



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL -
BIONORTE**

**BIOSURFACTANTES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
Gustavia cf. hexapetala (Alb.) Sm. (Lecythidaceae) NA AMAZÔNIA,
CONTRA PATÓGENOS DA CAVIDADE ORAL**

FRANCISCA DA SILVA FERREIRA

MANAUS - AM

2020

FRANCISCA DA SILVA FERREIRA

**BIOSSURFACTANTES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
Gustavia cf. hexapetala (Alb.) Sm. (Lecythidaceae) NA AMAZÔNIA,
CONTRA PATÓGENOS DA CAVIDADE ORAL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito final para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

Manaus- AM

2020

Ficha Catalográfica

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

F383b Ferreira, Francisca da Silva
Biossurfactantes de fungos endofíticos isolados de *Gustavia* cf. *hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae) na Amazônia, contra patógenos da cavidade oral. / Francisca da Silva Ferreira . 2020
140 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira
Coorientadora: Antônia Queiroz Lima de Souza
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bioativos. 2. Fungos endofíticos. 3. Microbiota oral. 4. Planta medicinal. 5. Amazônia. I. Pereira, José Odair. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FRANCISCA DA SILVA FERREIRA

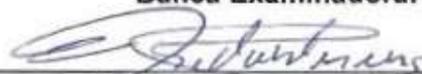
**"BIOSURFACTANTES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
Gustavia cf. hexapetala. NA AMAZÔNIA, COM AÇÃO ANTIMICROBIANA
CONTRA PATÓGENOS DA CAVIDADE ORAL".**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal, na Universidade do Estado do
Amazonas, como requisito para obtenção do
título de Doutora em Biotecnologia.

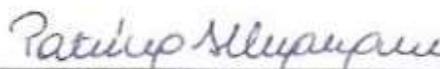
Orientador (a): Prof. Dr. José Odair Pereira

Coorientador (a): Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

Banca Examinadora:



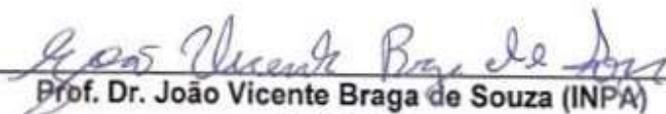
Prof. Dr. José Odair Pereira (UFAM)
Presidente da banca



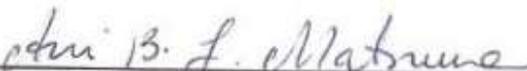
Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque (UEA)
Membro



Profa. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde (UFAM)
Membro



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza (INPA)
Membro



Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura (FIOCRUZ)
Membro

MANAUS-AMAZONAS

Fevereiro/2020

DEDICATÓRIA

Ao meu amado pai (In memoriam)

Ao meu amado filho Bruno (In memoriam)

A você mãe, razão e motivo para eu chegar até aqui. Você sempre acreditou em mim. Por você eu não desisti. Lutei até o fim. Esse título também seria seu. Obrigada por me incentivar a seguir sempre em frente e nunca parar os meus estudos.

Te amarei para sempre, QUERIDA MÃE (In memoriam)

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, minha saúde, por ter estado comigo nos momentos mais difíceis dessa caminhada e por nunca ter me desamparado, pelas dificuldades superadas e pelas bênçãos concedidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Odair Pereira, por sempre auxiliar em minhas necessidades do laboratório e sanar minhas dúvidas sempre que precisei. Obrigada pela confiança depositada e por ser um ser humano e profissional excepcional.

À minha coorientadora, pela amizade construída nesses anos de pesquisa, pelas orientações e correções e enorme colaboração na construção de minha trajetória na pesquisa. Obrigada pelo espaço aberto, pelo acolhimento no seu Grupo de Pesquisas do LABMICRA. Você representa muito a todos nós que passamos parte de nossas vidas dedicadas a novas descobertas no mundo dos microrganismos.

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Cleinaldo de Almeida Costa pela liberação durante boa parte da pesquisa, sem a qual seria humanamente impossível realizar e concluir.

Aos professores da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal e a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG-BIONORTE).

Ao coordenador estadual do PPG Prof. Dr. Jair Max Fortunato Maia, pelo empenho e dedicação frente ao Curso no Estado do Amazonas.

À Escola Normal Superior – ENS/UEA, na pessoa de sua Gestora Prof. Dra. Vanúbia Moncayo e Coordenador de Qualidade Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Junior por todo o apoio recebido na liberação para realizar o curso.

Ao meu querido esposo, Amílcar da Silva Ferreira em nome de toda a **família Ferreira** que sempre me deram força e incentivo, por todo o amor, carinho e compreensão nos dias e noites que precisei me ausentar em casa e de sua companhia. Você foi meu suporte para continuar firme nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Aos meus filhos Katy, Karen e Renan, meu genro Wilton e netas amadas Sofia e Julia. Foi também por vocês que são minhas fontes de inspiração e para quem eu quero servir de exemplo. Estudar sempre! Isso faz toda a diferença.

Aos queridos sobrinhos Victor Luiz, Fagner Ferreira, Lúcia Cristina Ferreira e meu querido filho Renan Ferreira pelo apoio e contribuição nas atividades e realização dos experimentos nos laboratórios. Vocês foram maravilhosos.

À minha cunhada Prof. MSc. Maria Auxiliadora Ferreira da Costa por sua valorosa contribuição na correção final do texto da Tese. Muito obrigada Cilha!

A minha família, irmãs, irmãos sobrinhos, sobrinhas que sempre me apoiaram e incentivaram para que eu chegasse com sucesso ao fim dessa caminhada.

À querida secretária e amiga Cleidimar Medeiros por sempre me apoiar e ajudar nas tarefas domésticas para que eu pudesse me dedicar aos trabalhos da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte L. de Souza, pelos ensinamentos, amizade e convívio.

Aos colegas do Curso de Ciências Biológicas, na pessoa da Coordenadora Dra. Rosilene da Silva Ferreira, pelo apoio recebido para concluir com êxito o curso de doutorado.

À Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas pelo uso dos laboratórios e a todos que auxiliaram na execução dos procedimentos relacionados ao trabalho.

A Central de Análises Químicas da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pela liberação dos laboratórios e equipamentos e a todos que auxiliaram na realização de parte da pesquisa em especial ao colega Dr. Messe Elmer Silva pela colaboração nas análises e na troca de conhecimento.

Aos colegas do Laboratório de Bioensaios e Microbiologia (LaBMicrA) da Central Analítica da UFAM, Marta, Sarah Rachel, Ketlen, Debora, Kamila, Adriana, Paulo Henrique, Rachid, Gabriel, pela amizade, companheirismo, e pelo auxílio ao longo desses anos.

Aos colegas e professores do Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterápicos na Odontologia (LABFITO – FAO-UFAM), pelo uso do laboratório, dos equipamentos e materiais e a todos que auxiliaram na execução dos procedimentos relacionados ao trabalho.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos, Mila, Thalita e Beatriz pela amizade, ajuda e companheirismo.

Ao laboratório de Purificação de Biomoléculas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB -UFAM), funcionários e professores do Bloco G – que sempre me apoiaram no desenvolvimento da pesquisa. Muito Obrigada, Júlio, Paulo e Dina.

Às queridas irmãs do Círculo de Oração da Igreja Assembleia de Deus Tradicional pelas orações em intercessão por cada vitória alcançada nessa caminhada.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho

Agradeço de coração

EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Agradecimento Especial

À minha coorientadora Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza, pela amizade, carinho, respeito e companheirismo. Pela paciência e dedicação no ato de ensinar e principalmente pela confiança dispensada. Obrigada pela compreensão e ajuda nos momentos difíceis que passei durante o curso. Obrigada por toda ajuda no meu crescimento profissional e intelectual. Serei eternamente grata.

À minha querida amiga Dra. Ieda Hortêncio Batista, pela amizade incondicional, respeito e confiança. Obrigada por todas as vezes que esteve comigo quando precisei de ajuda. Você esteve sempre por perto me incentivando, dando forças e torcendo por mim. Obrigada por me receber tão bem em sua casa quando precisei de um espaço tranquilo para estudar. Obrigada por ser uma grande incentivadora para a realização desse grande sonho.

FERREIRA, Francisca da Silva. **BIOSSURFACTANTES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Gustavia cf. hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae) NA AMAZÔNIA, CONTRA PATÓGENOS DA CAVIDADE ORAL.** 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia – PPG-BIONORTE) - Universidade Federal do Amazonas, 2020.

