrela.	36
Tabela 3- Identidade dos isolados provenientes da mata preservada na cidade de Manaus, teste do colapso da gota e teste do índice de emulsificação do tolueno (E_{24}).	46
Tabela 4- Influência de óleo de soja, extrato levedura, pH e Tempo na produção de biossurfactantes por <i>Penicillium</i> 8CC2 em experimentos realizados de acordo com o planejamento fatorial 2^4 .	48
Tabela 5- Efeito das variáveis testadas para produção de biossurfactantes por <i>Penicillium sp</i> 8CC2	49
Tabela 6- Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para produção de biossurfactantes por <i>Penicillium</i> 8CC2	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** influência das diferentes fontes de carbono no índice de emulsificação do tolueno utilizando o filtrado livre de células do *Penicillium* 8CC2. 47
- Figura 2-** influência das diferentes fontes de nitrogênio no índice de emulsificação do tolueno utilizando o filtrado livre de células do *Penicillium* 8CC2. 47
- Figura 3-** Superfície de resposta da produção de biossurfactante pelo *Penicillium sp.* 8CC2 em função do óleo de soja, extrato de levedura, pH e do tempo de produção. 51
- Figura 4-** Comparação da atividade de emulsificação do *Penicillium sp.* 8CC2 com o surfactante químico tween 80 (0,2%) após aquecimento a 100°C por 60 min. 52
- Figura 5-** Comparação da atividade de emulsificação do *Penicillium* 8CC2 com o surfactante químico tween 80 (0,2%) após aquecimento a 100°C por 60 min. 52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Potencial biotecnológico de fungos isolados do solo amazônico	14
2.2 Biossurfactantes e fungos produtores de biossurfactantes	16
2.2.1 Biossurfactantes	16
2.2.1.1 Aplicação ambiental	17
2.2.1.2 Aplicação industrial.....	18
2.2.1.3 Agentes terapêuticos	19
2.2.1.4 Usos em Cosméticos	20
2.2.1.5 Usos na agricultura	20
2.2.2 Produção de surfactantes por fungos	21
2.3 Fatores que influenciam os bioprocessos com finalidade de produção de biossurfactantes	24
2.4 Características químicas dos biossurfactantes produzidos por fungos.....	25
3 OBJETIVOS.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Modelo de estudo	30
4.2 Universo de estudo	30
4.2.1 Local de estudo	30
4.2.2 Amostra de solo	30
4.3 Procedimentos.....	30
4.3.1 Isolamento e identificação de fungos de amostras de solo da floresta Amazônica.....	30
4.3.2 Seleção de fungos produtores de biossurfactantes	31
4.3.2.1 Bioprocessos em meio líquido	31
4.3.2.2 Teste do colapso da gota.....	31
4.3.2.3 Teste do índice de emulsificação (E_{24}).....	32

4.3.3 Otimização da produção do biossurfactante pelo isolado selecionado e cinética do bioprocesso	32
4.3.3.1 Fonte de carbono e nitrogênio	32
4.3.3.2 Concentração de fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH e tempo de tratamento	32
4.3.4 Isolamento do biossurfactante e estudo de estabilidade	33
RESUMO	34
1.Introdução.....	35
2 Materiais e métodos	36
<i>2.1 Isolamento, seleção e identificação do fungo produtor de biossurfactante.</i>	<i>36</i>
<i>2.2 Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes</i>	<i>37</i>
<i>2.3 Efeito da concentração da fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH e tempo de tratamento.</i>	<i>38</i>
<i>2.4 Isolamento do biossurfactante e estudo de estabilidade</i> Erro! Indicador não definido.	
3. Resultados	38
<i>3.1 Isolamento e identificação de fungos de amostras de solo da floresta Amazônica.....</i>	<i>39</i>
<i>3.2 Seleção de fungos produtores de biossurfactantes</i>	<i>39</i>
<i>3.3 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes.</i>	<i>42</i>
<i>3.4 Influência do óleo de soja, extrato de levedura, pH e tempo na produção de biossurfactantes.</i>	<i>43</i>
<i>3.5 Estudos de estabilidade.....</i>	<i>47</i>

Discussão	48
Referências	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

Reino Fungi contém um grupo diversificado de organismos. Os caracteres comuns entre todos os fungos verdadeiros são a presença de quitina na parede celular. Têm se adaptado a diversos nichos ecológicos que permitiram a estes organismos para prosperar em quase todos os habitats do planeta (TOOME, 2011). A morfologia dos fungos pode ir de formas pluricelulares, os fungos filamentosos, a tipos unicelulares, as chamadas leveduras (BOTHÁ, 2011).

Os fungos podem contribuir substancialmente para a biomassa microbiana do solo, bem como para a diversidade genética entre os micro-organismos do solo (BOTHÁ, 2011). Em geral, os fungos desempenham um papel importante nos ciclos do carbono e nitrogênio dos solos (BATES & GARCIA- PICHEL, 2009). Muitos fungos do solo são conhecidos por solubilizarem fosfatos inorgânicos (PRADLAN & SUKLA, 2005).

A floresta amazônica possui grande potencial de produção de substâncias úteis a partir de fungos isolados dela. Apesar de sua grande biodiversidade, as espécies que compõem esse bioma são pouco conhecidas. Por conta disso, se destacam como um vasto campo a ser explorado na busca de micro-organismos que possam ser usados nos processos biotecnológicos (THIEME et al, 2007).

Os biossurfactantes são um grupo heterogêneo de moléculas tensoativas produzidas por micro-organismos. Essas moléculas também reduzem a tensão superficial, concentração micelar crítica e tensão interfacial tanto em soluções aquosas quanto de misturas de hidrocarbonetos (BANAT, et al 2010). São anfifílicos formados por duas partes: uma porção polar hidrofílica e um grupo apolar (hidrofóbico). (BANAT et al, 2010; PACWA-PLOCINICZAC et al, 2011). São úteis para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Diversos micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras produzem surfactantes que atuam como detergentes, emulsificantes entre outras funções (HABA, 2000; RODRIGUES, 2011), porém há trabalhos mais frequentes utilizando

bactérias e leveduras quando em comparação aos fungos filamentosos (LUNA, 2007). Entre as espécies de leveduras, *Candida* spp. e *Yarrowia* spp. têm se destacado na produção desses compostos (AMARAL, 2007).

O tipo, a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por um micro-organismo são influenciados por fatores como: a natureza da fonte de carbono, as concentrações de nutrientes como nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, enxofre e manganês no meio e as condições de crescimento tais como pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível (BANAT, 1995; FONTES, 2008; GEORGIU et al., 1992; PIRROLO, 2006). O que dificulta sua utilização são os custos com a produção quando comparados com os tensoativos sintéticos (THAVASI et al, 2007).

A composição dos biossurfactantes é bastante variável e por isso são classificados de acordo com sua composição química e sua origem microbiana, apresentando diferentes estruturas químicas principalmente aqueles produzidos na presença de hidrocarbonetos (LANG & WULLBRANDT, 1999; PACWA-PLOCINICZAC et al, 2011). Pertencem a sete grupos distintos: glicopeptídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos ou lipídios neutros, surfactantes poliméricos e os surfactantes particulados (ROSEMBERG & RON, 1999).

A enorme procura por surfactantes encontrou atualmente inúmeros surfactantes sintéticos. Esses compostos são usualmente tóxicos ao meio ambiente e não são biodegradáveis (PANATHU et al, 2008). Portanto, há uma grande necessidade em buscar compostos surfactantes, a partir de metabólitos utilizando em especial os fungos, produzidos sem agressão ao ecossistema, como alternativa aos tensoativos químicos, e que tenha uma boa estabilidade. Além disso, há um especial interesse na otimização do processo de produção desses compostos com o objetivo de diminuir os custos na produção em larga escala, o que ainda hoje é um grande desafio biotecnológico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Potencial biotecnológico de fungos isolados do solo amazônico

Os fungos têm registros fósseis presumíveis no período Pré-Cambriano, mas com registros mais evidentes a partir do período Siluriano, entre 438 e 408 Milhões de anos. Pertencem a um diverso grupo de organismos e estão classificados no filo *Eumycota*. São eucariotos, heterotróficos e dependem da disponibilidade de nutrientes ricos em energia (MORE, 2010).

Os fungos possuem glicogênio como substância de reserva, e sua parede são na maior parte constituída de quitina (SCHAECHTER et al., 2010). Adquirem as fontes de carbono para a síntese celular a partir da matéria orgânica ou nutrindo-se como parasitas de hospedeiros vivos. Em sua maioria são de vida livre, e podem ser classificados em grupos, tais como fungos filamentosos, leveduras e cogumelos (HANGESKAL, 2009).

Fungos crescem em quase todos os habitats da Terra, superado apenas por bactérias na sua capacidade de resistir a condições extremas de temperatura, atividade de água, e uma fonte de carbono. Regiões tropicais, a exemplo do Brasil, são consideradas as que contêm a maior diversidade desses micro-organismos (BLAKWELL, 2011).

No solo os fungos apresentam uma grande diversidade. Há no solo representante de todos os grandes grupos de fungos, ocorrendo numa densidade populacional entre 10^4 a 10^6 fungos/grama de solo. Alguns gêneros são mais comuns que outros. Os gêneros mais frequentemente isolados do solo são: *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, e *Aspergillus*, seguidos por *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Fusarium* *Cephalosporium* e *Verticillium*. Muitos fungos do solo são conhecidos por solubilizarem fosfatos inorgânicos, e desempenham um papel importante na complementação de fósforo para as plantas (PRADLAN & SUKLA, 2005).

Espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e de leveduras têm sido amplamente relatadas como agentes na solubilização de fosfatos inorgânicos (PRADLAN & SUKLA, 2005). São importantes nos ciclos biogeoquímicos, como agentes de controle biológico e como produtores de químicos para as indústrias farmacêuticas e

outras. Essa diversidade é mais elevada próximo ao material orgânico, como as raízes e seus exsudatos. O grande número de fungos microscópicos pertence em grande parte aos *Ascomycetos* assexuados e alguns *Zigomicetos* (GAMA, 2006; SCHIMIT & MULLER, 2006).

A floresta amazônica possui grande potencial de produção de substâncias úteis a partir de fungos isolados dela. Algumas espécies fúngicas tornam-se essenciais, pois contribuem com a saúde e nutrição das plantas. Espécies como cepas de *Trichoderma harzianum*, por exemplo, são capazes de produzir enzimas tais como celulases capazes de converter materiais compostos de celulose em biocombustíveis (DELABONA, 2012).

Basidiomicetos isolados de Coari, município do Amazonas, foram capazes de produzir proteases, amilases, pectinases e fenoloxidasas (SOUZA, 2008). Delabona (2012) demonstrou a produção de xilanase por *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* para a produção de etanol celulósico utilizando como substrato resíduos agrícolas. *Actinomycetos* isolados da floresta produziram substância com capacidade de inibir o crescimento de outros fungos e bactérias como *Candida albicans* e *Escherichia coli* (BASCOM-SLACK, 2009).

Espécies do gênero *Trichoderma* tiveram atividade antibacteriana frente *E. coli*, e inibiram o crescimento de *Aspergillus flavus*, enquanto o gênero *Aspergillus* apresentou atividade antibiótica para as linhagens-teste de *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SOUZA, 2004).

Fungos da espécie *Pestalotiopsis guepinii* mostraram potencial herbicida para diversificar o controle de pragas na agricultura e prática agrícola (OLIVEIRA et al, 2008). Espécies de *Penicilium* e *Aspergillus* tem grande potencial na produção de pigmentos como demonstrado por Teixeira et al. (2012). Espécies de *Candida* foram capazes de produzir etanol a partir da fermentação de D-xilose (CADETE, 2012).

Compostos com capacidade tensoativa são produzidos por diversos micro-organismos, entre eles os fungos. Esses compostos são um grupo de moléculas estruturalmente diversas, com classificação bem definida (BANAT et al, 2010).

2.2 Biossurfactantes e fungos produtores de biossurfactantes

2.2.1 Biossurfactantes

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento com a preocupação ambiental entre os consumidores, combinado a novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os Biossurfactantes são um grupo estruturalmente diverso de substâncias tensoativas produzidos por micro-organismos. Todos são anfifílicos formados por duas partes: uma metade hidrofílica e um grupo apolar (hidrofóbico). O grupo hidrofílico consiste em mono, oligo ou polissacarídeos; peptídeos ou proteínas. A outra metade hidrofóbica geralmente contém uma cadeia de hidrocarbonetos saturados, insaturados ou ácido graxo (BANAT et al, 2010; PACWA-PLOCINICZAC et al, 2001). Essa estrutura anfifílica confere uma ampla gama de propriedades incluindo a capacidade de diminuir a tensão superficial de líquidos formando micelas e microemulsões entre diferentes fases (DAS, 2008).

Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Em comparação com os tensoativos químicos, os biossurfactantes são menos agressivos ao meio ambiente, biodegradáveis, menos tóxicos e perigosos (DAS, 2008). Possuem a capacidade de serem ativos em extremas condições de temperaturas, pH e salinidade, assim como podem ser produzidos a partir de resíduos industriais e de subprodutos. Esta última característica torna sua produção mais barata (DAS et al, 2008; KOSARIC, 1992).