RESUMO

Os biossurfactantes (BS) são moléculas anfifílicas que por suas características químicas têm apresentado grande interesse industrial. Há evidências de aplicação na área odontológica por apresentarem ação antimicrobiana contra patógenos de interesse. Nesse aspecto o presente estudo avaliou a produção de BS em linhagens de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapetala*, na cidade de Manaus, com ação antimicrobiana contra patógenos da cavidade oral. Foi realizado isolamento de fungos endofíticos de galhos e folhas, purificação, conservação e caracterização morfológica dos isolados. Realizou-se uma triagem para selecionar fungos produtores de BS cultivados em meio líquido (BDL e mineral) suplementados com óleo de soja. As condições de cultivo foram: pH 7,0, temperatura de 28°C à 170rpm, por 10 dias. A produção de BS foi avaliada por meio do índice de emulsificação (E_{24}) e da Tensão Superficial (TS) do meio de cultivo. Foi realizado um novo cultivo em escala ampliada para a extração dos BS. Com os BS brutos foi possível determinar a CMC, testes antimicrobianos e perfil químico. Os fungos selecionados foram identificados por meio de técnicas moleculares. Foram isolados 399 fungos e uma levedura negra de *G. Cf. hexapétala*. A frequência de isolamento foi 74,6% a partir de galhos e 49,6% a partir da folha. Reagrupou-se em 20 morfogrupos com oito gêneros identificados: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Xylaria*, *Diaphorte* e os demais desconhecidos (*Micelia sterilia*). Foram conservados 187 fungos endofíticos, avaliados 24 e destes, nove se destacaram como produtores de BS, sendo cinco selecionados, tais quais: três isolados de galho identificados como *Fusarium decemcellulare* (FF17), *Diaporthe* sp. (FF36) e *Fusarium solani* (FF45); dois isolados de folha, identificados como *Fusarium solani* (FF51) e *Coletotrichum vietnamensi* (FF33). Os melhores resultados do E_{24} foram: *C. vietnamensi* (FF33) com 33,99%, *Diaporthe* sp. (FF36) com 31,97%, e *F. solani* (FF51) com 26,70%. Houve redução da TS abaixo de 35,0 mN/m em 09 cepas com destaque para *F. solani* (FF51) com 28,7 e 30,1 mN/m; *F. solani* (FF45) com 31,5 e 30,1 mN/m; *C. vietnamensi* (FF33) com 32,4 e 31,8 mN/m; *Diaporthe* sp. (FF36) com 32,7 e 30,9 mN/m cultivados em meio BDL e mineral respectivamente. A TS do meio mineral reduziu de 61,0 mN/m para 30,9 mN/m (49,3% de redução) para o fungo *Diaporthe* sp. (FF36), e para os fungos *F. solani* (FF45 e FF51) com 30,1 mN/m (50,6% de redução). O maior rendimento da produção de BS foi de 0,66 g/L, obtido com o extrato do fungo *C. vietnamensi* (FF33). Este endofófito produziu um BS com a menor CMC (1,08 mg/mL) reduzindo a TS da água ultrapura de 70,6 para 31,94 mN/m (54,8% de redução). Nos testes antimicrobianos a CIM do extrato de *F. decemcellulare* (FF17) contra *Streptococcus mutans* (ATCC25175) foi de 0,4 mg/mL e a CBM foi 0,5 mg/mL; para *Lactobacillus casei* (ATCC7469), a CIM foi 1,5 mg/mL, e a CBM foi 1,75 mg/mL. Os bioativos produzidos por *Diaporthe* sp. (FF36) apresentaram CIM de 2,4 mg/mL contra *S. mutans*. A CIM do extrato de micélio de *F. solani* (FF51) para o *L. casei* foi 1,8 mg/mL. O extrato de micélio de *F. solani* (FF45) apresentou ação bacteriostática para *L. casei* e fungistática para *C. albicans* (CIM de 2,1 mg/mL e 4,2 mg/mL, respectivamente). Os resultados indicam a importância de pesquisas que visam a prospecção de fungos endofíticos com potencial para a produção de BS e outros bioativos de interesse biotecnológicos, contra patógenos da cavidade oral, permitindo inserir o uso de moléculas naturais para o controle de doenças bucais.

Palavras-chave: bioativos, fungos endofíticos, microbiota oral, planta medicinal, Amazônia

FERREIRA, Francisca da Silva. **BIOSURFACTANTS OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Gustavia cf. hexapetala* (Alb.) Sm. (Lecythidaceae) IN THE AMAZON REGION, AGAINST ORAL CAVITY PATHOGENS.** 2020. Thesis (PhD in Biotechnology - PPG-BIONORTE) - Federal University of Amazonas, 2020.

ABSTRACT

Biosurfactants (BS) are amphiphilic molecules which, due to their chemical characteristics, have been of great industrial interest. There is evidence of application in dentistry due to their antimicrobial action against pathogens of interest. Thus, this study evaluated the production of BS in strains of endophytic fungi isolated from *Gustavia cf. hexapetala*, in the city of Manaus, with antimicrobial action against pathogens in the oral cavity. The isolation of endophytic fungi from branches and leaves, purification, conservation and morphological characterization of the isolates were carried out. Screening was performed to select BS-producing fungi grown in liquid (BDL and mineral) supplemented with soybean oil. The culture conditions were: pH 7.0, temperature of 28 °C at 170 rpm, for 10 days. BS production was evaluated using the emulsification index (E₂₄) and the Surface Tension (ST) of the culture medium. A new culture was made on an expanded scale for the extraction of BS. With the raw BS, it was possible to determine the CMC, antimicrobial tests and chemical profile. The selected fungi were identified using molecular techniques. Three hundred ninety-nine (399) fungi and a black yeast of *G. cf. hexapetala* were isolated. The isolation frequency was 74.6% from branches and 49.6% from leaves. They were grouped into 20 morphogroups with eight identified genera: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Xylaria*, *Diaporthe* and the others, unknown (*Micelia sterilia*). One hundred eighty-seven (187) endophytic fungi were conserved, of which 24 were evaluated, and of these, nine stood out as BS producers, and five were selected: three branch isolates were identified as *Fusarium decemcellulare* (FF17), *Diaporthe* sp. (FF36) and *Fusarium solani* (FF45); two leaf isolates were identified as *Fusarium solani* (FF51) and *Colletotrichum vietnamensi* (FF33). The best E₂₄ results were: *C. vietnamensi* (FF33) with 33.99%, *Diaporthe* sp. (FF36) with 31.97%, and *F. solani* (FF51) with 26.70%. There was ST reduction below 35.0 mN/m in 09 strains, with emphasis on *F. solani* (FF51) with 28.7 and 30.1 mN/m; *F. solani* (FF45) with 31.5 and 30.1 mN / m; *C. vietnamensi* (FF33) with 32.4 and 31.8 mN/m; *Diaporthe* sp. (FF36) with 32.7 and 30.9 mN/m grown in BDL and mineral medium, respectively. The ST of the mineral medium decreased from 61.0 mN/m to 30.9 mN/m (49.3% reduction) for fungus *Diaporthe* sp. (FF36), and for fungi *F. solani* (FF45 and FF51) with 30.1 mN/m (50.6% reduction). The highest yield of BS production was 0.66 g/L, obtained from the extract of fungus *C. vietnamensi* (FF33). This endophyte produced a BS with the lowest CMC (1.08 mg/mL) reducing the ST of ultrapure water from 70.6 to 31.94 mN/m (54.8% reduction). In the antimicrobial tests, the MIC of *F. decemcellulare* (FF17) extract against *Streptococcus mutans* (ATCC25175) was 0.4 mg/mL and the MBC was 0.5 mg/mL; for *Lactobacillus casei* (ATCC7469), the MIC was 1.5 mg/ml, and the MBC was 1.75 mg/ml. The bioactives produced by *Diaporthe* sp. (FF36) showed an MIC of 2.4 mg/mL against *S. mutans*. The MIC of *F. solani* mycelium extract (FF51) for *L. casei* was 1.8 mg/mL. The mycelium extract of *F. solani* (FF45) showed bacteriostatic action for *L. casei* and fungistatic for *C. albicans* (MIC of 2.1 mg/mL and 4.2 mg/mL, respectively). The results indicate the importance of research aimed at the prospection of endophytic fungi with a potential to produce BS and other bioactives of biotechnological interest, against pathogens in the oral cavity, allowing the use of natural molecules to control oral diseases.

Keywords: bioactives, endophytic fungi, oral microbiota, medicinal plant, Amazon.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOET - Acetato de Etila.

B.O.D. - Demanda Biológica de Oxigênio.

BDA - Ágar batata dextrose.

BDA+ L - Batata, Dextrose + extrato de Levedura.

BDL - Batata Dextrose Levedura.

BE - Bioemulsificante.

BHI - Brain Heart Infusion.

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio.

BS - Biosurfactante.

CBM- Concentração Bactericida Mínima.

CIM - Concentração Inibitória Mínima.

CMC - Concentração Micelar Crítica.

CN - Controle Negativo.

CP - |Controle Positivo.

Da - Dalton.

DMSO -Dimetilsulfóxido.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico.

E₂₄ - Índice de Emulsificação após 24 horas.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

ESI - Eletronspray ionization.

EST - Escola Superior de Tecnologia.

FAO - Faculdade de Odontologia.

ITS - Internal Transcribed Spacer.

KH₂PO₄ - Fosfato de monopotássio.

LABCEM /UFAM -Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas.

LABFITO - Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterapia na Odontologia.

LABMICRA - Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia.

MeOH - Metanol.

MgSO₄ – Sulfato de Magnésio

Na₂HPO₄- fosfato dissodico.

NCBI -National Center for Biotechnology Information.

PEG - Polietilenoglicol.

pH - Potencial hidrogeniônico.

rpm - Rotações por minuto.

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio.

SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.

TS - Tensão Superficial.

UEA - Universidade do Estado do Amazonas.

UFAM - Universidade Federal do Amazonas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema representando os tipos de surfactantes: catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C), e não iônicos (D).....22
- Figura 2:** Representação esquemática (autoria própria). **A** - Gota de água em uma superfície hidrofóbica. E em **B** – Gota de água em uma superfície hidrofóbica, contendo moléculas de surfactante. A adição do surfactante, aumentou a área de contato da água com a superfície hidrofóbica.....24
- Figura 3:** Comportamento de moléculas de biossurfactantes em diferentes meios.....24
- Figura 4:** Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (CMC)25
- Figura 5:** Distribuição geográfica de *Gustavia* spp. De Vera Cruz no México ao Brasil Meridional.....49
- Figura 6:** Aspectos morfológicos de folhas de *Gustavia hexapetala* (Lecythidaceae).....50
- Figura 7:** Localização geográfica do local de coleta do material botânico (Figura 7A); Vegetal onde foi realizada a coleta (Figura 7B).53
- Figura 8:** Lavagem de folhas e galhos após coleta (Figura 8 A). Acondicionamento do material botânico pós lavagem, para serem transportados ao local de processamento (Figura 8 B).....54
- Figura 9:** Fluxograma da Metodologia de isolamento dos microrganismos endofíticos de *Gustavia* cf. *hexapetala*.55
- Figura 10:** Antissepsia e Inoculação (folhas e galhos) nas placas de Petri.....55
- Figura 11:** Cultivo em meio líquido e filtração dos caldos metabólitos dos fungos endofíticos..... 59
- Figura 12:** Medida da Tensão Superficial no tensiômetro (A), que utiliza o método do anel (B) (Du Noüy).....61
- Figura 13:** Fluxograma para obtenção dos extratos fúngicos: extratos do micélio e do caldo de cultivo.65
- Figura 14:** Bioensaio em microplaca: A: adição do reagente revelador resazurina nos poços e B: leitura da placa após o tempo de ação do corante resazurina (4 h).68

Figura 15: Representação esquemática da distribuição em microplaca dos extratos testes.....	70
Figura 16: Diferentes fungos (morfogrupos) isolados de fragmentos de folhas e galhos de <i>G. cf. hexapetala</i>	69
Figura 17: Purificação dos fungos endofíticos em diferentes meios. 17A: meio aveia e 17B meio BDA+L, em temperatura de 24 °C, por 5 dias.....	73
Figura 18: Total de fungos endofíticos isolados de <i>G. cf. hexapétala</i> , a partir de fragmentos de folhas e galhos nos meios Aveia, BDA+L e ISP2.....	75
Figura 19: Fungos endofíticos isolados de <i>G. cf. hexapetala</i> em diferentes meios de cultivo e diferentes combinações de antibióticos.....	76
Figura 20: Diversidade de fungos endofíticos isolados de <i>G. cf. hexapetala</i> , identificados morfolologicamente	77
Figura 21: Aspectos macro e micromorfológicos de colônias de fungos endofíticos isolados de <i>G. cf. hexapetala</i> representando grupos identificados a nível de gênero e grupos não identificados.....	75
Figura 22: Teste de Emulsificação dos caldos de cultivo de fungos endofíticos de <i>G. cf. hexapetala</i>	78
Figura 23 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo dos isolados A- <i>Fusarium decemcellulare</i> (FF17); B - <i>Fusarium solani</i> (FF51); C - <i>Diaporthe</i> sp. (FF36); D - <i>Fusarium solani</i> (FF45).....	87
Figura 24: Caracterização macro e micromorfológica dos fungos endofíticos de <i>G. cf. hexapétala</i> selecionados.....	88
Figura 25: Variação da tensão superficial da água ultrapura em função da concentração dos biossurfactantes nos extratos brutos: A extrato bruto (L5) de <i>F. Decemcellulare</i> (FF17); B - extrato bruto (L.2.1- Espuma) de <i>F. solani</i> (FF45); C - extrato bruto (L1.1- Espuma) de <i>F. solani</i> (FF51); D - extrato bruto (L4) de <i>C. vietnamensi</i> (FF33) em meio mineral acrescido de óleo de soja, para determinação da CMC.	92
Figura 26: A: Microplaca de determinação da CIM de extrato do micélio do fungo <i>F. solani</i> (FF51). B: Placas semeadas com conteúdo dos poços da microplaca de diluição para comprovação da CBM na concentração inicial de 4,8 mg/mL para <i>L. casei</i>	97

Figura 27: **A-** Placa de determinação da CIM de extrato M2 do fungo endofítico *F. solani* (FF45) para *L. casei*. **B-** Placa semeada com conteúdo dos poços de diluição para comprovação da CBM.....98

Figura 28: Determinação da CIM de extrato de micélio (M2) do fungo endofítico *F. solani* (FF45) contra *C. albicans*. Placas semeadas com conteúdo dos poços da placa de microdiluição para comprovação da CBM.98

Figura 29: (A) Espectro de massa de *Fusarium decencellulare* (FF17); (B) Espectro de massa de *Diaporthe* sp. (FF-36); (C) Espectro de massa de *Colletotrichum vietnamensi* (FF33).....104

Figura 30: **A** - Estrutura do sofrorolipídio ácido de cadeia acídica tridecenoica. **B** - Flavonoide aristolactama.....105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos surfactantes de acordo com o grupo polar.....	23
Tabela 2: Classes de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores.....	29
Tabela 3: Exemplos de microrganismos produtores de biossurfactantes com aplicação na área da saúde.....	31
Tabela 4: Fungos produtores de biossurfactantes e as respectivas espécies produtoras.....	37
Tabela 5: Uso de biossurfactantes na área odontológica.....	47
Tabela 6: Substâncias isoladas de extratos de fungos endofíticos isolados de <i>G. elíptica</i>	51
Tabela 7: Condições de cultivo para o isolamento dos endofíticos de <i>Gustavia</i> cf. <i>hexapétala</i>	56
Tabela 8: Condições do experimento em Placa de microdiluição (volumes em μL)	69
Tabela 9: Influência na temperatura de isolamento de fungos endofíticos de diferentes tecidos de <i>G. cf. hexapétala</i>	73
Tabela 10: Total de fungos isolados de <i>G. cf. hexapétala</i> e frequência de isolamento.....	74
Tabela 11: Índice de Emulsificação (E_{24}) do meio de cultivo de fungos endofíticos de <i>G. cf. hexapétala</i> em meio mineral acrescido com óleo de soja como fonte de carbono.....	80
Tabela 12: Tensão Superficial de caldos do metabolismo de fungos endofíticos cultivados em Meio Mineral acrescido de óleo de soja (0,5g/L) como fonte de carbono.....	82
Tabela 13: Tensão Superficial de caldos do metabolismo de fungos endofíticos cultivados em Meio BDL acrescido de óleo de soja (0,5g/L) como fonte de carbono adicional.....	83
Tabela 14: Comparação da Tensão Superficial (TS) em extratos de fungos cultivados em diferentes meios.....	84
Tabela 15 - Índice de emulsificação (E_{24}) e Tensão Superficial (TS) do meio de cultivo dos fungos endofíticos isolados de <i>G. cf. hexapétala</i> e selecionados para as etapas seguintes da pesquisa.....	86
Tabela 16: Identificação molecular dos fungos endofíticos de <i>G. cf. hexapétala</i>	89

Tabela 17: Resultado de rendimento da extração dos extratos líquidos contendo biossurfactantes e dos extratos de micélios, produzidos pelos fungos.....	91
Tabela 18: Triagem dos extratos de fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> cf. <i>hexapétala</i> com atividade antimicrobiana contra patógenos da microbiota oral.....	95
Tabela 19: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	96
Tabela 20: Atividades antimicrobianas dos extratos dos fungos endofíticos de <i>G.</i> cf. <i>hexapetala</i> testados contra <i>S. mutans</i> , <i>L. casei</i> e <i>C. albicans</i>	99
Tabela 21: Íons majoritários presentes no espectro dos extratos analisados por espectrometria de massas de fungos endofíticos.....	104

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 SURFACTANTES.....	22
2.2 BIOSSURFACTANTES.....	26
2.2.1 Biossurfactantes: Aplicações biotecnológicas	29
2.2.2 Biossurfactantes: Vantagens e dificuldades de produção	33
2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES.....	35
2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL VALOR BIOTECNOLÓGICO.....	38
2.5 BIOSSURFACTANTES COMO ANTIMICROBIANOS	40
2.6 BIOSSURFACTANTES COMO POTENCIAL NA ODONTOLOGIA.....	41
2.6.1 Microbiota Oral.....	42
2.6.2. Controle do biofilme.....	44
2.7 A PLANTA HOSPEDEIRA - <i>Gustavia</i> cf. <i>hexapetala</i> (Lecythidaceae)	48
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DmE <i>Gustavia</i> cf. <i>hexapetala</i>	53
4.1.1 Coleta do material botânico	53
4.1.2 Desinfecção do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos de <i>G. cf. hexapetala</i>	54
4.1.3 Purificação, identificação e preservação dos endófitos isolados de <i>G. cf. hexapetala</i>	57
4.1.4 Cálculo da frequência de isolamento	57
4.2 SELEÇÃO DE ENDÓFITOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES.....	58
4.2.1 Meios de Cultivo para Produção de Biossurfactantes.....	58
4.2.2 Cultivo de fungos nos meios indutores	59
4.2.3 Determinação do Índice de Emulsificação.....	60
4.2.4 Medida da Tensão Superficial.....	60
4.2.5 Variação da produção de biossurfactantes	61
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES	62
4.3.1 Extração de DNA e PCR das Regiões ITS-1 a 2 dos Fungos endofíticos.....	62
4.3.2 Sequenciamento e Análise das Sequências	63
4.4 CULTIVO EM ESCALA AMPLIADA DOS FUNGOS MAIS PROMISSORES PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	63
4.5 EXTRAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	64
4.6 MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).....	65
4.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	66

4.7.1	Microorganismos teste.....	66
4.7.2	Reativação dos patógenos.....	66
4.7.3	Padronização do inóculo.....	67
4.7.4	Bioensaio antimicrobiano (Triagem).....	67
4.7.5	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	69
4.8	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES.....	71
4.8.1	Estudo do perfil químico dos extratos fúngicos.....	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Gustávia cf. hexapétala</i>	72
5.1.1	Frequência de Isolamento e Caracterização dos Fungos.....	74
5.1.2	Análise Taxonômica dos Fungos Isolados.....	76
5.2	FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES.....	79
5.2.1	Testes de Emulsificação.....	79
5.2.2	Determinação da Tensão Superficial.....	81
5.3	VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	86
5.4	IDENTIFICAÇÃO DE ENDÓFITOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES.....	88
5.5	EXTRAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	90
5.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).....	92
5.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	94
5.7.1	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	95
5.8	PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS FÚNGICOS.....	103
6	CONCLUSÃO.....	106
	REFERENCIAS.....	107
	APÊNDICE A.....	137
	- Preparo de Soluções antissépticas, Antibióticos e Meios de Cultura.....	137
	ANEXO A.....	138
	- Protocolo de Extração de DNA.....	138

1 INTRODUÇÃO

A busca por produtos de interesse biotecnológico tem impulsionado as pesquisas em torno da biodiversidade amazônica, em especial, as que realizam a prospecção de metabólitos microbianos, que por sua grande variedade e possibilidades de usos tem sido alvo de demandas diversas. A substituição de moléculas sintéticas por moléculas de origem natural nos setores industriais, farmacológicos e alimentícios revela-se como um imenso desafio que remete à importância de pesquisas dessa natureza. Nesse contexto, dentre os recursos biológicos que proporcionam bons resultados em termos dessa prospecção estão os de origem vegetal e microbianos.

As plantas apresentam um grande potencial para a obtenção de compostos biologicamente ativos e os microrganismos associados a elas, podem ter importante produção metabólica. Situa-se nesse campo, os fungos, que por suas características cosmopolitas podem ter seus nichos em diferentes habitats (AZEVEDO et al., 2000). Os fungos que habitam, pelo menos por um período do seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, sem causar danos ou produzir estruturas externas, podem ser considerados endofíticos (PETRINI, 1991). Os endofíticos conferem a seus hospedeiros importantes mecanismos de sobrevivência, por meio da produção de metabólitos (AZEVEDO, 2014). As interações dos endófitos com o hospedeiro favorecem a biossíntese de diferentes produtos naturais, os quais tem atraído o interesse da comunidade científica.