A utilidade dos biossurfactantes tem sido pesquisada e publicada. Estão envolvidos na melhoria do meio ambiente, na indústria de alimentos, de cosméticos, farmacêutica e na agricultura. (PANATHU et al, 2008).

2.2.1.1 Aplicação ambiental

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais (BANAT, 1995). Os principais mecanismos naturais de remoção de hidrocarbonetos de ambientes contaminados são a fotoxidação, evaporação e degradação microbiana, os quais podem levar anos para estabilizar o local contaminado (BOGNOLO, 1999).

Métodos físicos comumente utilizados, como a remoção mecânica e extração com solventes, geralmente não recuperam mais do que 10-15% do óleo derramado. Logo, a biorremediação é uma tecnologia emergente promissora para o tratamento de solos e águas contaminados com hidrocarbonetos (PINTO et al, 2008).

A aplicação de biossurfactantes na remediação de tais compostos orgânicos tem como objetivo aumentar a sua biodisponibilidade ou mobilização e a remoção dos contaminantes por pseudosolubilização e emulsificação num tratamento de lavagem (BANAT et al, 2010; TIEHM, 1994).

Pesquisas compararam misturas de biossurfactantes com surfactantes sintéticos. A adição de ramnolipídios aos surfactantes sintéticos reduziu a tensão interfacial, permitindo a mobilização dos hidrocarbonetos. Isto significa que eles podem ser utilizados para fins de remediação. Esta mistura pode aumentar a viabilidade econômica do sistema (MULLIGAN, 2009; NGUYAN et al. 2008)

A aplicação de biossurfactantes na remediação de compostos inorgânicos tais como metais pesados, por outro lado, se destina a quelar e remover tais íons durante a etapa de lavagem facilitada pelas interações químicas entre as moléculas anfifílicas e os íons metálicos (BANAT et al, 2010; TIEHM, 1994).

Estudos também são realizados para avaliar a possibilidade de remoção de metal por biossurfactantes devido a suas características aniônicas (MULLIGAN, 2009). Juwarkar e colaboradores (2002) investigaram a remoção de cádmio e chumbo por um biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. A remoção de cádmio foi maior do que a de Chumbo. Mais de 92% de Cd e 88% de Pb foi removido pelo ramnolipídio dentro de 36 horas.

2.2.1.2 Aplicação industrial

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.

A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. 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 et al, 1991; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Biossurfactantes são úteis na recuperação melhorada do petróleo (MEOR). A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os micro-organismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (NITSCHKE & PASTORE, 2002; SEN, 2008).

Yin et al. (2009) avaliaram as características de um biotensioativo de ramnolipídio produzido por um isolado de *P. aeruginosa* de efluente contaminado com petróleo. A solubilidade do fenantreno aumentou 23 vezes na presença desse biossurfactante. A estabilidade sob uma gama de pH e salinidade foi boa.

Devido às suas propriedades físico-químicas, a utilização de compostos tensoativos microbianos também tem sido proposta para outras aplicações industriais, como aditivos em alimentos, cosméticos e formulações de detergentes (BANAT et al, 2010; NITSCHKE & COSTA, 2007).

Na indústria alimentícia, a propriedade mais útil é a capacidade de formar emulsões estáveis, o que melhora a textura e cremosidade dos produtos lácteos. Biossurfactantes também são utilizados para solubilizar óleos aromatizantes e melhorar as propriedades organolépticas em formulações de sorvetes além de estabilizantes de gordura durante seu cozimento (BANAT et al, 2010; NITSCHKE & COSTA, 2007).

Um bioemulsificante obtido da *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos de saladas (MAKKAR et al, 2002). As propriedades molhante, dispersante e de redução de tensão superficial, bem como uma baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, sugeriram a aplicação de biossurfactantes, especialmente glicolipídios, como componentes de formulações de detergentes (HIRATA et al, 2009).

2.2.1.3 Agentes terapêuticos

Alguns biossurfactantes estão sendo descritos devido ao seu potencial em ser biologicamente ativo e ter aplicabilidade no campo médico (RODRIGUES et al, 2006). Agentes antimicrobianos eficazes e seguros podem ser bastante promissores, e sua procura está cada vez maior principalmente pela grande resistência dos micro-organismos patogênicos aos produtos antimicrobianos disponíveis no mercado. Entre eles pode-se citar os lipopeptídios, que também possuem atividade antifúngica (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004; SINGH & CAMEOTRA, 2004; RODRIGUES et al, 2006).

É importante mencionar que a atividade antifúngica dos biossurfactantes vem sendo descrita há muito tempo, não, porém, para fungos patogênicos humanos (ABALOS et al, 2001; BANAT et al, 2010).

Outra propriedade descrita é a capacidade de inibir a adesão de organismos patogênicos em superfícies sólidas ou em sítios de infecção. Assim, a prévia adesão dos biossurfactantes em superfícies sólidas pode constituir um novo meio de combater a colonização desses micro-organismos (RODRIGUES et al, 2006).

Pré-revestimento de cateteres uretrais, utilizando uma solução contendo surfactina antes da sua introdução resultou em um decréscimo na quantidade de biofilme formado por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (MIRELES et al, 2001). Mittenbuhler e colaboradores (1997) mostraram que lipopeptídios bacterianos constituem potentes adjuvantes imunológicos não-tóxicos e não-pirogênicos quando misturado com antígenos convencionais.

Glicolipídios possuem ações exclusivas em células de mamíferos em adição além de atividades antimicrobianas. Mostram excelente inibição de crescimento e diferenciação contra células de leucemia de células humanas, tais como a célula leucêmica mielogênica e a célula leucêmica promielocítica. Também foi descrita a

capacidade de inibição do crescimento de células de ratos com melanoma com a utilização destes compostos (KITAMOTO et al, 2002; 2009).

2.1.1.4 Usos em Cosméticos

Os agentes tensoativos são utilizados em cosméticos e têm efeitos de detergência, molhante, emulsionantes, solubilizantes, dispersantes e de formação de espuma. Os mais amplamente utilizados em cosméticos e produtos de cuidados pessoais são glicolipídios por causa de suas propriedades físico-químicas, atividades biológicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade, e são utilizados como ingredientes multifuncionais na formulação de cosméticos (LORITH & KANLAYAVATTANAKUL, 2009).

Potenciais biossurfactantes glicolipídicos empregados na indústria de cosméticos são soforolipídios e ramnolipídios (LANG & WULBRANDT, 1999). Glicolipídios podem ser usados em variedade de cosméticos que podem ser produzidos. Estes incluem: repelentes, soluções para lentes de contato, desodorantes, xampus, tinturas de cabelo, entre outros (GHARAREI-FATHABAD, 2010; MAIER & SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Dentre os lipopeptídios, a surfactina parece ser a mais eficaz em termos de propriedades de equilíbrio interfaciais, e tem excelentes propriedades de formação de espuma em comparação com o dodecil sulfato de sódio e a albumina de soro bovino (KANLAYAVATTANAKUL & LORITH, 2010). A principal aplicação para lipopeptídios tem sido em cosméticos anti-rugas e produtos de limpeza (KANLAYAVATTANAKUL & LORITH, 2010; MONTANARI & GUGLIELMO, 2008). Cosméticos, hidratantes e produtos de limpeza de pele foram preparados em gel oleoso com alta estabilidade (KANLAYAVATTANAKUL & LORITH, 2009; YONEDA & FURUYA, 2003).

2.1.1.5 Usos na agricultura

Os surfactantes também são requeridos para a agricultura. Trabalhos evidenciam as vantagens dos surfactantes verdes (biossurfactante derivado de microorganismos) em relação ao surfactante sintético (SACHDEV & CAMEOTRA, 2013).

Os surfactantes sintéticos presentemente utilizados em indústrias pesticidas atuam como emulsionantes, dispersantes, agente molhante e aumentam a eficácia de pesticidas. No entanto, é importante notar que o agente tensoativo presente em

formulações pesticidas torna-se acumulado no solo e afeta a cor, textura e crescimento da planta. Estes pesticidas nocivos também podem ser lixiviados do solo para a água subterrânea. Considerando-se o efeito adverso de pesticidas e surfactantes associados aos pesticidas, há necessidade de usar os biossurfactantes ambientalmente seguros para substituir estes tensoativos e, assim, diminuir poluições (BLACKWELL, 2000; PETROVIC & BARCELO, 2004; ROSTÁS & BLASSMAN, 2009).

Os biossurfactantes são especialmente usados em formulações de fungicidas herbicidas e pesticidas (ROSENBERG & RON, 1999; ROSTÁS & BLASSMAN, 2009). Uma revisão de Deleu e Paquot (2004) mostrou no ano de 2004 que aproximadamente 0,2 milhões de toneladas de surfactantes são utilizados em proteção de cultivos e formulações de agrotóxicos.

Os compostos ativos de pesticidas e herbicidas são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Um exemplo é o uso do biossurfactante produzido por *Bacillus* spp. para emulsificar pesticidas organofosforados imiscíveis. (PINTO et al, 2008; ROSENBERG & RON, 1999).

Também podem ser amplamente explorados para aumentar a biodegradação de poluentes melhorando a qualidade do solo agrícola e para a promoção do crescimento indireto de plantas pela capacidade desses biossurfactantes possuírem atividade anti-microbiana (SACHDEV & CAMEOTRA, 2013; SCOTT & JONES, 2000; TAKENAKA et al, 2007).

Biossurfactantes podem ser combinados com o fungo *Myrothecium verrucaria* para erradicar espécies de ervas daninhas que afetam a produtividade da terra e inibir a produção de aflatoxinas por *Aspergillus* sp em culturas de algodão, amendoim e milho (BOYETTE, et al, 2002).

2.2.2 Produção de surfactantes por fungos

A produção de biossurfactantes por micro-organismos é bem estudada e publicada em trabalhos utilizando bactérias, sendo menos frequente as referências com relação ao emprego dos fungos filamentosos (LUNA-VELASCO et al, 2007). Cepas de *Cladosporium resinae* conseguem produzir biossurfactantes quando crescem em fontes tais como óleo diesel, parafina e hexadecano. Essa produção foi

observada através da diminuição da tensão superficial da fase aquosa, e pelo aumento na propriedade de emulsão (MURIEL et al, 1996).

Cepas de *Penicillium citrinum* produziram um glicolípido com propriedade emulsificante durante seu cultivo em meio mineral com 1% de óleo de oliva como fonte mineral. A melhor atividade emulsificante foi observada para xileno e óleo diesel quando comparados com outros hidrocarbonetos testados (CAMARGO DE MORAIS et al, 2003).

Luna-Velasco (2007) descreveu a produção e as propriedades dos biossurfactantes sintetizados por *Penicillium sp* crescido em meio suplementado com fenantreno. *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium sp* isolados de um local contaminado por hidrocarbonetos produziram biossurfactantes utilizando óleo de soja e óleo diesel como fonte de carbono através de fermentação em estado sólido (MARTINS et al, 2008).

Castiglioni e colaboradores (2009) também estudaram a produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido utilizando biorreatores e substratos baseados em resíduos agroindustriais. Foi verificado que a presença de óleo diesel e óleo de soja como fonte de carbono aumentou a atividade emulsificante do biossurfactante produzido.

Há situações em que há a produção de moléculas com capacidade biossurfactantes em processos biotecnológico, mesmo sem esse objetivo, exemplo do que ocorreu no estudo de Paraszkieicz et. al. (2002). Neste trabalho, a conversão de esteróide pelo fungo *Curvularia lunata*, produziu uma molécula com capacidade de estabilizar emulsões. Este composto apresentou grande capacidade de emulsificação em querosene, óleo vegetal e minerais.

Prata e colaboradores (2008) aperfeiçoaram a produção de tensoativos por *Penicillium coryophilum* utilizando óleo mineral. O fungo produziu tensoativo com tensão superficial e índice de emulsificação que indicaria ser de baixo peso molecular.

Fungos da espécie *Aspergillus endosymbiotic ustus* (MSF3) isolados da esponja *Fasciospongia cavernosa* (MSF3) tiveram sua produção de biossurfactante

quando cultivada em caldo Sabouraud Dextrose. Este biossurfactante foi caracterizado como uma glicoproteína e apresentou largo espectro de atividade antimicrobiana. Além disso, essa cepa mostrou boa atividade para ser usada na recuperação melhorada do Petróleo (MEOR) (KIRAN et al, 2009).

As leveduras também são estudadas quanto à produção de biossurfactantes. Entre elas, *Candida* sp e *Yarrowia* sp têm sido estudadas e empregas com sucesso na produção de biossurfactantes. Uma grande vantagem dessas leveduras reside no fato de que elas são consideradas seguras para utilização na indústria de alimentos e farmacêutica, pois não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade (AMARAL, 2007).

Sarubbo e colaboradores (2008) mostraram as atividades tensoativa e emulsificante de cepas de *Candida glabrata*. Neste trabalho, o agente emulsificante extracelular encontrado foi um heteropolímero. A produção máxima de biossurfactante foi quando as cepas foram cultivadas nos seguintes substratos óleo de semente de algodão e glicose.

Yarrowia lipolytica vem despertando atenção principalmente para a biorremediação de mar poluídos por óleos. Uma cepa de *Y. lipolytica* pode produzir emulsificante na presença de hidrocarbonetos ou petróleo. Supostamente, o mecanismo de assimilação de hidrocarboneto se realiza através da aderência da levedura às gotas de óleo, o que faz com que se produza um emulsificante durante seu crescimento (SOUZA et al, 2008).

Candida bombicola ATTC 22214 pode produzir quantidades relativamente grandes de soforolipídios a partir de glicerol (NICOL et al, 2012). Leveduras produtoras de biossurfactante foram isoladas a partir de águas residuais de uma indústria de laticínios. De 31 cepas isoladas que produziam biossurfactante, 12 mostraram atividade emulsificante após dois meses de incubação. Entretanto, somente *Trichosporon loubieri*, *Geotrichum* sp e *Trichosporon montevideense* exibiram grande capacidade estabilizadora de emulsão (MONTEIRO et al, 2012).

A composição, características, qualidade e quantidade dos biossurfactantes produzidos por esses micro-organismos estão extremamente relacionados com o

tipo de nutriente que são utilizados por eles como fonte de energia. Nesse sentido, diversos substratos podem ser utilizados contribuindo para melhor eficiência e produção desses compostos (BANAT et al, 2010).

2.3 Fatores que influenciam os bioprocessos com finalidade de produção de biossurfactantes

A composição e as características dos biossurfactantes são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (BANAT, 1995; FONTES, 2008; PILORRO, 2006).

As fontes de carbono utilizadas incluem carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais (SALIHU et al, 2009). A presença de glicose no meio de cultura aumenta a produção de biossurfactante. Fonte de nitrogênio também desempenha um papel importante na produção de biossurfactante por micro-organismos e contribui para o controle do pH no meio.

Várias fontes orgânicas e inorgânicas provaram ser eficazes. Whang et al. (2009) apud Salihu e colaboradores (2009) mostraram que a concentração de amônio e pH melhorou a eficiência do biossurfactante e aumentou a capacidade de emulsificação no óleo diesel, estabelecendo-se assim o pH ótimo para a produção.

Embora biossurfactantes apresentem vantagens importantes em relação aos surfactantes obtidos quimicamente, ainda não foram utilizados extensivamente na indústria devido aos custos de produção relativamente elevados. Algumas estratégias podem ser úteis para torná-la economicamente viável: (1) desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, incluindo otimização das condições de fermentação e processos de recuperação, (2) o uso de substratos baratos e (3) desenvolvimento de cepas com alta capacidade de produção (RAZA, et al, 2009; THAVASI et al, 2007; 2008).

Com relação aos substratos alternativos, sua utilização tem sido relatada tanto para as leveduras quanto para bactérias (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002). Sobrinho et al. (2008) utilizaram resíduos de óleo de amendoim e de licor de milho como substratos para a produção de glicolípídios por *Candida spherical*, enquanto

que a biossíntese de glicolipídios por *P. aeruginosa* foi obtida utilizando suco de caju e resíduos de refino de petróleo como substrato (ROCHA et al., 2007).

O principal problema relacionado ao uso de substratos alternativos, como meio de cultura é o de encontrar um substrato com o equilíbrio correto de nutrientes que permita o crescimento celular e geração de produtos (THAVASI et al, 2007).

Com relação ao desenvolvimento de cepas com melhor capacidade de produção, algumas cepas de *Bacillus* sp e *Acinetobacter* sp têm sofrido manipulação genética, apesar de mais limitada. Os esforços de manipulação genética têm sido mais aplicados a *P. aeruginosa* devido ao seu potencial comercial e um maior conhecimento sobre seu genoma (MUKHERJEE et al, 2006).

Diversos desenvolvimentos na otimização das condições de cultivo e processamento foram publicados recentemente. Para essa otimização geralmente utiliza-se técnicas de planejamento fatorial. Essa metodologia foi utilizada na produção de biossurfactante por *Rhodococcus* spp. MTCC 2574 crescendo em n-hexadecano (MUTALIK et al., 2008), *Gordonia* sp BS29 na produção de glicolipídios (FRANZETTI et al, 2009) e *B. circulans* MTCC 8281 na otimização da produção de biossurfactantes e em muitos outros trabalhos publicados na literatura (SIVAPATHASEKARAN et al, 2010).

2.4 Características químicas dos biossurfactantes produzidos por fungos

Ao contrário de surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com o seu padrão de dissociação em água, biossurfactantes são classificados principalmente por sua composição química e origem microbiana. Biossurfactantes de baixo peso molecular são eficientes na redução das tensões superficial e interfacial dos meios líquidos, enquanto os de alto peso molecular são mais eficazes na estabilização de emulsões óleo-água (PACWA- PLOCINICZAC et al, 2011).

Rosenberg e Ron (1999) classificaram os biossurfactantes em sete grupos distintos: glicopeptídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos ou lipídios neutros, surfactantes poliméricos e os surfactantes particulados.

Os biossurfactantes mais conhecidos são os glicolipídios. Eles são constituídos a partir de uma combinação de carboidratos com longas cadeias de

ácidos alifáticos ou ácidos hidroxi-alifáticos. Uma determinada espécie de micro-organismo é capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídios a depender da fonte de carbono disponível para seu crescimento. Dentre os glicolipídios, os mais conhecidos são os ramnolipídios, os trealolipídios e os soforolipídios (DESAI; BANAT, 1997; CARVALHO, 2012).

A primeira produção de ramnolipídios foi citada por Jarvis e Johnson (1949) através da utilização de *P. aeruginosa*. Foram citados por Kitamoto e colaboradores (2009), como sendo a classe de biossurfactantes que possui menos toxicidade.

O número de lipopeptídios com propriedades tensoativas reportado na literatura, é cada vez mais expressivo. Estes compostos são sintetizados principalmente por bactérias além de alguns achados que mostram a produção também por leveduras (CARVALHO, 2012).

A surfactina é um dos biossurfactantes mais conhecidos dessa classificação. É um lipopeptídio cíclico formado por uma cadeia de sete aminoácidos e suas extremidades ligadas a grupamentos carboxila e hidroxila de ácido β -hidroxilado, variando esta cadeia de 13 a 15 átomos (LANG, 2002).

Os fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros são componentes estruturais das células microbianas. Quando em meio rico de hidrocarbonetos, tanto as bactérias quanto as leveduras aumentam consideravelmente o nível de fosfolipídios. Algumas delas, durante o crescimento na presença de n-alcenos, excretam grandes quantidades de ácidos graxos e fosfolipídios com grandes propriedades tensoativas (BOGNOLO, 1999; DESAI & BANAT, 1997).

Outro grupo a ser citado são os biossurfactantes poliméricos. O termo mais adequado para se referir a esses compostos é bioemulsificante, pois é o termo que carrega sua principal função. Apresentam grande afinidade por interfaces óleo/água, e assim permitem a formação de emulsões estáveis. Dentre os biossurfactantes poliméricos disponíveis no mercado têm-se o Emulsan e o Liposan, possuindo alto poder emulsificante (KOSARIC, 1992; ROSENBERG et al, 1979).

Surfactantes particulados são microvesículas extracelulares e células microbianas que captam e dispersam os hidrocarbonetos em pequenas gotículas, formando uma emulsão. Possuem a mesma composição da membrana do micro-

organismo, porém com uma quantidade de fosfolipídio e polissacarídeo 5 e 350 vezes maior, respectivamente (DESAI & BANAT, 1997).

Tipo de biossurfactante	Micro-organismo
Glicolipídios <ul style="list-style-type: none"> - Ramnolipídios - Soforolipídios - Trehalolipídios - Cellobiolipídios 	<i>P. aeruginosa, Pseudomonas sp</i> <i>T.bombicola, T. apícola, T petrophilum</i> <i>N. erythropolis, Mycobacterium sp</i> <i>U. zeeae, U. Maydis</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas <ul style="list-style-type: none"> - Peptídio-lipídio - Viscosina - Serrawetina - Surfactina - Subtilisina - Gramicidina - Polimixina 	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polimyxia</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e Fosfolipídios <ul style="list-style-type: none"> - Ácidos graxos - Lipídios neutros - Fosfolipídios 	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos <ul style="list-style-type: none"> - Emulsan - Biodispersan - Liposan -Carboidrato-lipídio-Proteína - Manana-lipídio-proteína 	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados <ul style="list-style-type: none"> - Vesículas - Células 	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: Adaptada de DESAI & BANAT, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002.

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos

Diante do que foi apresentado na revisão de literatura, vê-se a importância do estudo e desenvolvimento de um biossurfactante produzido por amostras fúngicas isoladas da região amazônica, que tenha capacidade de ser menos tóxico ao homem e também ao meio ambiente como alternativa aos surfactantes químicos amplamente empregados em diversos campos. Espera-se que com este estudo possa-se diminuir ao custos de produtividade por meio da otimização do processo

de obtenção desse composto, ao mesmo tempo em que se garanta sua estabilidade, garantindo a eficácia dos produtos que possam contê-lo.

3 OBJETIVOS

Geral:

- Investigar a produção de biossurfactantes por fungos isolados do solo Amazônico.

Específicos:

- Identificar os fungos isolados das amostras de solo amazônico.
- Selecionar isolados fúngicos produtores de biossurfactantes.
- Investigar a influência de fatores de bioprocessos na produção do biossurfactante pelo isolado selecionado
- Avaliar a estabilidade de emulsificação do biossurfactante produzido pelo isolado selecionado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de estudo

Estudo laboratorial experimental com o objetivo de investigar a produção de biossurfactantes produzidos por fungos isolados de solo Amazônico.

4.2 Universo de estudo

4.2.1 Local de estudo

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA.

4.2.2 Amostra de solo

As amostras de solo foram coletadas de seis locais, do bosque do INPA, especificamente na coordenada geográfica que possui latitude Sul: 3.10'39" e longitude leste 59.96"77". A partir deste ponto, as próximas cinco coletas foram feitas a cada vinte metros deste local, com uma profundidade máxima de 1 cm.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Isolamento e identificação de fungos de amostras de solo da floresta Amazônica.

O isolamento foi realizado utilizando-se a técnica do espalhamento em superfície em placa descrita por Clark (1965). Um grama solo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água. A partir deste tubo, 1 mL foi transferido sucessivamente para quatro outros tubos. Essas amostras diluídas foram aplicadas (100 µL) em placas de Petri contendo Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (200 mg/L) e foram espalhadas na superfície do ágar com auxílio da alça de Drigalski, todo o procedimento realizado em triplicata. Após 72h horas de incubação (25°C), colônias desenvolvidas foram transferidas para tubos de ensaio. Semeaduras de esgotamento foram realizadas até a obtenção de cultivos monospóricos.

A identificação das colônias dos fungos isolados foi feita por meio da observação dos aspectos macroscópicos das colônias (tempo de crescimento, características de coloração, topografia anverso/reverso) e estudo microscópico técnica de microcultivo em lâmina descrito por Lacaz (2001).

Resumidamente, em uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril, foi acrescentado um cubo de ágar batata. A cultura a ser identificada foi semeada partir de repique recente, em todos os lados do cubo de ágar que foi recoberta com uma lamínula esterilizada. Para deixar o ambiente úmido, adicionou-se 1 a 2 mL de água destilada em um pequeno chumaço de algodão estéril, para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. Essa placa foi submetida à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que se observasse desenvolvimento de hifas. Após esse período, a esporulação foi inativada, adicionando 1 mL de formol ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24h-48h. Com auxílio de uma pinça a lamínula foi retirada, cuidadosamente e uma gota de corante azul de lactofenol foi instilada. A lamínula foi montada sobre uma lâmina. A lâmina foi visualizada em microscópio ótico com objetiva de 400x.

4.3.2 Seleção de fungos produtores de biossurfactantes

4.3.2.1 Bioprocesso em meio líquido

Em erlenmeyers (125 mL), 25 mL de meio de cultivo foram acrescentados, esse foi constituído por 40g/L de óleo de soja (soya®) e 20g/L de peptona. Para obtenção do inóculo, água estéril foi adicionada ao tubo dos isolados e foi feita uma suspensão de esporos. O meio de cultivo foi inoculado em uma concentração final de esporos de aproximadamente 1×10^4 esporos/mL, os erlenmeyers foram incubados sem agitação, a temperatura ambiente e por 7 dias.

Logo após esse tempo de crescimento, a cultura líquida foi filtrada com auxílio de papel filtro, com a finalidade de retirar as células fúngicas. O filtrado foi então separado para ser utilizado nos ensaios de avaliação quanto à produção de biossurfactantes.

4.3.2.2 Teste do colapso da gota

Este teste foi feito de acordo com Bodour e Maier (1998). Neste estudo utilizou-se uma placa de poliestireno com 96 micropoços (12.7 X 8.5 cm). Antes da utilização, cada placa foi lavada três vezes cada com água quente, etanol, água destilada e foram secas. 5 μ L de suspensão microbiana obtida de cada amostra foram inoculadas separadamente em "poços" de placas de ELISA previamente preenchidos com 2,0 μ L de óleo mineral previamente deixados a temperatura

ambiente por 24 horas. Após 1 minuto de reação o resultado foi determinado visualmente. Quando houve o colapso da gota de óleo mineral o resultado foi considerado positivo. Esses experimentos foram repetidos três vezes. O controle foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) a 25% no lugar das amostras.