Dentre os metabólitos de interesse produzidos por fungos, destacam-se os biossurfactantes, que são moléculas anfipáticas com diversas aplicações em diferentes setores industriais. Os biossurfactantes podem ser obtidos a partir do metabolismo secundário de uma grande variedade de fungos, bactérias e leveduras. (CAMEOTRA et al., 2010; BANAT et al., 2010; VARJANI; UPASANI, 2017). A produção de biossurfactantes por microrganismos endofíticos tem se destacado como promissora para uso biotecnológico, considerando o grande interesse industrial nestas moléculas. A substituição de surfactantes sintéticos pelos biológicos apresenta diversas vantagens, dentre as quais, destacam-se o fato de serem menos tóxicas e biodegradáveis. Em razão da não-biodegradabilidade e da toxicidade inerente aos surfactantes químicos, o aumento da preocupação com os danos ambientais causados por estes compostos tem gerado avanço no campo das pesquisas em busca por surfactantes de origem natural, denominados de biossurfactantes (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011).

Muitos biossurfactantes apresentam ainda alta atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral. Outros apresentam papel relevante na aplicação à saúde, como agentes antiadesivos utilizados no tratamento de diversas doenças, além de serem utilizados como agentes terapêuticos e probióticos (SINGH e CAMEOTRA, 2004; NITSCHKE & COSTA, 2007).

O uso de biossurfactantes no campo da saúde e mais particularmente no setor odontológico está relacionada à inibição do crescimento/proliferação de microrganismos na cavidade oral (COCHIS et al., 2012). A maneira pela qual os microrganismos estão dispostos influencia na capacidade do agente antimicrobiano agir sobre os patógenos. Quando organizados em biofilmes, os microrganismos são menos susceptíveis aos agentes antimicrobianos (SHANI, FRIEDMAN & STEIBERG, 2000).

O biofilme surge com a adesão de microrganismos à superfície do dente, constituindo comunidades espacialmente organizadas em uma estrutura tridimensional e incluídas em uma matriz de material extracelular, derivada do metabolismo das células e do meio ambiente (MARSH e MARTIN, 2005). É fortemente influenciado por fatores do ambiente bucal, como pH, temperatura, potencial redox, condições atmosféricas e salinidade (RODRIGUES, 2011). Tem um importante papel no desenvolvimento da cárie dentária e doença periodontal (MARSH, 1992; ALBUQUERQUE et al., 2010; BEZERRA et al, 2013).

O tratamento e a prevenção da cárie e doenças periodontais têm sido feitos pelo controle da formação e inibição destas placas por ações mecânicas e químicas. Produtos sintéticos como a clorexidina são utilizados em tratamentos odontológicos desde a década de 70. Estudos como os realizados por Flötra et al. (1971); Addy et al. (1979); Okano et al. (1989); Ciancio (1995); Zanatta e Rösing (2007); Zanatta et al. (2007); Lawrence et al. (2008); e Pegoraro et al. (2014) têm relatado que o uso prolongado desses produtos é limitado pelos efeitos adversos relacionados, com o manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, alterações do paladar, principalmente para o sal, formação de cálculo supragengival e descamações na mucosa oral.

Diante disso, produtos naturais têm sido testados para inibir a ação destes agentes, destacando-se moléculas oriundas de microrganismos, com ação antimicrobiana e de desagregação ou ruptura do biofilme (RODRIGUES et al., 2007). Um dos produtos microbianos que merecem destaque são os biossurfactantes, que por meio de ações antibióticas e de desagregação podem ser importantes aliados no controle dos biofilmes dentários (COCHIS et al., 2012). Entretanto, pesquisas voltadas ao uso de produtos naturais ao invés de sintéticos neste tipo de tratamento ainda são raras e merecem mais atenção.

Plantas medicinais usadas por populações tradicionais no tratamento de enfermidades são fontes de importantes compostos bioativos. Endófitos de plantas medicinais têm recebido atenção da comunidade científica devido à produção de diversas moléculas naturais. Yu et al. (2010) mostraram que plantas medicinais geralmente contêm fungos endofíticos que produzem substâncias antimicrobianas interessantes.

De acordo com Kusari et al. (2008); Facundo et al., (2008) os endófitos de plantas medicinais tem grande significância, devido à sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários semelhantes aos do hospedeiro e apresentam grande potencial para a descoberta de novos compostos bioativos. Entretanto, a realização de pesquisas em busca de fungos endofíticos obtidos de plantas tropicais ainda são pouco estudados, e o aprofundamento sobre o potencial biotecnológico desses organismos torna-se necessário, bem como, um melhor entendimento da relação entre o microrganismo e o vegetal hospedeiro (OLIVEIRA, 2010; SPECIAN et al., 2014).

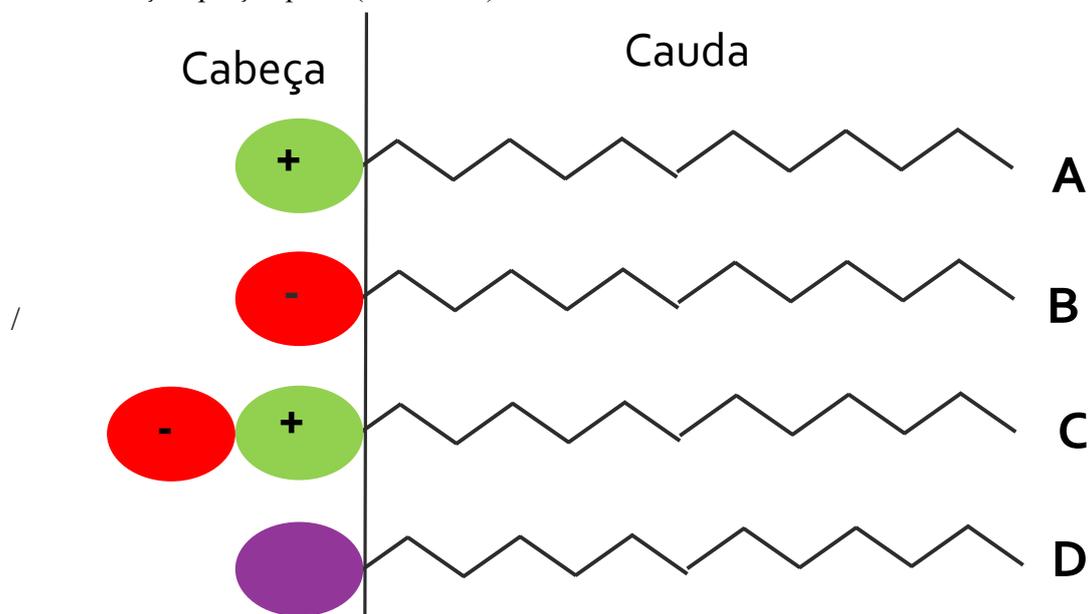
Neste contexto, ao se considerar a exploração de metabólitos microbianos de origem endofítica para uso no tratamento de doenças e preservação da saúde humana, sugere-se a utilização de compostos isolados de plantas que já possuem uso etnobotânico (SOARES et al., 2017). Dessa forma, pela importância de mais estudos voltados para a saúde, especialmente na área odontológica, neste trabalho avaliou-se o potencial de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Gustavia cf. hexapetala*, (Alb.) Sm. (Lecythidaceae), uma espécie vegetal amazônica, para produção de biossurfactantes com atividade antimicrobiana contra patógenos da cavidade oral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SURFACTANTES

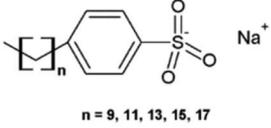
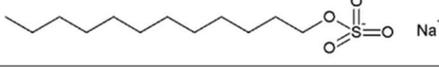
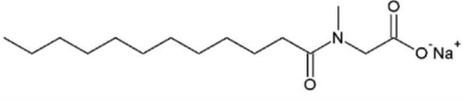
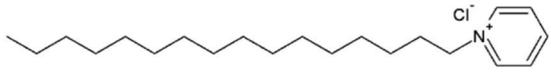
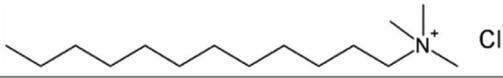
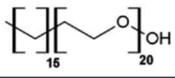
Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (NITSCHKE e PASTORE, 2002; DESAI e BANAT, 1997; FATHABAD, 2010;) que, preferencialmente, se localizam na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, como interfaces óleo/água ou ar/água (SARUBBO et al., 2015). Os surfactantes são classificados em aniônicos, catiônicos, não iônicos ou anfotéricos de acordo com o grupo presente na parte polar (Figura 1 e Tabela 1) (FELIPE e DIAS, 2017). A porção apolar (hidrofóbica), também denominada de cauda, solúvel em óleo, é constituída, frequentemente, por uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar (hidrofílica), ou cabeça, solúvel em água, pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica, que se comportam como ácido ou base dependendo do pH do meio (SINGH et al., 2007; DALVIN, 2011; TAZDAÏT et al., 2018).

Figura 1: Esquema representando os tipos de surfactantes: catiônicos (A), aniônicos (B), anfóteros (C), e não iônicos (D). A cauda corresponde à porção apolar (hidrofóbica) e a cabeça à porção polar (hidrofílica).



Esquema de autoria própria, adaptado de FELIPE e DIAS, 2017.

Tabela 1: Classificação dos surfactantes de acordo com o grupo polar. Adaptado de: Daltin (2011), Myers (2006).