4.3.2.3 Teste do índice de emulsificação (E₂₄)

Para este teste utilizou-se a metodologia descrita por Cameron e colaboradores (1988). Neste estudo avaliou-se a estabilidade de emulsões formadas pelo biossurfactante contra a fonte hidrofóbica tolueno. Neste ensaio, uma alíquota de 4 mL de células do filtrado livre de célula foi misturado com 6 mL de tolueno em um tubo com a utilização de vórtex vigorosamente por 2 minutos. Após 24 horas, a proporção de tolueno emulsificado foi comparada com o volume total de tolueno adicionado. O índice de emulsificação foi calculado pela seguinte fórmula:

$$E_{24} = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$$

4.3.3 Otimização da produção do biossurfactante pelo isolado selecionado e cinética do bioprocessamento

4.3.3.1 Fonte de carbono e nitrogênio

Foi avaliada a influência de diferentes fontes de carbono (20 g/L) e nitrogênio (10g/L) na produção de biossurfactantes pelo micro-organismo selecionado. As condições experimentais foram as mesmas descritas no item anterior sendo que cada substrato investigado foi avaliado de forma univariada. As fontes de carbono investigadas foram óleo de soja, amido, sacarose, e celulose, xilose e as fontes de nitrogênio foram peptona, extrato de levedura, extrato de carne, nitrato de sódio e malte.

4.3.3.2 Concentração de fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH e tempo de tratamento

Avaliou-se a influência dos fatores concentração do óleo de soja, extrato de levedura, pH e tempo de bioprocessamento por meio de um planejamento fatorial 2^k (dois níveis). O desenho escolhido foi 2⁴ com quatro repetições no ponto central (avaliação do erro experimental) conforme descrito por Barros Neto et al. [20] (Tabela 2). As demais condições experimentais foram similares às do item 4.3.2.1.

As influências desses fatores foram medidas por meio do índice de emulsificação (E_{24}).

As variáveis e níveis a serem estudados estão mostrados na Tabela 2.

Níveis		-1	0	+1
Fonte de carbono	X1 (g/L)	10	20	30
Fonte de nitrogênio	X2 (g/L)	5	10	15
pH	X3	4,0	5,0	6,0
Tempo de tratamento	X4 (d)	5	7	9

Tabela 2 - Níveis utilizados para concentração de glicose, biomassa, pH e tempo de tratamento no planejamento experimental 2^4 com arranjo tipo estrela.

As análises estatísticas foram realizadas no programa STATGRAPHICS versão 6.0 e também no STATISTICA versão 5.0.

4.3.4 Semi-purificação do biossurfactante e estudo de estabilidade

A semi-purificação foi realizada preparando-se 30 repetições do ensaio otimizado no item 4.3.3.2. O volume resultante dos bioprocessos foi reunido, filtrado e precipitado com etanol (1:4 v/v, 4°C, 48 horas). A mistura foi submetida a centrifugação (5000 rpm por 20 minutos) e o precipitado obtido foi utilizado nos testes de estabilidade.

O efeito da adição de NaCl (30% p/v) foi avaliado. Após a adição do sal a uma solução 1% p/v do precipitado contendo biossurfactante, a atividade emulsificante foi verificada pelo do índice de emulsificação (E_{24}).

O efeito da temperatura sobre a atividade biossurfactante foi investigado mantendo-se uma solução 1% p/v do precipitado contendo biossurfactante a 100° C em banho-maria durante 60 min, em seguida, foi verificada através do índice de emulsificação (E_{24}).

O Surfactante sintético de Tween 80 0,2% (p/v) foi utilizado como substância controle nesses ensaios.

Os resultados obtidos no presente estudo são apresentados a seguir no formato de artigo da Revista Process Biochemistry.

Produção de biossurfactantes por fungos isolados do solo amazônico

Hellen Holanda Sena^a, Michele Alves Sanches^b, Diego Fernando Silva Rocha^c, João Vicente Braga de Souza^c

^a *Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. R. Alexandre Amorin 330, 69010-300 Amazonas, Brazil.*

^b *Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. R. Alexandre Amorin 330, 69010-300 Amazonas, Brazil.*

^c *Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-971 Amazonas, Brazil.*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de biossurfactantes por fungos isolados de solo da floresta amazônica. Para alcançar esse objetivo foi realizado o isolamento de fungos de amostras de solo, foi feita a seleção do melhor produtor de biossurfactantes, foi investigada a influência da fonte de carbono, nitrogênio, pH e tempo na produção do biossurfactante e, por fim, o biossurfactante foi semi-purificado e submetido a ensaios de estabilidade. Como resultados observou-se que fungos pertenceram ao Filo Ascomycota Um total de 100 linhagens foram isoladas pelo método de diluições sucessivas. A seleção dessas linhagens foi feita através do método do colapso da gota e do índice de emulsificação. Um total de 61 linhagens foi capaz de produzir biossurfactante. Foram também avaliadas as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas para a produção de biossurfactantes, bem como o pH e o tempo de tratamento num planejamento fatorial 2⁴. Esse experimento mostrou que a melhor condição para obtenção de biossurfactante foi utilizando óleo de soja (20 g/L) , extrato de levedura (30g/L), num pH 9,0 por 9 dias. A avaliação da estabilidade da emulsão formada foi observada utilizando aquecimento a 100°C por 60 min e NaCl 30% (p/v). Tween 80 (0,2% p/v) foi utilizado como controle.

Palavra-chave: Solo amazônico, Biossurfactantes, Fungos, otimização.

1.Introdução

Fungos crescem em quase todos os habitats da Terra. Regiões tropicais, a exemplo do Brasil, são consideradas as que contêm a maior diversidade desses micro-organismos [1]. No solo, apresentam uma densidade populacional entre 10^4 a 10^6 fungos/grama de solo, atuando na solubilização de fosfatos inorgânicos, como agentes de controle biológico e na complementação fósforo para as plantas [2-4]. A floresta amazônica possui grande potencial de produção de substâncias úteis a partir de fungos isolados dela [5]. Apesar de sua grande biodiversidade, as espécies que compõem esse bioma são pouco conhecidas. Por conta disso, se destacam como um vasto campo a ser explorado na busca de micro-organismos que possam ser usados nos processos biotecnológicos [6].

Os Biossurfactantes são um grupo estruturalmente diverso de substâncias tensoativas produzido por micro-organismos. Todos são anfifílicos formados por duas partes: uma porção polar hidrofílica constituído de mono, oligo ou polissacarídeos; peptídeos ou proteínas; e um grupo hidrofóbico composto geralmente por uma cadeia de hidrocarbonetos saturados, insaturados ou ácido graxo [7,8]. Essa estrutura anfifílica confere uma ampla gama de propriedades incluindo a capacidade de diminuir a tensão superficial de líquidos formando micelas e microemulsões entre diferentes fases [9]. Essas propriedades possuem aplicações industriais de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases [10].

A produção de biossurfactantes produzidos por micro-organismos é influenciada por diversos fatores, entre eles: natureza da fonte de carbono, as concentrações de nutrientes como nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, enxofre, manganês, pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível [7,11-13], o que pode encarecer sua produção, quando comparado ao surfactantes sintéticos [14]. Por outro lado, embora

a incessante busca tenha encontrado inúmeros surfactantes químicos, eles são usualmente tóxicos ao meio ambiente e não são biodegradáveis [15]. Com o objetivo de investigar a produção de biossurfactantes por fungos isolados da floresta amazônica, realizaram-se: (i) o isolamento e a identificação de um fungo produtor de biossurfactante; (ii) a otimização e os parâmetros cinéticos relacionados à produção do biossurfactante pelo isolado selecionado, (iii) estabilidade de emulsificação do biossurfactante de origem fúngica quando comparado a um surfactante convencionalmente utilizado.

2 Materiais e métodos

2.1 Isolamento, seleção e identificação do fungo produtor de biossurfactante

As amostras de solo foram coletadas de seis locais, do bosque do INPA, Amazonas, Brasil, coordenada geográfica que possui latitude Sul: 3.10'39" e longitude leste 59.96"77". Para o isolamento, um grama solo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água. A partir deste tubo, 1 mL foi transferido sucessivamente para quatro outros tubos. Essas amostras diluídas foram aplicadas (100 µL) em placas de Petri contendo Agar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (200 mg/L). Após 72h horas de incubação (25°C), colônias desenvolvidas foram transferidas para tubos de ensaio. Procedimento realizado em triplicata. Semeaduras de desgaste foram realizadas até a obtenção de cultivos monospóricos. A identificação das colônias fúngicas foi feita por meio da observação dos aspectos macroscópicos das colônias e estudo microscópico descrito por Lacaz et al [16] e Barnett e Hunter [17].

Para seleção dos fungos produtores de biossurfactantes foram realizados bioprocessos em erlenmeyers (125mL) contendo 25 mL de meio de cultivo (40g/L de óleo de soja-soya® e 20g/L de peptona). Esse meio foi inculado com esporos dos isolados obtendo-se uma concentração final de 1×10^4 esporos/mL. Em seguida, os erlenmeyers foram incubados sem agitação, a temperatura ambiente (25°C) por 7 dias, seguido de filtração com papel filtro, para a retirada das células fúngicas. O

filtrado foi então separado para ser utilizado na detecção de biossurfactantes pelos métodos de colapso da gota descrito por Bodour e Maier [18] e pelo índice de emulsificação descrito por Cameron et al [19].

No teste do colapso da gota, método de screening para detecção da atividade tensoativa, foi utilizada uma placa de poliestireno com 96 micropoços (12.7 X 8.5 cm). Antes da utilização, a placa foi lavada três vezes cada com água quente, etanol, água destilada e secas. 5 µL de suspensão microbiana de cada amostra foram inoculadas separadamente em "poços" previamente preenchidos com 2,0 µL de óleo mineral previamente deixados a temperatura ambiente por 24 horas. Após 1 minuto de reação, o resultado foi determinado visualmente. Quando houve o colapso da gota de óleo mineral o resultado foi considerado positivo. Um controle foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) a 25%.

Para o teste do índice de emulsificação (E24), uma alíquota de 4 mL do filtrado da cultura (livre de células) foi misturado com 6 mL de tolueno em um tubo com a utilização de vórtex vigorosamente por 2 minutos. Após 24 horas, a proporção de tolueno emulsificado foi comparada com o volume total de tolueno adicionado. O índice de emulsificação foi calculado pela seguinte fórmula:

$$E24 = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$$

2.2 Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de

biossurfactantes

Foi avaliada a influência de diferentes fontes de carbono (20 g/L) e nitrogênio (10g/L) na produção de biossurfactantes pelo microrganismo selecionado. As condições experimentais foram as mesmas descritas no item anterior (2.1) sendo que cada substrato investigado foi avaliado de forma univariada. As fontes de carbono investigadas foram óleo de soja, amido, sacarose, e celulose, xilose e as fontes de nitrogênio foram peptona, extrato de levedura, extrato de carne, nitrato de sódio e malte.

2.3 Efeito da concentração da fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH e tempo de tratamento.

Avaliou-se a influência dos fatores concentração do óleo de soja, extrato de levedura, pH e tempo de bioprocessamento por meio de um planejamento fatorial 2^k (dois níveis). O desenho escolhido foi 2^4 com quatro repetições no ponto central (avaliação do erro experimental) conforme descrito por Barros Neto et al. [20] (Tabela 2). As demais condições experimentais foram similares às do item anterior (2.1)

As variáveis e níveis a serem estudados estão mostrados na Tabela 1.

Níveis		-1	0	+1
Fonte de carbono	X1 (g/L)	20	40	60
Fonte de nitrogênio	X2 (g/L)	10	20	30
pH	X3	4,0	5,0	6,0
Tempo de tratamento	X4 (d)	5	7	9

Tabela 2 - Níveis utilizados para concentração de glicose, biomassa, pH e tempo de tratamento no planejamento experimental 2^4 com arranjo tipo estrela.

As análises estatísticas foram realizadas no programa STATGRAPHICS versão 6.0 e também no STATISTICA versão 5.0.

2.4 Semi-purificação do biossurfactante e estudos de estabilidade

A semi-purificação foi realizada preparando-se 30 repetições do ensaio otimizado no item 2.3. O volume resultante dos bioprocessos foi reunido, filtrado e precipitado com etanol (1:4 v/v, 4°C, 48 horas). A mistura foi submetida a centrifugação (5000 rpm por 20 minutos) e o precipitado obtido foi utilizado nos testes de estabilidade. O efeito da adição de NaCl (30% p/v) foi avaliado. Após a adição do sal a uma solução 1% p/v do precipitado contendo biossurfactante, a atividade emulsificante foi verificada pelo índice de emulsificação (E_{24}).

O efeito da temperatura sobre a atividade biossurfactante foi investigado mantendo-se uma solução 1% p/v do precipitado contendo biossurfactante a 100° C em banho-maria durante 60 min, em seguida, foi verificada através do índice de emulsificação (E_{24}).