Classes de surfactantes	Nomenclatura	Fórmula química
Aniônicos	Sulfonato de alquilbenzeno	 n = 9, 11, 13, 15, 17
	Dodecil sulfato de sódio (SDS)	
	<i>N</i> -laurilsarcosinato de sódio (Gardol®)	
Catiônicos	Cloreto de cetilpiridínio	
	Cloreto de dodecil trimetilamônio	
	Cloreto de hexadecilbenzildimetilamônio	
Não-iônico	Éter hexadecil (20)-Polioxietilênico (Brij 58®)	

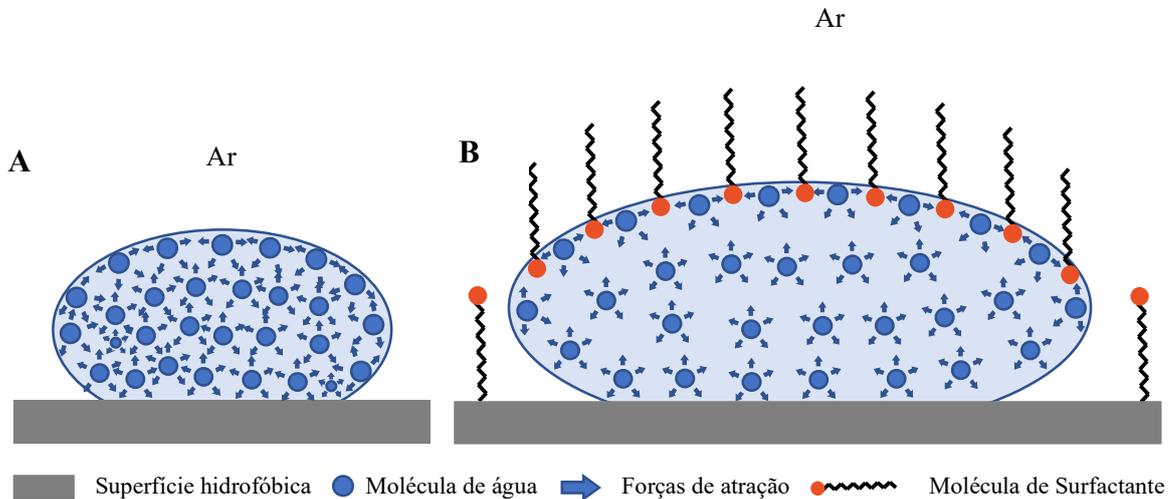
SBQ

<http://qnint.sbq.org.br>

Fonte: FELIPE e DIAS, 2017.

Os surfactantes, devido ao seu caráter anfifílico, quando adicionados a um solvente polar, como água, são atraídos, simultaneamente, pelas fases hidrofílica e hidrofóbica (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018) e se acumulam na superfície do solvente, ou seja, na interface solvente/ar (Figura 2). A presença das moléculas de surfactantes na superfície diminui a força de coesão entre as moléculas do solvente, localizadas na superfície, reduzindo a tensão superficial (ZANA, 2005; FELIPE e DIAS, 2017).

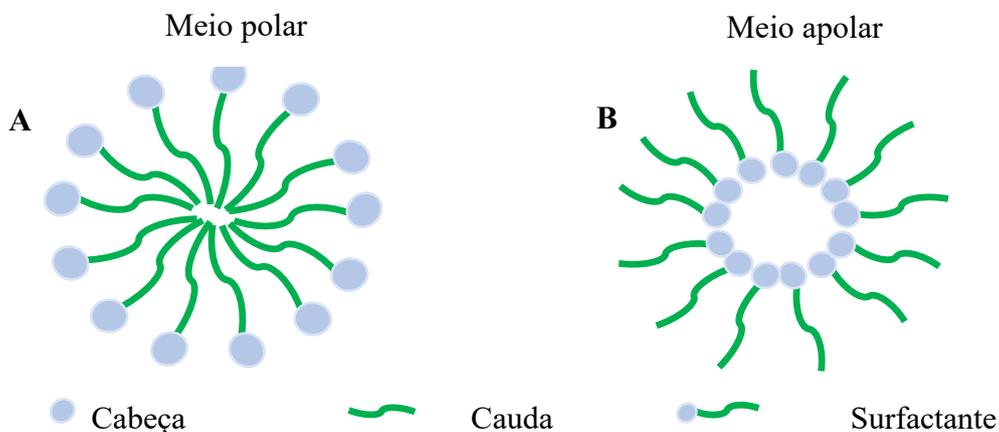
Figura 2: Representação esquemática (autoria própria). **A** - Gota de água em uma superfície hidrofóbica. E em **B** – Gota de água em uma superfície hidrofóbica, contendo moléculas de surfactante. A adição do surfactante, aumentou a área de contato da água com a superfície hidrofóbica.



Esquema de autoria própria adaptado de FELIPE e DIAS, 2017

Os surfactantes atuam nas tensões superficiais e interfaciais formando microemulsões (SOURAV et al., 2015). Essas microemulsões se formam espontaneamente e dependem principalmente do tipo e estrutura do surfactante (DOSHI; SILLANPÄÄ; KALLIOLA, 2018). Neste sentido mesmo que ocorra a adição de mais moléculas de surfactante após a saturação da superfície entre as duas fases (polar/apolar) não haverá diminuição da tensão superficial e dessa forma as moléculas de surfactante adicionadas interagirão entre si formando agregados moleculares, denominados de micelas (Figura 3 A e B) (PIRÔLLO, 2006; FELIPE e DIAS, 2017).

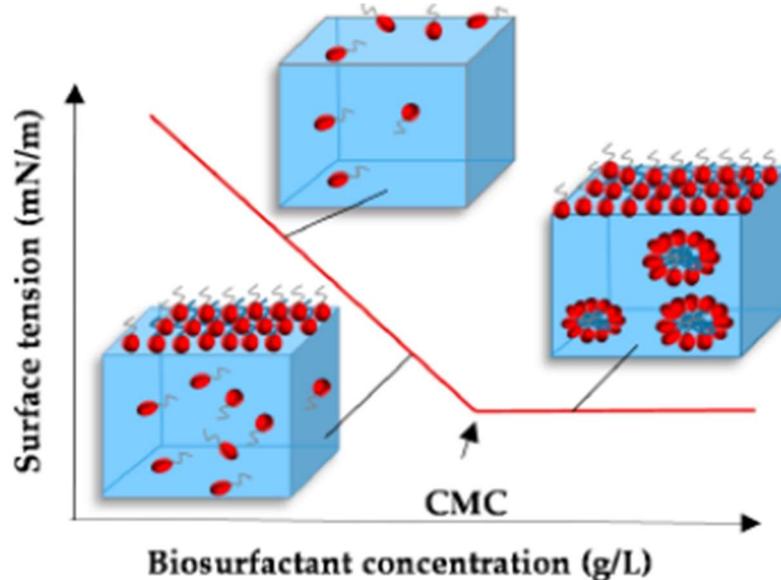
Figura 3: Comportamento de moléculas de biossurfactantes em diferentes meios.



Esquema de autoria própria, adaptado de FELIPE e DIAS, 2017

A concentração na qual se inicia o processo de formação de micelas é denominada de Concentração Micelar Crítica (CMC). A CMC é uma propriedade intrínseca e característica de cada surfactante e vários fatores afetam essa propriedade: a natureza química do grupo hidrofóbico, do grupo hidrofílico, força iônica, temperatura e a presença de eletrólitos (SOURAV et al., 2015; SANTOS et al., 2016; FELIPE e DIAS, 2017). A CMC corresponde ao ponto em que o agente tensoativo registra o menor valor de tensão superficial estável, ou seja, corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (Figura 4) (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

Figura 4: Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (CMC).



Fonte: SANTOS et al., 2016

Eficiência e eficácia são características essenciais de um bom surfactante. A eficiência é medida pela CMC, enquanto a eficácia está relacionada às tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007). A redução da tensão superficial torna esses compostos adequados para várias aplicações industriais, envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização, e dispersão de fases (ALMEIDA et al., 2016). Singh et al. (2007) destacam que bons surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial do n-hexadecano de 40 para 1 mN/m e relatam que a CMC do Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) é de 1800 mg/L, com redução da tensão superficial da água de 72 para 39 mN/m.

A maioria dos surfactantes produzidos atualmente são quimicamente derivados do petróleo. Esses compostos tensoativos sintéticos são geralmente tóxicos sendo difícil a degradação pela ação de microrganismos o que torna os surfactantes de origem química (sintéticos) uma fonte potencial de contaminação e danos ao meio ambiente (VIJAYAKUMAR & SARAVANAN, 2015). Neste contexto, uma alternativa para uso desses importantes compostos é a síntese de moléculas com as mesmas características e que são produzidas por microrganismos as quais são denominadas de biossurfactantes. Essas moléculas oferecem várias vantagens sobre os surfactantes químicos, como compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, biodegradabilidade e atividade mantida sob condições extremas de temperatura, salinidade e valores de pH (SATPUTE et al., 2010; KAPADIA e YAGNIK, 2013; SANTOS et al., 2013). Tais características favorecem a aplicabilidade dos biossurfactantes em diferentes indústrias (BANAT et al., 2010; ŁAWNICZAK; MARECIK; CHRZANOWSKI 2013).

O uso dos surfactantes sintéticos, em diversos processos industriais e domésticos, provoca danos ambientais associados à sua produção e ao seu descarte (FELIPE e DIAS, 2017). Vijayakumar & Saravanan (2015) e Brumano, Soler e Da Silva (2016) salientam que essas desvantagens têm atraído o interesse da comunidade científica em encontrar alternativas aos surfactantes industriais que sejam mais ecológicos o que tem tornado o uso de biossurfactantes, tensoativos produzidos por vias biotecnológicas, mais promissor.

2.2 BIOSSURFACTANTES

Na natureza, diferentes organismos vivos produzem substâncias com propriedades tensoativas que cumprem funções diversas, um exemplo são os sais biliares que são sintetizados pela vesícula biliar e responsáveis pela digestão e emulsificação da gordura, realizando a sua solubilização; as saponinas que se refere ao produto que resulta do metabolismo secundário de vegetais específicos e agem na defesa contra agentes externos (CIBULSKI, 2015; SILVA et al., 2015); aqueles produzidos por seres humanos - surfactante pulmonar (DESAI & BANAT, 1997; GEETHA, BANAT e JOSHI, 2018) e os biossurfactantes de origem microbiana que se formam a partir do metabolismo de algumas bactérias, fungos e leveduras (MARCHANT e BANAT, 2012; FELIPE e DIAS, 2017).

Biossurfactantes são compostos anfifílicos com porções hidrofóbicas e hidrofílicas, com a capacidade de se acumular e particionar entre fases fluidas, reduzindo assim a tensão

superficial e interfacial na superfície e interface, respectivamente (SINGH et al., 2007; MARCHANT e BANAT, 2012; BHARDWAJ, CAMEOTRA e CHOPRA, 2013).

O termo biossurfactante é utilizado para denominar qualquer surfactante de origem natural, ou os que são obtidos por ligações químicas de grupos polares e cadeias hidrofóbicas, provenientes de fontes naturais (APARNA, SRINIKETHAN e SMITHA, 2011; HAUSMANN e SYDALTK, 2015).

De acordo com Rosenberg & Ron, (1999); Uzoigwe et al., (2015) os biossurfactantes são classificados em dois grupos: aqueles que reduzem a tensão superficial da interface ar/água, conhecidos como biossurfactantes e aqueles que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, ou ainda atuam em interfaces sólido/líquido, os bioemulsificantes.