O Surfactante sintético de Tween 80 0,2% (p/v) foi utilizado como substância controle nesses ensaios.

3. Resultados

3.1 Isolamento e identificação de fungos de amostras de solo da floresta

Amazônica

O isolamento dos fungos das amostras de solo resultou em colônias de fungos filamentosos (n=100) da classe dos Ascomycetes. Essas, especificamente, pertenceram aos gêneros: *Penicillium* (46), *Aspergillus* (24), *Trichoderma* (12), *Fusarium* (8), *Mucor* (6), *Acremonium* (2), *Gliocadium* (1), *Fonsecae* (1).

3.2 Seleção de fungos produtores de biossurfactantes

Os resultados dos testes de índice de emulsificação e colapso de gota que foram realizados com a finalidade de selecionar fungos produtores de biossurfactantes são apresentados na Tabela 3. Quanto ao índice de emulsificação, 9 isolados apresentaram bons resultados ($E_{24} > 40$), esses pertenciam aos gêneros: *Penicillium* sp (3), *Trichoderma* sp (3) e *Fusarium* sp (3). O isolado *Penicillium* 8CC2 apresentou um forte índice de emulsificação (54,2) e foi selecionado para as demais etapas do trabalho porque sua emulsão foi mantida por mais de 15 dias.

Identidade do isolado	Resultado do "teste do colapso da gota"	Índice de Emulsificação	Identidade do isolado	Resultado do "teste do colapso da gota"	Índice de Emulsificação
<i>Fusarium</i> sp.87LIV12	Neg	64,28	<i>Penicillium</i> sp 58A3AC.	Neg	1,6
<i>Fusarium</i> sp. 86LV272	Neg	58,57	<i>Penicillium</i> sp. 66S1ABC	Neg	1,6

<i>Fusarium</i> sp.85RV342	Neg	57,14	<i>Aspergillus</i> sp. 78BPG1	Neg	1,5
<i>Penicillium</i> sp.97VV74	Neg	57,14	<i>Penicillium</i> sp. 31VG23	Neg	1,5
<i>Penicillium</i> sp 8CC2.	Neg	54.2	<i>Penicillium</i> sp 38BAB2	Neg	1,5
<i>Trichoderma</i> sp.91BN312	Neg	52.85	<i>Aspergillus</i> sp 44A3ACL.	Neg	1,5
<i>Trichoderma</i> sp.60AVR3	Pos	51	<i>Aspergillus</i> sp 45A3AA	Neg	1,5
<i>Trichoderma</i> sp. 16AC2	Neg	42.85	<i>Penicillium</i> sp 49B3LV.	Neg	1,5
<i>Penicillium</i> sp. 62BLC2	Neg	40,3	<i>Mucor</i> sp 68S1BBC.	Neg	1,5
<i>Trichoderma</i> sp 29VG13	Neg	36,9	<i>Penicillium</i> sp 41BVR2	Neg	1,4
<i>Fusarium</i> sp 30CV	Neg.	34,8	<i>Penicillium</i> sp.83S3BAC	Neg	0,7
<i>Penicillium</i> sp 1CV2	Neg	34,14	<i>Trichoderma</i> sp. 79APG1	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp. 69CPC1	Neg	29,6	<i>Mucor</i> sp 100VV2.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 93C2.	Neg	27,14	<i>Penicillium</i> sp.98VV33	Neg	0
<i>Trichoderma</i> sp.92LAC52	Neg	21,42	<i>Penicillium</i> sp 77S4AAC.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 54BBC2.	Neg	19,9	<i>Penicillium</i> sp.96VV14	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 64RG3.	Neg	19,9	<i>Fusarium</i> sp 75BVG1	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp. 50 B3BA	Neg	16,2	<i>Mucor</i> sp.90AVG1	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp.71S4ABV	Neg	11,2	<i>Fusarium</i> sp.88RV302	Neg	0
<i>Trichoderma</i> sp. 37BBV2	Neg	5,9	<i>Penicillium</i> sp.94VR3	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp. 76S32BC	Neg	5,4	<i>Penicillium</i> sp. 95C1	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp.48B3BL	Neg	5	<i>Penicillium</i> sp 89 VV182.	Neg	0

<i>Gliocadium</i> sp. 72CVR2	Neg	4,4	<i>Penicillium</i> sp.2BL3	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp. 67AV202	Neg	3,5	<i>Fusarium</i> sp 3ML2.	Neg	0
<i>Acremonium</i> sp. 26BC3	Neg	3,1	<i>Aspergillus</i> sp.4CC4	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 43B3VG.	Neg	2,3	<i>Penicillium</i> sp 5bc3	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp 53BAC2.	Neg	2,1	<i>Aspergillus</i> sp 6PG2.	Neg	0
<i>Penicillium</i> spp.55BVR2	Neg	1,9	<i>Fusarium</i> sp 7BC13.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp.63BBC2	Neg	1,9	<i>Trichoderma</i> sp. 9BC2	Neg	0
<i>Fonsecaeeae</i> sp. 802VG4	Neg	1,9	<i>Penicillium</i> sp 10BL2.	Neg	0
<i>Aspergillus</i> spp 27AC3.	Neg	1,8	<i>Mucor</i> sp.11CBC3	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp. 65BC	Neg	1,8	<i>Mucor</i> sp.12AVV2	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp. 46A3AB	Neg	1,8	<i>Trichoderma</i> sp.13AG2	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp. 74S2CBC	Neg	1,8	<i>Penicillium</i> sp 14BC2	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp 51B3BV	Neg	1,7	<i>Trichoderma</i> sp.17CPV2	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp 25 AVG3.	Neg	1,7	<i>Penicillium</i> sp. 18BL2	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 42BAV2.	Neg	1,7	<i>Penicillium</i> sp 19VR3.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp. 47BABM2	Neg	1,7	<i>Penicillium</i> sp. 20VC3	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp. 81S1ABV	Neg	1,7	<i>Aspergillus</i> sp.22LC2	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp. 73BPC1	Neg	1,7	<i>Aspergillus</i> sp 23AC2.	Neg	0
<i>Trichoderma</i> sp 15VG3	Neg	1,6	<i>Aspergillus</i> sp 24BC2.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 28 VG3	Neg	1,6	<i>Aspergillus</i> sp 32AG13.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp.40B3CL	Neg	1,6	<i>Aspergillus</i> sp. 82S4ABC	Neg	0

<i>Penicillium</i> sp. 52B2AV	Neg	1,6	<i>Aspergillus</i> sp.84BV134	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 56BBR2.	Neg	1,6	<i>Mucor</i> sp 89AVV.	Neg	0
<i>Penicillium</i> sp 57A2LG.	Neg	1,6	<i>Trichoderma</i> sp.34VG33	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp 59CG3.	Neg	1,6	<i>Aspergillus</i> sp 35MV3	Neg	0
<i>Acremonium</i> sp. 61A3VC	Neg	1,6	<i>Penicillium</i> sp 36BLC3.	Neg	0
<i>Aspergillus</i> sp. 70S1BVP	Neg	1,6	<i>Penicillium</i> sp.39B3CV	Neg	0

Tabela 3- Identidade dos isolados fúngicos isolados desolo de uma mata preservada da Cidade de Manaus e resultado dos testes do colapso da gota e do índice de emulsificação (E_{24}).

3.3 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes.

Com a finalidade de otimizar a produção de biossurfactantes pelo isolado *Penicillium* 8CC2 , foi investigada a influência de fontes de carbono e nitrogênio por meio de experimentos univariados (Fig 1 e Fig.2). A fonte de carbono e nitrogênio que promoveram os maiores índices foram óleo de soja e extrato de levedura, respectivamente.

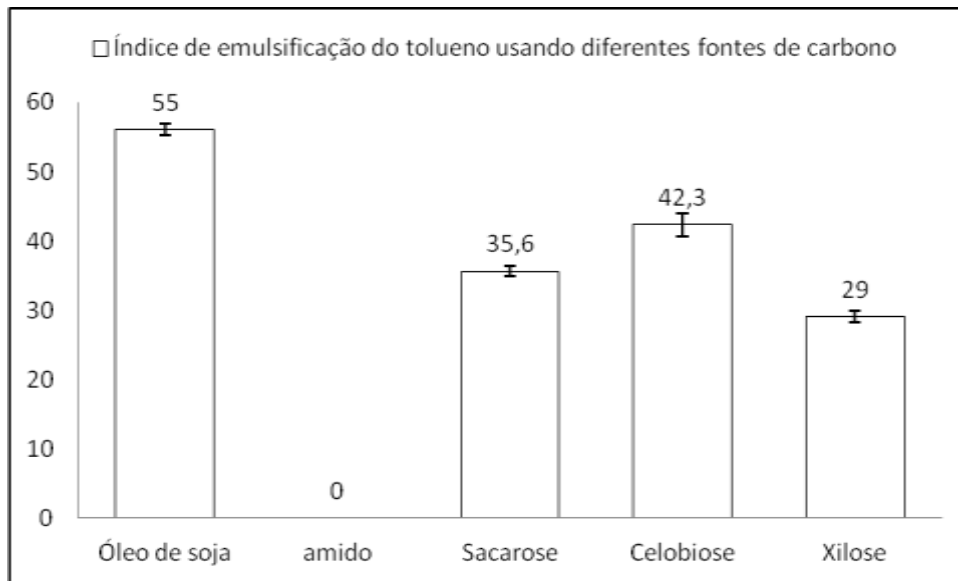


Fig.1. Influência das diferentes fontes de carbono na produção de biossurfactantes pelo isolado *Penicillium* 8CC2 (índice de emulsificação).

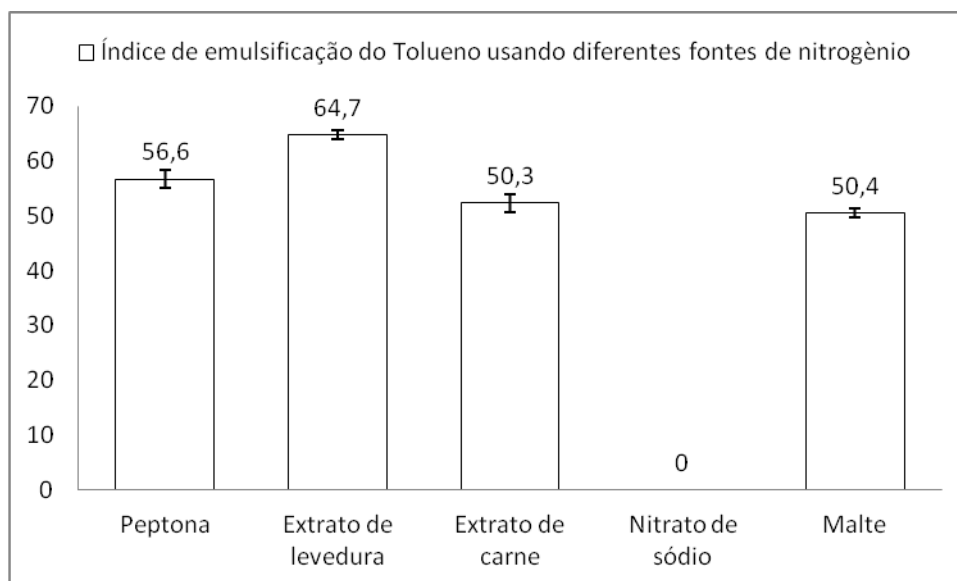


Fig.2. Efeito das diferentes fontes de nitrogênio na produção de biossurfactantes pelo isolado *Penicillium* 8CC2 (índice de emulsificação).

3.4 Influência do óleo de soja, extrato de levedura, pH e tempo na produção de biossurfactantes.

Uma vez sabendo quais eram as melhores fontes de carbono e nitrogênio, decidiu-se investigar a influência das concentrações desses componentes, pH e do tempo na produção biossurfactantes por *Penicillium* 8CC2. Essa investigação foi realizada por meio de um planejamento experimental 2^4 , adicionado de quatro repetições no ponto central. A Tabela 4 apresenta os níveis dos fatores empregados e resultados da variável (Índice de emulsificação E_{24}).

Óleo de Soja (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	pH	Tempo (d)	E_{24}
40	20	5	7	61
60	30	4	9	76
60	10	4	9	53
40	20	5	7	60
60	30	6	9	76
20	30	6	9	80
20	10	4	5	47
40	20	5	7	58
40	20	5	7	62
60	30	4	5	51
20	10	6	9	62
20	10	6	5	56
60	30	6	5	60
20	30	6	5	69
60	10	4	5	48
20	10	4	9	58
60	10	6	5	60
20	30	4	5	62
20	30	4	9	78
60	10	6	9	47

Tabela 4- Influência das concentrações do óleo de soja, extrato levedura, pH e Tempo na produção de biossurfactantes por *Penicillium* 8CC2 em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial 2^4 .

Os efeitos principais e suas respectivas interações calculadas a partir dos dados da Tabela 4 são apresentados na Tabela 5. Os erros padrão (σ) dos efeitos foram calculados a partir das replicadas do ponto central (Tabela 5). Segundo Barros Neto et al. [20], ao nível de 95% de confiança, somente são considerados significativos os efeitos, em módulo, cujos valores forem maiores que " $t_v \times \sigma$ ", onde t_v é o valor do

teste t para v graus de liberdade. O valor do teste t para 3 graus de liberdade (t_2), ao nível de 95% de confiança é 3,182.