Em seus estudos Uzoigwe et al. (2015) relatam que os termos Biossurfactante (BS) e Bioemulsificante (BE) têm sido, frequentemente, usados de forma intercambiável para descrever biomoléculas de superfície ativa. Há, no entanto, diferenças marcantes entre eles e que merecem ser notadas pois dizem respeito as suas propriedades físico-químicas e funções fisiológicas, o que faz com que cada um apresente papéis característicos na natureza.

Os bioemulsificantes são moléculas com maior peso molecular do que os biossurfactantes uma vez que são constituídos por misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (PERFUMO et al., 2009; SMYTH et al., 2010 SEKHON-RANDHAWA, 2014).

Os biossurfactantes são compostos de massa molecular baixa e são eficientes na redução das tensões superficiais e interfaciais, enquanto os bioemulsificantes de massa molecular elevada são mais eficazes na estabilização das emulsões óleo-em-água (ROSENBERG & RON, 1999; RON e ROSENBERG, 2001; CALVO et al., 2009; LIMA, 2012). Geralmente, os biossurfactantes, também exibem capacidade de emulsificar, mas nem sempre os bioemulsificantes reduzem a tensão superficial (FREITAS et al., 2009; MONTEIRO et al., 2012).

Marchant e Banat (2012) discorrem que os biossurfactantes são produzidos, principalmente, mas não exclusivamente, por microrganismos, tanto bactérias como fungos (incluindo leveduras) e plantas (ROSA et al., 2015; VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015; UZOIGWE et al., 2015) despertando grande interesse na indústria por apresentarem características vantajosas, como diversidade estrutural, baixa toxicidade, biodegradabilidade, eficiência em baixas concentrações, capacidade de desempenho em ambientes com temperaturas extremas, valores de salinidade e pH, seletividade, menor CMC e capacidade de

ser produzido a partir de substratos naturais, resíduos industriais e subprodutos e sob condições ambientais amenas.

Devido à sua alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e multifuncionalidade os biossurfactantes vêm sendo aplicados em diferentes processos nas indústrias de cosméticos e farmacêutica, estando presentes na composição de produtos de limpeza do corpo, produtos para o cabelo, loções, sombra de olhos, tratamento de acne, batons para os lábios, desodorantes, produtos anti-rugas, suavização da pele, agente antimicrobiano, agente antifúngico, agentes anti-adesivos, agente anti-câncer, agente antiviral e agentes espumantes domésticos e biológicos (BORUAH e GOGOI, 2013; CHEOK, SALMAN, & SULAIMAN, 2014; VECINO et al., 2017). Os biossurfactantes são ecologicamente seguros e podem ser aplicados em processos de biorremediação de ambientes (BHARDWAJ, CAMEOTRA & CHOPRA, 2013).

Estudos mostram que a principal função biológica dos surfactantes microbianos está relacionada ao acesso a substratos hidrofóbicos, o que faz aumentar a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos produtores. Estas substâncias geram uma atividade antibiótica que emulsifica a parede celular de outros microrganismos, e estimulam a competitividade e a sobrevivência das populações microbianas que produzem os biossurfactantes (MULLIGAN et al., 2014). A maioria dos biossurfactantes é neutro ou aniônico. Além disso, apresentam tamanhos diferentes desde pequenos ácidos graxos até cadeias poliméricas (FELIPE e DIAS, 2017).

Em suas pesquisas Singh et al. (2007) discorrem que os biossurfactantes são mais eficientes e eficazes do que os surfactantes convencionais, pois levam a uma menor tensão superficial em concentrações mais baixas. As CMCs dos biossurfactantes variam de 1 a 2000 mg/L, enquanto a tensão interfacial (óleo/água) e superficial na CMC é de cerca de 1 e 30 mN/m, respectivamente.

Estudos realizados por Muthusamy et al. (2008), Pacwa-Plociniczak et al. (2011), Chen, Juang e Wei (2015) e Varjani, Upasani, (2017) descrevem que os biossurfactantes são classificados em cinco categorias de acordo com sua estrutura química e origem microbiana: glicolipídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos, lipopeptídeos ou lipoproteínas, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. A Tabela 2 apresenta um resumo das principais classes e exemplos de biossurfactantes produzidos por microrganismos descritos na literatura.

Tabela 2: Classes e tipos de biossurfactantes

Classe / Tipo de Biossurfactante
Glicolipídios
Ramnolipídeos
Soporolipídios
Trehalolipídeos
Lipopeptídeos e lipoproteínas
Peptídeo-lipídio, Liquenisina
Viscosina
Serrawettin
Surfactina
Subtilisina
Gramicidina
Polimixina
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios
Ácido graxo
Lípidos Neutros
Fosfolipídeos
Surfactantes poliméricos
Emulsan
Biodispersa
Liposan
Carboidrato - lipídio – proteína
Mannan – lipid – protein
Surfactante particulado
Vesículas
Células

Fonte: MUTHUSAMY et al., 2008; PACWA–PLOCINICZAK et al., 2011 CHEN, JUANG e WEI (2015).

2.2.1 Biossurfactantes: Aplicações Biotecnológicas

Estudos realizados por Soberón-Chávez e Maier (2011) Marchant e Banat (2012) destacam que grande parte do interesse da indústria pelos biossurfactantes tem sido direcionado até agora para os mercados de produtos a granel, como detergentes para lavagem de roupas e produtos de limpeza doméstica. A literatura traz relatos de pesquisas sobre a existência de muitas outras aplicações em que os agentes tensoativos químicos são atualmente utilizados, onde parte das propriedades especiais dos biossurfactantes podem ser utilmente aplicadas. A indústria de alimentos também faz uso dos biossurfactantes como agentes emulsionantes, agente anti-adesivo, agente antimicrobiano, preservação de alimentos (NITSCHKE & COSTA, 2007; BORUAH e GOGOI, 2013; MNIF e GHRIBI, 2016).

Os biossurfactantes são potencialmente substitutos para surfactantes sintéticos em diversos processos industriais, como lubrificação, detergência, capacidade molhante, umedecimento, amolecimento, fixação de corantes, emulsões, estabilização, dispersões, formação de espuma, prevenção da formação de espuma, bem como na indústria alimentar, biomédica e farmacêutica, e biorremediação de locais contaminados orgânicos ou inorgânicos (REIS et al., 2013; ALMEIDA et al., 2016).

As moléculas biológicas de superfície ativa (biossurfactantes) são consideradas as candidatas mais promissoras para a inibição de biofilmes bacterianos (KIRAN, SABARATHNAM e SELVIN, 2010; BANAT, DE RIENZO e QUINN, 2014). A adsorção do ativo superficial/biossurfactante em uma superfície do substrato altera a hidrofobicidade da superfície e causa interferência nos processos de adesão e dessorção microbiana (BANAT, DE RIENZO, QUINN, 2014).

Os biossurfactantes podem ter uma aplicação útil na prevenção da formação de biofilmes em superfícies como cateteres ou podem ser usados para interromper biofilmes estabelecidos em superfícies por meio do uso em formulações de limpeza de superfícies (RODRIGUES et al., 2007; DUSANE et al., 2010).

Uma área relativamente nova de aplicação de biossurfactantes apareceu com a sugestão de que eles podem ajudar na cicatrização de feridas (PILJAC et al., 2008). Por outro lado, isso abre a possibilidade de que os biossurfactantes possam ser utilmente incorporados em uma ampla gama de produtos de cuidados com a pele, no lugar de surfactantes químicos, e que isso teria o benefício adicional de auxiliar a cicatrização de pequenas lesões de pele.

Ressaltamos que, nas últimas três décadas, com o aumento nas pesquisas, muitas e grandes descobertas de biossurfactantes na área médica e em outras áreas gerais relacionadas, foram realizadas, conforme pode ser observado na Tabela 3 (RODRIGUES et al., 2006; SAIMMAI et al., 2020).

Tabela 3: Exemplos de microrganismos produtores de biossurfactantes com aplicação na área da saúde.

Microrganismo	Tipo de biossurfactante	Atividade / aplicação	Referencias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade antimicrobiana contra o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ▪ atividade anti-adesiva contra várias cepas bacterianas e de leveduras isoladas de próteses vocais ▪ antimicrobiano 	GERARD et al., 1997; RODRIGUES et al., 2006; REID, 2000; LANG & WULLBRANDT, 1999;
	lípidio de manosil-eritritol, Surfactina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antifúngico 	(KIM et al., 1998)
	Ramnolipídio	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antimicrobiano 	(CHRISTOVA et al., 2013)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Amphisin, Massetolide, Putisolvin, Siringomicina, Tolaasina, Viscosina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antimicrobiano 	(REDER-CHRIST et al., 2012; GROSS; LOPER, 2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ inibição das atividades antimicrobiana e antifúngica da formação de coágulos de fibrina ▪ hemólise e formação de canais iônicos nas membranas lipídicas ▪ atividade antitumoral contra células de carcinoma ascítico de Ehrlich ▪ atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) 	VOLLENBROICH et al., 1997a; VOLLENBROICH et al., 1997 b) ITOKAWA, 1994; MITTENBUHLER et al., 1997
<i>Bacillus subtilis</i>	Fusaricidina A, Iturina, Liquenicina, Micosubtilina, Surfactina, Pumilacidina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antimicrobiano 	(NERURKAR, 2010; KUMAR et al., 2012)
<i>Bacillus pumilus</i>	Pumilacidina (análogo de surfactina)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade antiviral contra o vírus herpes simplex 1 (HSV-1) ▪ atividade inibitória contra H⁺, K⁺-ATPase e proteção contra úlceras gástricas in vivo 	NARUSE et al., 1990.
<i>Bacillus subtilis</i>	Iturina Bacilomicina D, Iturina, Iturina A,	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade antimicrobiana e antifúngica contra micose profunda ▪ efeito na morfologia e estrutura da membrana das células de levedura ▪ aumento da condutância elétrica de membranas lipídicas adjuvantes imunológicas biomoleculares não tóxicas e não pirogênicas ▪ antimicrobiano 	AHIMOU, JACQUES, DELEU, 2001; BESSON et al., 1976; THIMON et al. 1995; TANAKA et al., 1997; MITTENBUHLER et al., 1997. VOLLENBROICH et al., 1997 b)