Média	61,2 +/- 0,381881
A: Óleo de soja	= -5,125 +/- 0,853913*
B: Extrato de levedura	= 15,125 +/- 0,853913*
C: pH	= 4,625 +/- 0,853913*
D: Tempo	= 9,625 +/- 0,853913*
AB	= -1,375 +/- 0,853913
AC	= -0,875 +/- 0,853913
AD	= -1,375 +/- 0,853913
BC	= -0,125 +/- 0,853913
BD	= 7,375 +/- 0,853913*
CD	= -4,625 +/- 0,853913*

Tabela 5- Efeito das variáveis testadas para produção de biossurfactantes *por Penicillium 8CC2* calculados a partir dos dados apresentados na Tab. 4. Os efeitos que apresentaram significado estatístico (nível de confiança de 95%) estão indicados pelo símbolo *.

Todos os fatores estudados apresentaram significado estatístico bem como as interações: (extrato de levedura) x (tempo) e (pH) e (tempo). Considerando-se os efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tabela 4 e esse é descrito a seguir:

$$E_{24} = 8,1375 - 0,128125 \cdot \text{óleo de soja} - 0,534375 \cdot \text{extrato de levedura} + 10,4063 \cdot \text{pH} + 4,5 \cdot \text{tempo} + 0,184375 \cdot \text{extrato de levedura} \cdot \text{Tempo} - 1,15625 \cdot \text{pH} \cdot \text{tempo} \text{ (Equação 1)}$$

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para validação do modelo matemático apresentado (Equação 1) e pode ser observada na Tabela 6. O modelo matemático apresentou regressão significativa (91,8%), seus fatores apresentaram significado estatístico e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$).

Fonte	Soma dos quadrados	Df	Media dos quadrados	F-Ratio	P-Value
A: óleo de soja	105,063	1	105,063	36,02	0,0093
B: Extrato de levedura	915,063	1	915,063	313,74	0,0004
C: pH	85,5625	1	85,5625	29,34	0,0123
D: Tempo	370,563	1	370,563	127,05	0,0015
BD	217,563	1	217,563	74,59	0,0033

CD	85,5625	1	85,5625	29,34	0,0123
Falta de ajuste	149,075	10	149,075	5,11	0,1030
Erro puro	8,75	3	8,75		
Total	1937,2	19			

R-squared = 91,8529 por cento

Tab. 6 Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para produção de biossurfactantes por *Penicillium* 8CC2

Para representar a estimativa de E_{24} foram feitas superfícies de resposta (Fig. 3) a partir dos dados gerado pelo modelo avaliado. As superfícies de respostas construídas demonstraram que as concentrações ótimas para a máxima produção de biossurfactantes foram: óleo de soja 20 g/L, extrato de levedura 30 g/L, pH 6 e Tempo 9 d, sendo obtido um E_{24} teórico de 79,82.

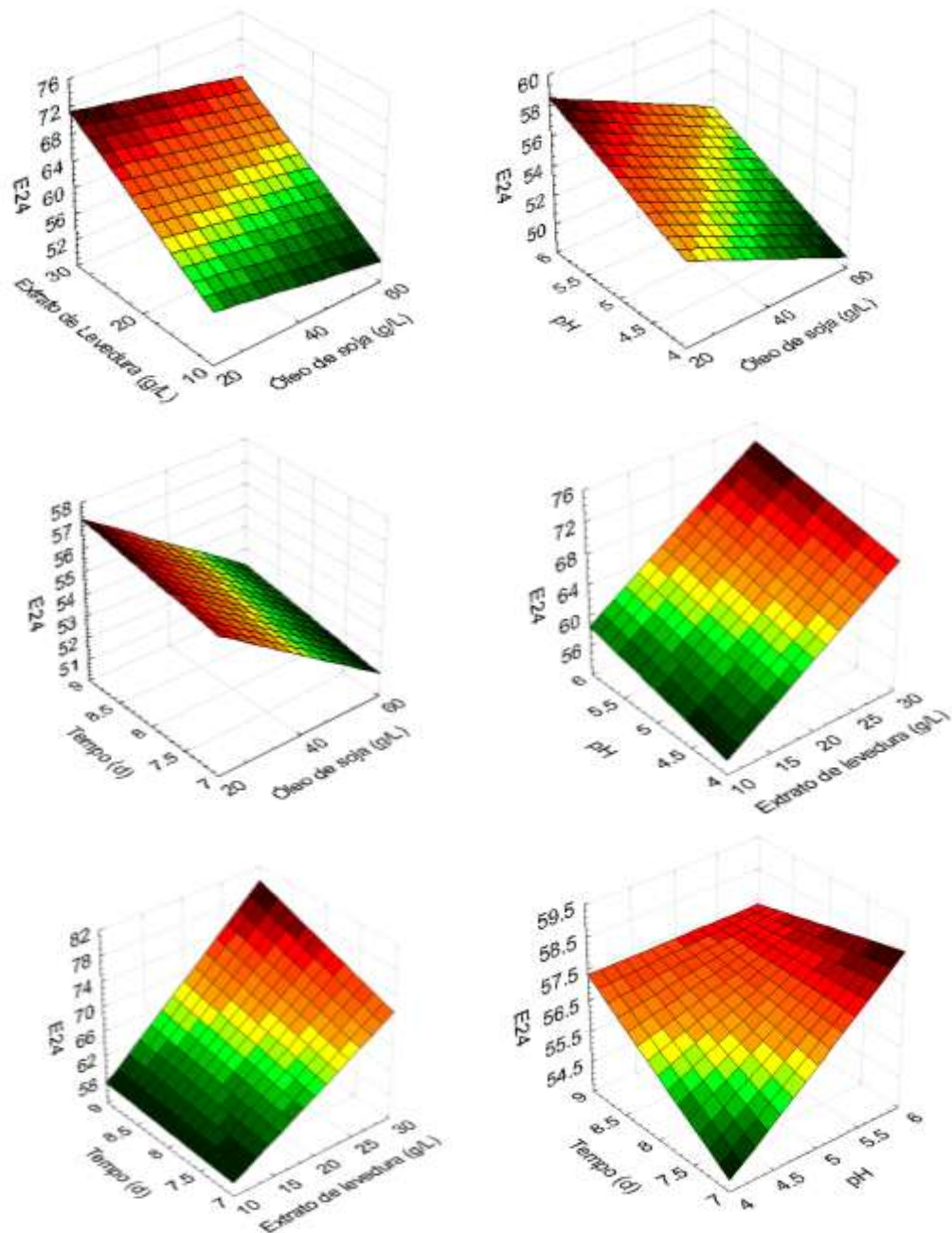


Fig.3. Superfície de resposta da produção de biosurfactante pelo *Penicillium* 8CC2 em função do óleo de soja, extrato de levedura, pH e do tempo de produção.

3.5 Estudos de estabilidade

A estabilidade do novo surfactante foi avaliada frente diferentes condições físicas, os resultados desses ensaios são apresentados nas Fig 4 e Fig 5. O aquecimento

(100 °C por 60 minutos) não influenciou a atividade biossurfactante. A alta concentração de NaCl causou uma redução de 12,7% no E₂₄ do biossurfactante produzido por *Penicillium* 8CC2 e inibiu completamente a emulsão do surfactante comercial Tween 80.

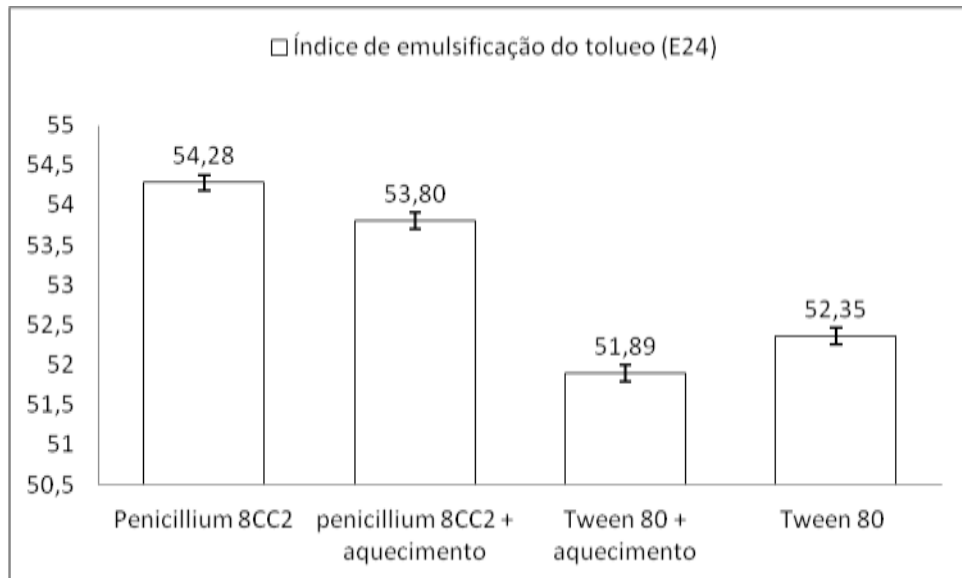


Fig 4. Comparação da atividade de emulsificação do *Penicillium* 8CC2 com o surfactante químico tween 80 (0,2%) após aquecimento a 100°C por 60 min.

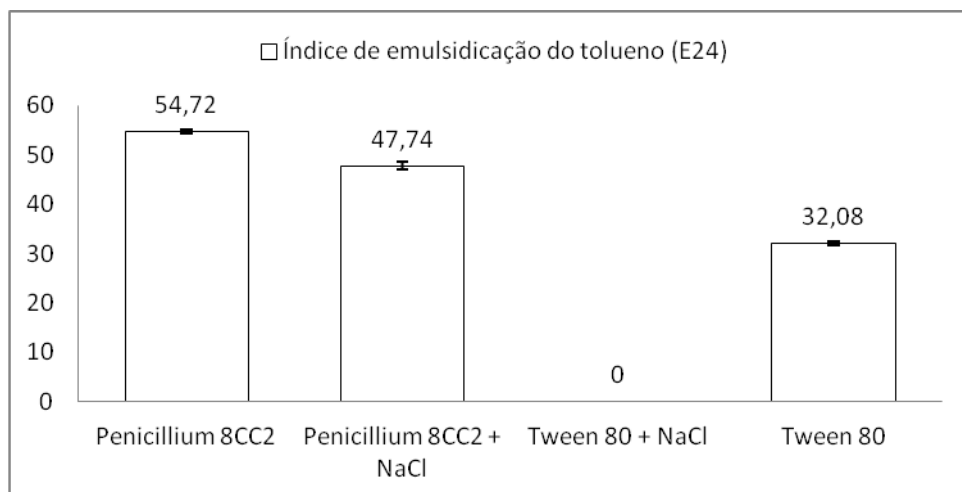


Fig.5- Comparação da atividade de emulsificação do *Penicillium* 8CC2 com o surfactante químico Tween 80 (0,2%) após a adição de NaCl (30% p/v).

Discussão

A demanda industrial por surfactantes é alta e, uma vez que, os surfactantes de origem sintética vem apresentando problemas relacionados a sua toxicidade e recalcitrância, os surfactantes de origem natural (biosurfactantes) são uma alternativa [9,21,22,23]. O presente estudo foi importante por investigar a presença de fungos produtores de biosurfactantes em solo da região amazônica, sendo que, as suas maiores contribuições aqui alcançadas foram o isolamento da linhagem produtora de *Penicillium* 8CC2 e a definição preliminar dos parâmetros de bioprocessos.

No presente estudo, os gêneros isolados do solo pertenceram aos gêneros *Penicillium* (46), *Aspergillus* (24) e *Trichoderma* (12) *Fusarium* (8), *Mucor* (6), *Acremonium* (2), *Gliocadium* (1), *Fonsecae* (1). O Filo Ascomycete, bem como esses gêneros citados, são usualmente isolados em solos [24,25,26,27]. Esses mesmos gêneros também já foram isolados de água [28,29], plantas [30], madeiras [31], entre outros.

Dos 100 isolados fúngicos submetidos ao teste do colapso da gota, a maioria (99) apresentaram resultado negativo, a exceção do isolado *Trichoderma* 60AVR. Quando submetido ao índice de emulsificação (E_{24}), 9 isolados possuíram E_{24} acima de 40, e foram classificados como forte produtores de biosurfactantes. Trabalhos anteriores, que comparam diferentes métodos de detecção de biosurfactantes demonstraram que a atividade emulsificante não possui relação direta com a redução da tensão superficial de determinado líquido [32,33], sendo possível que essas 9 amostras tenham capacidade de emulsificação, mas que não são capazes de reduzir a tensão superficial de líquidos imiscíveis. Os gêneros que apresentaram forte capacidade de emulsificar o tolueno foram: *Penicillium* sp. (3), *Trichoderma* sp (3), *Fusarium* sp (3). Trabalhos anteriores já haviam demonstrado o potencial de *Penicillium* spp. na produção de biosurfactantes [34,35], porém poucos haviam descrito o potencial dos gêneros *Trichoderma* [36] e *Fusarium*. Essa constatação ressalta a importância de uma maior busca de fungos filamentosos que tenham capacidade de emulsificar hidrocarbonetos, pois número de estudos existentes é pequeno quando comparado às bactérias e leveduras com capacidade emulsificante.