<i>Bacillus licheniformis</i>	Liquenisina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ adjuvante imunológico não tóxico e não pirogênico ▪ atividade antibacteriana ▪ propriedades quelantes que podem explicar o efeito de ruptura de membrana dos lipopeptídeos ▪ Anti-inflamatório 	JENNY, KAPPELI, FIETCHER, 1991; LIN, CARSWELL, SHARMA, 1994; YAKIMOV et al., 1995; GRANGEMARD et al., 2001.
<i>Candida antártica</i>	Mannosylerythritol lipids	<ul style="list-style-type: none"> ▪ propriedades antimicrobianas, imunológicas e neurológicas. ▪ indução da diferenciação celular na linhagem celular de leucemia promielocítica humana HL60 ▪ indução da diferenciação neuronal em células PC12 	KITAMOTO et al., 1993; ISODA et al., 1997; ISODA et al., 1999; SHIBAHARA et al. 2000; ZHAO et al., 2000; ZHAO et al., 1999; WAKAMATSU et al., 2001.
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	lípidio trealose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade antiviral contra o vírus HSV e influenza ▪ atividade anti-adesiva contra várias cepas bacterianas e de leveduras isoladas de próteses vocais 	UCHIDA, MISAVA, NAKAHARA et al., 1989; UCHIDA, TSUCHIYA, CHINO et al., 1989; RODRIGUES, VAN DER MEI, TEIXEIRA et al 2004; RODRIGUES, VAN DER MEI e BANAT, 2006; BUSSCHER, VAN HOOGMOED, GEERTSEMA-DOORNBUSCH et al. 1997; BUSSCHER HJ, VAN DE BELT-GRITTER, WESTERHOF et al., 1999.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	glicolípido		(ZARAGOZA et al., 2010)
<i>Rhodococcus sp.</i>	Lípido de trealose	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antimicrobiano 	
<i>Streptococcus mitis</i>	não identificado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade anti-adesiva contra o <i>Streptococcus mutans</i> 	PRATT-TERPSTRA, WEERKAMP, BUSSCHER. 1989; VAN HOOGMOED et al., 2000; VELRAEDS et al., 1997; REID, ZALAI, GARDINER, 1984. VELRAEDS et al., 1996.
<i>Lactobacillus</i>	surlactina	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade anti-adesiva contra vários patógenos, incluindo bactérias entéricas 	
<i>Lactococcus lactis</i>	não identificado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ atividade antiaderente contra várias cepas bacterianas e de leveduras isoladas de próteses vocais 	RODRIGUES et al., 2004;
<i>Arthrobacter paraffineu</i>	Trehalose mycolates	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antitumoral 	(MUTHUSAMY et al., 2008)
<i>Actinoplanes friuliensis</i>	Friulimicina B	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antimicrobiano 	(SCHNEIDER et al., 2009)

Fonte: RODRIGUES et al., 2006; SAIMMAI et al., 2020 com modificações.

Pode-se afirmar que uma série de características interessantes de biossurfactantes levou a aplicações potenciais no campo da saúde (RODRIGUES et al. 2006; SAIMMAI et al., 2020). Os referidos autores destacam que essas moléculas são úteis como agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais, além de possuírem potencial para uso como principais moléculas imunomoduladoras e agentes adesivos em vacinas e terapia gênica. Além disso, os biossurfactantes têm o potencial de ser usado como revestimentos biológicos anti-adesivos para materiais de inserção médica, reduzindo assim as infecções hospitalares e o uso de drogas sintéticas e químicas.

Rodrigues et al. (2006) ressaltam que apesar do imenso potencial dos biossurfactantes no campo da saúde, seu uso ainda permanece limitado, possivelmente devido ao seu alto custo de produção e extração e à falta de informações sobre sua toxicidade em relação aos sistemas humanos. Em contraponto, Saimmai et al. (2020) discorrem que essas moléculas são atraentes no campo da medicina porque os produtos dos biossurfactantes podem ser usados efetivamente, em pequenas quantidades o que leva a uma compensação pelos problemas que apresenta, com os altos custos de produção.

2.2.2 Biossurfactantes: Vantagens e dificuldades de produção

Sobre os biossurfactantes que são produzidos por diferentes microrganismos, Nitschke e Pastore (2002) e Mulligan (2014) afirmam que são uma importante opção tecnológica que podem substituir os surfactantes sintéticos, pois apresentam vantagens como:

1. Maior atividade superficial e interfacial - menores concentrações de biossurfactantes provocam uma maior diminuição da tensão superficial devido a menor CMC dos biossurfactantes;
2. Baixa toxicidade - menor probabilidade de provocar reações alérgicas torna os biossurfactantes mais seguros para serem utilizados em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos;
3. Biodegradabilidade - os microrganismos utilizam mais facilmente os biossurfactantes como substrato para obtenção de energia do que os surfactantes sintéticos;
4. Estabilidade em força iônica alta - surfactantes sintéticos são estáveis entre 2 a 3% (m/v) de sais, já os biossurfactantes são estáveis até concentrações salinas de 10% (m/v);

5. Utilização de substratos alternativos na produção por via fermentativa - os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos renováveis e resíduos agroindustriais.

Estas vantagens demonstram maior aceitabilidade no mercado, podendo ser utilizados em diferentes produtos. Saharan (2011) e Winterburn e Martin (2012) afirmam que há muitos desafios para que a produção destes elementos seja viabilizada e estes possam ser comercializados em larga escala, como o preço que no caso dos biossurfactantes ainda é maior que os surfactantes sintéticos. Outro elemento é a baixa produtividade pois os a produção dos biossurfactantes pelos microrganismos ainda acontece em pequenas concentrações.

Os autores citados apresentam ainda como problema, a produção de espuma durante o processo de cultivo, da agitação e aeração do biorreator e na mistura coloidal formada pela dispersão de um gás em um líquido. Esta espuma arrasta o meio de cultivo para fora do biorreator, onde é realizado o cultivo, e causa diversas perdas, além de favorecer a contaminação. Há ainda a dificuldade de purificar os biossurfactantes pois durante o processo de recuperação são necessárias várias etapas que geram muitos efluentes e os tornam inviáveis economicamente. Mesmo com os problemas elencados e os desafios técnicos a serem vencidos a demanda por moléculas tensoativas para o uso no dia a dia é cada vez mais crescente, como mostra o análise atual presente no relatório da Reports and Data:

No site da Globe Newswire (2019, p. 11), lê-se que:

O uso final generalizado de surfactantes aniônicos, crescimento no setor de cuidados domiciliares, cuidados pessoais, construção e agricultura, políticas reguladoras rigorosas em relação ao uso de surfactantes convencionais, extensa pesquisa e inovação constante são alguns dos fatores que impulsionam o mercado de surfactantes aniônicos. De acordo com a análise atual da Reports and Data, o mercado global de surfactantes aniônicos foi avaliado em 16,82 bilhões de dólares em 2018 e deverá chegar a 23,71 bilhões de dólares até o ano 2026, com um CAGR de 4,3%. O estudo fornece uma visão geral dos fatores responsáveis pelo crescimento no mercado de surfactantes aniônicos. Esse mercado deve ganhar força devido ao forte aumento da demanda impulsionado pelo crescimento paralelo de indústrias de usuários finais, como atendimento domiciliar, construção civil, produtos farmacêuticos e muito mais. O setor de cuidados pessoais e atendimento domiciliar nos últimos anos testemunhou um tremendo crescimento devido ao aumento da população, ao aumento da renda per capita das pessoas e ao aumento do padrão de vida na região da Ásia-Pacífico. Prevê-se que o segmento farmacêutico cresça devido a doenças galopantes e à melhoria dos serviços de saúde em todo o mundo. Espera-se que os surfactantes aniônicos de base biológica diversifiquem os segmentos de aplicação e ajudem no crescimento do mercado. A conscientização do consumidor em relação ao uso de produtos ecológicos está aumentando. Portanto, a demanda por produtos a partir de fontes naturais também aumenta.

Verifica-se então que biossurfactantes apresentam uma infinidade de aplicações nos mais variados setores da indústria e que apesar de ainda demandar um custo econômico alto para ser produzido, características vantajosas como a não-toxicidade e a biodegradabilidade agrega valor a sua produção. Diante disso, o uso de biossurfactantes produzidos por microrganismos tem surgido como uma via alternativa importante.

2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são produzidos principalmente por bactérias, leveduras e fungos (MARCHANT e BANAT 2012; VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015; UZOIGWE et al., 2015, BATISTA et al., 2016). No entanto, Silva et al. (2018) ressalta que as pesquisas que envolvem a produção de biossurfactantes ou bioemulsificantes por bactérias, tem recebido um grande destaque (LANG & WULLBRANDT, 1999; REID, 2000; GERARD et al., 1997; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006; JOSHI; BHARUCHA; DESAI, 2008; SILVA et al., 2014; RAJESH et al., 2017; LIMA et al., 2017; BOUASSIDA et al., 2018). Essa produção é seguida pelas leveduras, principalmente, as do gênero *Candida* tais como: *C. bombicola*, *C. glabrata*, *C. rugosa* e *C. lipolytica*. (SARUBBO et al., 2001; SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2011; CHANDRAN; DAS, 2011) porém, raramente os fungos filamentosos aparecem como produtores de biossurfactantes ou bioemulsificantes (BATRAKOV et al., 2003; KATEMAI et al., 2008; ANDRADE SILVA et al., 2014; SILVA GK et al., 2015; SANCHES et al., 2018; REIS et al., 2018).

Pesquisas que envolvem os fungos filamentosos, como produtores de biossurfactantes, são mais recentes e em menor volume se comparados com os estudos que envolvem as bactérias e leveduras. Porém, os relatos dessas pesquisas têm demonstrado o potencial desse grupo de microrganismos na produção dessas biomoléculas (LUNA-VELASCO et al., 2007; COLLA et al., 2012; GAUTAM et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; LIMA et al., 2016; SANCHES et al., 2018; REIS et al., 2018). O potencial de produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por fungos filamentosos e os rendimentos mais altos que os produzidos por leveduras foi evidenciado destacando-se ainda mais quando comparados com os obtidos por bactérias (BHARDWAJ, CAMEOTRA e CHOPRA, 2013).