A fonte de carbono utilizada para a produção de biossurfactante pode ser proveniente de três categorias: carboidratos, óleos vegetais e hidrocarbonetos [37,38]. No presente estudo, a síntese de biossurfactante foi maior utilizando como fonte de carbono o óleo de soja. No entanto, deve-se destacar que, *Penicillium 8CC2* foi capaz de produzir biossurfactante com celobiose, sacarose e xilose. Esse dado demonstra que *Penicillium 8CC2* pode ser considerado um isolado com grande capacidade de produção desse metabólito, mesmo quando há variação na fonte de carbono utilizada no processo. O amido, apesar de ser utilizada por outros microorganismos como fonte carbono [39], não se apresentou como substrato adequado para produção de biossurfactantes por *Penicillium 8CC2*.

Segundo a literatura, os biossurfactantes são produzidos quando há limitação da fonte de nitrogênio, ocorrendo durante a fase estacionária do crescimento da biomassa [40,41,42]. Quando a limitação por nutrientes inicia, o crescimento microbiano diminui, mas a fonte de carbono continua sendo utilizada para a biossíntese de lipídios. Neste trabalho, o extrato de levedura foi a fonte mais adequada para produção do metabólito de interesse, seguido por peptona, extrato de carne e malte. A fonte de nitrogênio mineral (nitrato de sódio) não foi adequada para produção do biossurfactante. Um estudo de Cooper e Paddock [43] demonstrou resultados semelhantes, esse observaram que *Torulopsis bombicola* produziu biossurfactantes utilizando extrato de levedura e não foi capaz de produzir utilizando nitrato de sódio.

O delineamento experimental é uma excelente ferramenta para estudar os efeitos de uma única interação e de todos os parâmetros simultaneamente [44, 45, 46]. No presente estudo, o uso dessa ferramenta demonstrou que todos os fatores estudados (óleo de soja, peptona, pH e tempo) e algumas das suas interações apresentaram significativa influência na variável de resposta (produção do biossurfactante). O modelo matemático validado demonstrou que pode-se obter $E_{24}=79,82$ utilizando-se 20 g/L óleo de oliva, 30 g/L extrato de levedura, pH 6 e 9 dias de bioensaio. Quanto ao fator pH, hoje sabe-se que, a máxima produção de biossurfactantes ocorre a partir da faixa de pH ótimo de crescimento do microorganismo empregado. Para produção desse biossurfactante, bem como para qualquer reação química, o pH afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos

efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática [47]. Kiran et al [48] mostrou que um isolado de *Aspergillus ustus* obteve sua produção máxima utilizando pH 7. *Mucor circinelloides* produziu biossurfactante em pH 8 usando como substrato casca de maçã, óleo vegetal e água do milho [49]. O tempo de produção necessário para maior produção de biossurfactante por *Penicillium sp* 8CC2 no estudo foi de 9 dias. *Aspergillus fumigatus* produziu biossurfactante em 112 horas, usando fermentação no estado sólido [50]. *Aspergillus ustus* isolado de uma esponja marinha teve sua produção otimizada em 120 horas no caldo Sabouraud dextrose [49]. Ensaios de otimização com *Penicillium* 8CC2 podem resultar na redução do tempo de bioprocessamento para valores similares aos apresentados nesses estudos.

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada frente à alta temperatura e à força iônica. Submetendo-o a 100°C por 60 min, não foi verificada influência em sua atividade, embora tenha havido um declínio na atividade surfactante do Tween 80 0,2% (p/v), usado como controle. Esse resultado demonstra sua potencial utilidade na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, em que a necessidade de aquecimento para esterilidade é de grande importância [50,51]. Quanto à força iônica, houve uma pequena redução na capacidade emulsificante de *Penicillium* 8CC2 quando o NaCl (30%) foi adicionado, porém ainda mantendo-se uma emulsão estável. O agente emulsificante comercial tween 80, utilizado como controle, não conseguiu se manter estável quando o NaCl foi adicionado. Esse resultado demonstra que esse biossurfactante pode ser utilizado em condições de alta concentração salina, a exemplo das atividades de recuperação terciária de petróleo.

Considerando os resultados aqui encontrados, pode-se concluir que fungos isolados do solo Amazônico podem ser potenciais produtores de biossurfactantes. De um total de 100 isolados, 9 apresentaram como bons produtores ($E_{24} > 40$). Desses, *Penicillium* 8CC2 foi escolhido para otimização de produção do biossurfactante, por meio da padronização das fontes de carbono e nitrogênio, pH e do tempo, o que resultou no aumento da sua produção. Esse metabólito também se mostrou estável frente às altas temperaturas e às forças iônicas.

Referências

- [1] Blackwell M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American journal of botany* 2009; 98:426-38.
- [2] Pradhan N, Sukla L. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology* 2005; 10:850-854.
- [3] Gams, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. *Biodiversity and conservation* 2006;16: 69-72.
- [4] Schimit JP, Mueller M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* 2006;16:99-111.
- [5] Delabona P, Farinas C; Silva M, Azzoni S, Pradella J. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource technology* 2012; 107:517-21.
- [6] Thieme M, Lehner B, Abell R, Hamilton S, Keldorfer J, Powell G, Riveros J. Freshwater conservation planning in data-poor areas: an example from a remote basin (Madre de Dios river, Peru and Bolivia). *Biological Conservation* 2007;135:484-501.
- [7] Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinott M, Fracchia L, Smith T, Roger Marchan R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology* 2010; 87:427-44.
- [8] Pacwa-plociniczak M, Plaza G, Piotrowska-seget Z, Cameotra Swaranjit T. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences* 2011;12:633-54.
- [9] Das P, Mukherjee S, Sen R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* 2008;72:1229-34.
- [10] Nitschke M, Pastore. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quimica Nova* 2002; 25: 772-776.
- [11] Fontes G, Amaral P, Coelho M. Produção de biossurfactante por levedura. *Quimica nova* 2008;31:2091-2099.
- [12] Georgiou G, Lins S, Sharma M. Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnology* 1992;10: p. 60-65, 1992.
- [13] Pirrolo M. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas)- Pós-graduação em ciências biológicas. Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

- [14] Thavasi R; Jayalakshmi S; Balasubramanian T; Banat I. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Letters in Applied Microbiology*, v. 45, P.686–691, 2007.
- [15] Panathu K, Rahman M, Gakpe E. Production, characterization and application os biosurfactants, review. *Biotechnology* 2008; 7:360-370.
- [16] Lacaz C, Porto E, Martins J. *Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 2001.
- [17] Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4ª ed. USA: Burgess Publishing Co., 1998.
- [18] Boudour A, Maier M. Application of drop-collapse technique for surfactant quantatio and screening of biosfactant-producing micoorganisms. *Jornal of Microbiological Methods* 1998;32:273-280.
- [19] Cameron D, Cooper D, Neufeld R. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54:1420–1425.
- [20] Barros B.; Scarminio IS.Bruns RE. *Planejamento e otimização de experimentos*. 1.ed. Campinas: UNICAMP, 1995, 302
- [21] Delabona P, Buzon R, Codimaa CA,Tremacoldi CR, Rodrigues A, Farinas CS. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *biomass and bioenergy* 2012; 37: 243-250.
- [22] Nitschke, M.; Costa, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Science & Technology* 2007; 18: 252-259.
- [23]Nitschke, M.; Pastore, G. M. Biosurfactantes a partir de residuoses agroindustriais. *Revista Biotecnologia Ciência Desenvolvimento*. 2003; 31: 63-67.
- [24] Pradhan N, Sukla LB. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology* 2005; 5: 850-854.
- [25] Christian LL, Michael SS, Mark AB, Noah F. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types oil *Biology & Biochemistry* 2008; 40:2407–2415.
- [26] Kulkarni P, Gupta N. Screening and evaluation of soil fungal isolates for xylanase production. *Rec Res Sci Tech* 2013; 5:33–6.
- [27] Vancov T, Keen B. Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86Fand ITS4 primers. *FEMS Microbiology Letter* 2009; 296:91–6.

- [28]Oliveira L, Cavalcanti MA, Passavante JZ, Fernandes MJ, Lima DM. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. *Honeyhnea*, 2011; 32: 215-220.
- [29] Iskandar NL, Zainudin NA, Tan SG, Iskandar NL. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 2011; 23: 824–830
- [30] Singh D, Rathod V, Ninganagouda S, Hiremath J, Singh AK, Mathew J. Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014; 2014: 1-8.
- [31] Basso TP, Gallo CR, Basso LC. Cellulolytic activity of isolated fungi from sugarcane bagasse and decayed wood. *Pesquisa. agropecuaria brasileira* 2010;45:1282-1289.
- [32] Tugrul T Cansunar E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2005; 21: 851–853.
- [33] Youssef N, Duncana K, Naglea D, Savagea K, Knappb RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2004; 56:339 – 347.
- [34] Luna-Velasco M, Esparza-Garcia F, Canizares-Villanueva O, Rodriguez-Vazquez R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochemistry* 2007; 47:310–314
- [35] Camargo-de-Morais MM, Ramos SAF, Pimentel MCB, M.A. de Morais Jr, . Lima Filho JL. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal of Microbiology & biotechnology* 2003; 19: 191–194.
- [36] Askolin S, Nakari-Setälä T, Tenkanen M. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Applied Microbiology Biotechnology* 2001; 57:124–130.
- [37] Raza ZA, Khanb MS, Khalid MZ. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutante. *Process Biochemistry* 2007; 42: 686–692
- [38] Kim HS, Yoon B, Lee C, Suh H, Oh H, Katsuragi T, Yoshiki T. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Jornal of fermetation and bioengineering*, 1997; 84: 41-46.

- [39] Makkar RS, Cameotra SS. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998; 20: 48–52;
- [40] Desai ID, Banat AM. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology & Molecular Biology Review*; 1997: 47–64.
- [41] Decesaro A, Rigon MR, Thomé A, Colla LM. Produção de biossurfactantes por micro-organismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Quimica Nova* 2013; 36:947-954.
- [42] Hee-Sik Kim H , Jeon JW, Kim BH, Ahn CY, Oh EH . Byung-Dae Yoon. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology* 2006; 70: 391–396.
- [43] Cooper DG, Paddock DA. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. & environmen. Microbiol* 1984:173-176.
- [44] Pattanathu KSM, Rahman EG. Production, Characterization and applications of biosurfactants- Review. *Biotechnology* 2008; 2:360-370.
- [45] M.E.R. Carmona, M.A.P. da Silva, S.G.F. Leite, Biosorption of chromium using factorial experimental design. *Process Biochemistry* 2005; 40: 779–788.
- [46] K. Ravikumar, S. Krishnan, S. Ramalingam, K. Balu, Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent, *Dyes Pigments* 2007; 72: 66–74
- [47] Gabriel Luis Castiglioni, George Stanescu, Luiz Alberto Oliveira Rocha and Jorge Alberto Vieira Costa. Analytical modeling and numerical optimization of the biosurfactants. *Acta Scientiarum. Technology* 2014; 36: 61-67.
- [48] Kiran GO, Hema TA, Gandhimathia R, Selvina J, Thomasa TA, Ravjia T, Natarajaseenivasan K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; 73:250–256.
- [49] Acioly LM, Silveira AA, Anjos MN, Silva, Leite GKB, Okada MV, Campos-Takaki GM. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel, oil vegetable and Corn step liquor as substrat. *Microbe in applied Research: corrente advantage and challenges* 2012; 1: 344-348.
- [50] Monteiro AS, Bonfim MRQ, Domingues VS, Corrêa Jr. A, Siqueira EP, Zani CL, Santos VL. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts

isolated from effluents of a dairy industry. *Bioresource Technology* 2010; 101: 5186–5193.

[51] Khopade A, Ren B, Liu XY, Mahadik, K, Zhang L, Kokake, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal Colloid Interface Science* 2011; 367: 311-318.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; PINAZO, M; INFANTE, M; CASALS, M; GARCIA, F; MANRESA, A. Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367-1371, 2001.

AMARAL, P. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. 2007. 243 f. **Tese** (Doutorado em ciências)- Pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

BANAT, I; SAMARAH, N; MURAD, M; HORNE, R; BANERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p 80-88, 1991.

BANAT, I. 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; FRANZETTI, A; GANDOLFI, I; BESTETTI, G; MARTINOTT, M; FRACCHIA, L; SMYTH, T; ROGER MARCHAN, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-44, 2010

BATES, S; AND FERRAN GARCIA-PICHEL, F. A culture-independent study of free-living fungi in biological soil crusts of the Colorado Plateau: their diversity and relative contribution to microbial biomass. **Environmental Microbiology**, v. 1, p.56–67, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 1.ed. Campinas: UNICAMP, 1995, 302.

BASCOM-SLACK, C; MA, C; MORRE, E; BABBS, B; FENN, K; GREENE, J; HANN, B; KEEHNER, J; SWIFT, KELLEY; KEMBAIYAN, V; LEE, S; LI, P; LIGHT, D; LIN, E; SCHORN, M; VEKHTER, D; BOULANGER, L; HESS, W; VARGAS, P; STROBEL, G; STROBEL, S. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. **Microbial ecology**, v. 58, p. 374-83, 2009.

BLACKWELL, P. Management of water repellency in Australia and risks associated with preferential flow, pesticide concentration and leaching. **Journal of Hydrology**, v. 23, p.384–395, 2000.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, p. 426-38, 2011.

BODOUR,A; MAIER, M; Application of drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, 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.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1-8, 2011.

BOYETEE,C;WALKER, H; ABBAS, H. Biological control of kudzu (*Pueraria lobata*); with an isolate of *Myrothecium verrucaria*. **Biocontrol Science and Technology**, v.12, p.75–82, 2002.

CADETE, R; MELO, M; DUSSAÍN, K; RODRIGUES, R; SILVA, S; ZILLI,J; VITAL, M; GOMES, F; LACHANCE, M; ROSA, C. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PloS one**, v. 7, p. 135-143, 2012.

CAMARGO -DE-MORAIS, M; RAMOS, S; PIMENTEL, M; MORAIS JR, M; LIMA FILHO, J. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 191-194, 2003.

CAMEOTRA, S; MAKKAR, R. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004

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

CARVALHO , L; Produção de lipases e biossurfactantes por bactérias isoladas de um solo contaminado com óleo vegetal residual.2012. 138p.**Dissertação** (Mestrado em biologia celular e molecular)- Pós-graduação em Biologia Celular e molecular, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

CASTIGLIONI, G; BERTOLINI,T; COSTA, J. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química nova**, v. 32, p. 292-295, 2009

CLARK, F. Agar-plate method for total microbial count. In: C.A. BLACK; D. EVANS; J.L. WHITE; L.E. ENSMINGER; F.E. CLARK & R.C. DINAUER (eds.). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, p. 1460-1466, New York, 1965.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, p. 1229-34, 2008

DASTGHEIB,M; AMOOZEGAR, E; ELAHI, E; ASAD,E; BANAT, E. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnology letters**, v. 30, p. 263-270, 2008

DELABONA, P; FARINAS, C; SILVA, M; AZZONI, S; PRADELLA, J. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource technology**, v. 107, p. 517-21, 2012

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology Reviews**, v. 61, 1997.

DELEU M, PAQUOT M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactant. **comptes rendus chimie** , v. 7, p.641–646, 2004

FRANZETTI, A; CAREDDA, P; LA COLA, P; TAMBURINI, E; PAPACCHINI, M ; BESTETTI, G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v. 75, p. 801–807, 2009.

FONTES, G; AMARAL, P; COELHO, M. Produção de biossurfactante por levedura. **Quimica nova**, v. 31, p. 2091-2099, 2008.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 69-72, 2006.

GEORGIU, G; LINS, S; SHARMA, M. Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GHARAREI- FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutic industry. **American Journal of drug discovery and development**, v.15, p. 304-309, 2010.

HABBA, E BRESCO, O; FEVER, C; MARQUES, A; BUSQUETS, M; MANRESA, A. Isolation of lipase-screening bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 40-44, 2000.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological research**, v. 113, p. 165-172, 2009.

HIRATA, Y; RYU, M; ODA, Y; IGARASHI, K; NAGATSUKA, A; FURUTA, T; SUGIURA, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 108, p. 142-146, 2009

JARVIS, F; JOHNSON, M. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal american chemical society**, v. 71, p. 4121-4126, 1949.

JUWARKAR AA, NAIR A, DUBEY KV, SINGH SK, DEVOTTA S. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. **Chemosphere**, v. 68:1996–2002, 2007.

KANLAYAVATTANAKUL, M; LOURITH, N Lipopeptides in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v.32, p.1–8, 2010

KIRAN, G.; HEMA, T; GANDHIMATHIA, R; SELVINA, J; THOMAS, T; RAVJI, T, NATARAJASEENIVASANA, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and surfaces. B: Biointerfaces**, v. 73, p. 250-256, 2009

KITAMOTO, T; ISODA, H; NAKAHARA, T. Functions potential applications of glycolipid biosurfactants- from energy saving materials gene delivery carries. **Journal of Biociencia and Bioengineering**, v. 94, p.187-201, 2002.

KITAMOTO, D.MORITA, T; FUKOUKA, T; KONISHI, M; IMURA, T. Current Opinion in Colloid & Interface Science Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14,p. 315-328, 2009

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure & applied Chemistry**, v. 64, p. 1731-1737, 1992.

LANG, S; WULLBRADT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied. Microbiology. Biotechnology**. v.51, p. 22–32, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current opinion in colloid & interface science**, v.7, p.12-20, 2002.

LACAZ C, PORTO E, MARTINS J. Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 2001.

LOURITH, N; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 255–261, 2009.

LUNA-VELASCO, M; ESPARZA-GARCIA, F; OLIVIA, R; VILLANUEVA, O; VASQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process Biochemistry**, v. 42, p.310-314, 2007.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58,p. 428-34, 2002.

MARTINS, V; KALIL, S; COSTA, J. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Quimica nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MAIER,R; SOBERON-CHAVEZ, G. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied. Microbiology. Biotechnology.** v. 54, p. 625–633, 2000.

MIRELES, J; TOGUCHI, A; HARSHEI, M. Harshey Salmonella enterica Serovar Typhimurium Biofilm Formation Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Swarming Mutants with Altered. **Journal of bacteriology** v. 83, p. 5848-5884, 2001.

MITTENBÜHLER, K; LOLEIT, M; BALER, W; FISCHER, B; SEDELMEIER,E; JUNG, G; WINKELMANN, G; JACOBI, C; WECKESSER, J; ERHARD, M; HOFMANN, A; BESSLER, W; HOFFMANN, P. Drug specific antibodies: T-cell epitope-lipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. **International journal of immunopharmacology**, v. 19, p. 277-87,1997.

MORE, T; YAN, S; TYAGI, R; SURAMPALLI, R. Bioresource Technology Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7691-7700, 2010.

MONTEIRO, A; BONFIM, M; DOMINGUES, V; CORRÊA JR., A; SIQUEIRA, E; ZANI, C; SANTOS, V. Identification and characterication of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Biousource Technology**, v.101, p. 5186-5193, 2010.

MONTANARI, D. AND GUGLIELMO, M. Cosmetic Composition for the Treatment and/or Prevention of Skin Stretch Marks. World patent 2008/080443. 2008. Labo Cosprophar Ag, Basel.

MUKHERJEE,S; DAS, P; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnology**, v. 24, p.509–515, 2006

MULLIGAN, C. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 372–378, 2009.

MURIEL, J; BRUQUEZ, J; ALFAS, J; JIMENEZ-SANCHES, A. Production of biosurfactants by *Cladbspotium resinae*.**Biotechnology letters**, v. 18, p. 235-240, 1996.

- MUTALIK, S; VAIDJA, B; JOSHI,R; DSAI, K; NENE, S. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. **Bioresource Technology**, v. 99, p.7875–7880, 2008.
- NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W. D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, p. 1865-1875, 2012.
- NGUYEN T; YOUSSEF N; MCINERNEY M; SABATINI D. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, v. 42, p. 1735–43, 2008.
- NITSCHKEA, M; COSTA, S. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252- 259, 2007.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- PACWA-PŁOCINICZAK, M, PLAZA, G; PIOTROWSKA-SEGET, Z; CAMEOTRA, SWARANJIT. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12,p. 633-54, 2011.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DŁUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 287-94, 18 jan. 2002.
- PRADHAN, N; SUKLA, L. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 850-854, 2005.
- PETROVIC, M; BARCELO, D. Analysis and fate of surfactants in sludge and sludge-amended soil. **Trends Analyt Chem**, v.23, p.10–11, 2004.
- PRATA, J; LEMOS, J; BARROS, C. Produção de tensoativo por *Penicillium corulophilum*. In: XVI jornada científica- CETEM, Rio de Janeiro, Anais da XVI Jornada de Iniciação Científica, Rio de Janeiro, 2008, 5p, p 257-262.
- PANATHU, K; RAHMAN, M; GAKPE, E. Production, characterization and application os biosurfactants, review. **Biotechnology**, v. 7, p. 360-370, 2008.

PINTO, M; MARTINS, G; COSTA, J. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2008.

PIRETTI, M; PAGLIUCA, G; VASINA, M. Transmethylation of neutral and polar lipids with NaBH₄ in the presence of NaOH. **Chemistry Physics of Lipids**, v. 47, p. 149–153, 1988.

PIRRÔLO, M. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. 73p. **Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas)- Pós-graduação em ciências biológicas**. Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

RAZA, Z; KHALID, K; BANAT, I; Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. **Journal of Environmental Science and Health, Part A** v. 44, p.1367–1373, 2009
ROCHA, M; SOUZA, M; BENEDICTO, S; BEZERRA, M; MACEDO, G; PINTO, G; GONÇALVES, L. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* grown on cashew apple juice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137, p.185–194, 2007.

RODRIGUES, L; BANAT, I; TEIXEIRA, J; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potencial applications in medicine. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, p. 609-618, 2006

RODRIGUES, L. Seleção de fungos produtores de lipase a partir de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental. 2011. 195 f. **Tese** (Doutorado em engenharia ambiental) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

ROSENBERG, E. ZUCKERBERG, A, RUBINOVITZ, C; GUTNICK, D. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : isolation and emulsifying properties .**Applied and environmental microbiology**, v. 37, p. 402-408, 1979.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, p. 154-62, 1999.

ROSTAS, M; BLASSMAN, K; Insects had it first: surfactants as a defense against predators **Proceedings of the Royal Society B**, v.276, p.633-638, 2009

SACHDEV, D; CAMEOTRA, S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97 p.1005–1016, 2013.

SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M. N. An investigation for potential development on biosurfactants, **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, p. 111-117, 2009.

SIVAPATHASEKARAN, C; MUKHERJEE,S; SAMANTA,R; SEN,R. Highperformance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.395, p. 845–854, 2010.

SARUBBO, L; LUNA,J; TAKAKI, G. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v 9, 2006.

SCOT, M; JONES, M; The biodegradation of surfactants in the environmental. **Biochimica at Biophysica acta**, v. 1508, p. 235-251, 2000.

OLIVEIRA,M. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta daninha**, v.26,p. 539-548, 2008.

SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 99-111, 2006

SCHAECHTER,M; INGRAHAM, J.L; NEIDHARDT, L.C. Microbio, uma visao geral, 1.ed: artmed, 2010, 528 p.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. **Progress in Energy & Combustion Science**, V. 34, P. 714–724, 2008.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in biotechnology**, v. 22, p. 142-146, 2004.

HUMBERTO B.; SOBRINHO, A; RAQUEL D; RUFINO, B; JULIANA, M; LUNA, B; ALEXANDRA , A; SALGUEIRO, B; GALBA, M; CAMPOS-TAKAKIB, E; LÚCIA, F; LEITE, E; LEONIE, A; SARUBBO, B. Utilization of two agroindustrial by-products for

the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 912-917, 2008.

SOUZA, A; SOUZA, A; ASTOLFI FILHO, S; BELÉM PINHEIRO, M; SARQUIS, M; PEREIRA, J. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 185 - 195, 2004.

SOUZA, H; OLIVEIRA, L; ANDRADE, J. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 116-124, 2008.

TAKENAKA, S; TONOKI, T; TAIRA, K. MURAKAMI, S; AOKI. Adaptation of *Pseudomonas* sp. Strain 7-6 to Quaternary Ammonium Compounds and Their Degradation via Dual Pathways. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, p. 1797–1802, 2007.

TEIXEIRA, M; MARTINS, M; SILVA, J; KIRSCH, L; FERNANDES, O; CARNEIRO, A; CONTI, R; DURAN, N. Amazonian Biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*- characterization, antibacterial, activities, and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v 13, p. 2230-7303, 2012.

THAVASI, R; JAYALAKSHMI, S; BALASUBRAMANIAN, T; BANAT, I. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, P.686–691, 2007.

THAVASI, R; JAYALAKSHMI, E; BALASUBRAMANIAN, E; IBRAHIM, E; BANAT, I. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 917-925, 2008.

-TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Presence of Synthetic Surfactants. v. 60, n. 1, 1994.

THIEME, M; LEHNER, B; ABELL, R; HAMILTON, S; KELLDORFER, J; POWELL, G; RIVEROS, J. Freshwater conservation planning in data-poor areas: an example from a remote basin (Madre de Dios river, Peru and Bolivia). **Biological Conservation**, v. 135, p. 484-501, 2007.

TOOME, M; AIME, M. Kingdom Fungi In: EOLSS. Biological Science Fundamentals and Systematics, 1. ed. South Africa, 2011. v. 3, 246 p.

YIN H, QIANG J, JIA Y, YE J, PENG H, QIN H, ZHANG N, HE B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 from oil-containing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 302–308, 2008.

YONEDA, T; FURUYA, K.. Oily Thickened Gel-Like Composition, Emulsified Composition using the Same and Method for Preparing the Emulsified Composition. Japan patent 176211. 2003. Tokyo. Showa Denko K.K.