Os fungos filamentosos têm sido particularmente conhecidos em razão de sua capacidade de produzir grande variedade desses compostos, sendo que a produção ocorre na fase estacionária (RON ROSENBERG, 2001; ADNAN et al., 2018). Fungos filamentosos

despontam ainda como promissores em razão da capacidade metabólica para geração de diversos bioativos e o uso de substratos alternativos para seu cultivo (HAWKSWORTH, 1985; QAZI et al., 2014; SILVA, 2015; SENA et al., 2018; SANCHES et al., 2018; Silva et al., 2019).

Silva et al. (2018) salientam que devido ao crescimento mais lento dos fungos filamentosos as leveduras são mais utilizadas com a finalidade de produzir compostos tensoativos. Todavia os fungos são considerados excelentes produtores de biossurfactantes ou bioemulsificantes, sendo esses emulsificantes capazes de produzir emulsões estáveis com grande capacidade de promover a dispersão de compostos hidrofóbicos podendo ser aplicados em diferentes setores (ANDRADE SILVA et al., 2014; SOUZA AF et al., 2016; SOUZA PM et al., 2016; PELE et al., 2018).

Os fungos filamentosos produzem diversos metabólitos que possuem atividade antimicrobiana, enzimática, pigmentos e biossurfactantes que são de grande interesse industrial. Nesse sentido, os fungos filamentosos têm se apresentado como alternativas promissoras para a produção de moléculas de interesse.

Girardot & Imbert (2016) descrevem que os antifúngicos, atualmente empregados como equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) foram inicialmente obtidos por fermentação de fungos filamentosos, incluindo *Aspergillus* sp., sendo também fonte para novos compostos anti-biofilme: os alcalóides, os terpenos e biossurfactantes/glicosídeos.

Pela versatilidade de uso que os biossurfactantes apresentam, a busca por esses compostos vem se destacando com a inclusão dos fungos filamentosos nas pesquisas. A literatura científica apresenta o resultado de estudos envolvendo fungos produtores de biossurfactantes e as respectivas espécies produtoras (Tabela 4).

Tabela 4: Fungos produtores de biossurfactantes e as respectivas espécies produtoras

Fungo	Tipo de Biossurfactante	Origem	Referência
<i>Trametes versicolor</i> <i>Talaromyces herodensis</i>	-	<i>Piper hispidum</i> <i>Myrcia guianensis</i> (Fungos endofíticos)	(SILVA, 2019; SILVA et al., 2019).
Gênero <i>Diaporthe</i>	-	Endofíticos manguezal em Cananéia, SP, Brasi	(MARTINHO et al. 2019).
<i>Xylaria regalis</i>	-	Isolado dos cones de <i>Thuja plicata</i>	(ADNAN et al., 2018)
<i>Penicillium</i> 8CC2	-	Solo da Amazônia	(SENA et al., 2018)
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	Solo da Amazônia	(SANCHES, et al., 2018)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	-	Solo contaminado	(REIS et al., 2018)
<i>Phoma</i> sp (S31).	-	Endofito isolado de <i>Cyperus ligularis</i>	(LIMA et al. 2016)
<i>Pleorotus ostreatus</i>	-	-	(VELIOGLU e UREK, 2015a)
<i>Pleorotus djamor</i>	-	-	(VELIOGLU e UREK, 2015b)
<i>Aspergillus flavus</i>	-	Solo contaminado com óleo diesel	(RODRIGUES et al., 2014)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	L9	Planta <i>Lilium lanciflorium</i>	(KIM e PARK, 2014)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Biossurfactante polimerico	Solo da Caatinga	(ANDRADE SILVA et al., 2014)
<i>Fusarium</i> sp BS-8	Lipopeptídeo	Solo	(QAZI et al., 2014)
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNP5	Lipopeptídeo	Solo	(GAUTAM et al., 2014)
<i>Trichoderma</i> sp.	-	Efluente	(COLLA et al., 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Glicolípídeo	Solo	(KANNAHI e SHERLEY, 2012)
<i>Mucor circinelloides</i> UCP69	-	Coleção	(ACIOLY et al., 2012)
<i>Exophiala dermatitidis</i> SK80	Monoglicerídeos	Solo	(CHIEWPATTANAKUL et al., 2010)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Lipoproteína	Solo	(MATHUR et al., 2010)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Solo	(CASTIGLIONI et al., 2009)
<i>Aspergillus ustus</i>	MSF3 Glicoproteína	Esponja marinha <i>Fasciospongia cavernosa</i>	(KIRAN et al., 2009)
<i>Penicillium</i> sp	-	Solo	(LUNA-VELASCO et al., 2007)
<i>Penicillium citrinum</i>	Glicolípídeo	-	(CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003)
<i>Curvularia lunata</i> IM 2901	Biossurfactante polimérico	Coleção	(PARASZKIEWICZ, KANWAL, DŁUGÓNSKI, 2002)
<i>Cladosporium resinae</i>	Cladosan	Combustível de avião	(MURIEL et al., 1996)

Fonte: SANCHES, 2016, com atualizações.

2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL VALOR BIOTECNOLÓGICO

Assim como as plantas, os microrganismos representam uma fonte rica e diversa de produtos naturais bioativos. Eles contribuem com uma variedade de metabólitos biologicamente ativos que podem ser empregados como medicamentos ou ainda como agentes agroquímicos naturais (GUNATILAKA, 2006).

Petrini (1991) considerou microrganismos endofíticos aqueles que colonizam o interior de tecidos aéreos das plantas em alguma fase do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Posteriormente, Azevedo & Araújo (2007) definiram os microrganismos endofíticos como todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis. Pereira et al. (2007) destacaram ainda, que os endófitos podem conferir benefícios aos seus hospedeiros, resultando em um sistema simbiótico reconhecido e com características específicas. Uma definição mais recente, relatada por Azevedo (2014) considera todos os endófitos como microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam as partes internas dos tecidos vegetais, sem causar aparentemente nenhum dano, o que os diferencia dos microrganismos fitopatogênicos.

Braga e Spessoto (2008) expõem que os microrganismos endofíticos de diferentes hospedeiros têm sido bastante estudados, sendo inicialmente caracterizados como assintomáticos, porém após pesquisas, verificou-se que possuem diversas funções nos organismos hospedeiros. As várias classes de moléculas produzidas por fungos endofíticos podem possuir atividades hormonais, antitumorais e antibióticas (PEIXOTO NETO, AZEVEDO e ARAÚJO, 2002). Neste sentido, a indústria farmacêutica tem sido o principal segmento a pesquisar os endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas.

A ocorrência de microrganismos endofíticos é ampla, provavelmente todas as plantas podem abrigar vários deles, incluindo fungos e bactérias. (AZEVEDO, 1998; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). Nas interações mutualísticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que pode conferir benefícios para a planta hospedeira como tolerância a metais pesados, aumento da resistência à seca, redução de herbivoria, resistência sistêmica contra patógenos e aumento do crescimento vegetal (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES e DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993). São, principalmente, fungos e bactérias que vivem no interior da planta hospedeira, habitando em geral, raízes, caules e folhas, sem causar efeitos adversos aparentes à planta hospedeira (AZEVEDO, 1998; STROBEL et al., 2004; ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Na associação simbiótica, a planta hospedeira abriga e fornece nutrientes para o desenvolvimento do fungo, que, por sua vez, ajuda na proteção contra herbívoros e patógenos da planta (AZEVEDO et al., 2002). Há evidências de que a presença de fungos endofíticos nos tecidos vegetais pode provocar um aumento da resistência da planta a insetos, nematóides e bactérias (STEPHENSON, 2010; MARCON, 2013).

Desvendou-se que a interação endófito-planta pode não ocorrer apenas pelo equilíbrio entre a virulência e a defesa, e sim por conta de uma interação bastante complexa e precisamente controlada (JI; LI e ZHANG, 2009), no qual em razão da coevolução planta-endófito torna-se possível que endófitos desenvolvam mecanismos de resistência e atuem na defesa química vegetal com a produção de metabólitos secundários bioativos (KUSARI et al., 2011), que cumprem funções fundamentais para a sanidade da planta como a proteção contra herbivoria, controle de outros microrganismos e aumento da tolerância às modificações ambientais (PEIXOTO NETO; AZEVEDO e ARAÚJO, 2002; GUNATILAKA, 2006; KOGEL; FRANKEN e HUCKELHOVEN, 2006).

Muitas substâncias produzidas pelas plantas podem ter origem nessa associação com os endófitos, incluindo os fungos, o que justifica o avanço de estudos com esses microrganismos. Os fungos endofíticos são fonte de produção de um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas (JALGAONWALA et al., 2011, ALY et al., 2011. Peixoto Neto, Azevedo e Araújo (2002) avaliam que a variedade de metabólitos secundários produzidos por um único fungo deve ser significativamente alta, uma vez que esses organismos apresentam versatilidade e facilidade de adaptação.

Os produtos naturais oriundos de fungos endofíticos proporcionam um amplo espectro de atividades biológicas, como as antimicrobianas (WANG et al., 2012), antiparasitárias (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; ONDEYKA et al., 1997) neuroprotetivas (ALY et al., 2010), antioxidantes (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; JALGAONWALA, MOHITE, MAHAJAN, 2011), antidiabéticas (ZHANG B., et al., 1999; JALGAONWALA, MOHITE, MAHAJAN, 2011), propriedades imunossupressoras (ZHANG B et al., 1999; STROBEL; DAISY, 2003), antivirais (STROBEL e DAISY, 2003), anticolinesterásicas (ZHANG; SONG; TAN, 2006) antineoplásicos (SHWETA et al., 2010) e citotóxicas (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

A avaliação da atividade antimicrobiana de fungos foi descrita por Pileggi (2006) a partir de treze linhagens do fungo *Phomopsis sp.* isoladas de folhas de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae), que é conhecida pela população como Peroba-do-Campo

e, de pecíolos de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), também denominada vulgarmente como Cajamanga. Dentre as linhagens estudadas, três demonstraram a capacidade de inibir bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo então estes fungos importantes fontes de produtos bioativos.

Em estudos desenvolvidos por Souza et al. (2004) realizou-se a avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*. Dos metabólitos obtidos de 79 linhagens selecionadas para os ensaios in vitro, 19 (24,05%) apresentaram ação contra um ou mais microrganismos testados (*Aspergillus flavus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Trichoderma sp.*).

Há um grande interesse pelos estudos de endófitos de plantas medicinais, a fim de se descobrir novos compostos, já que os pressupostos da interação endófito-hospedeiro sugerem que as propriedades terapêuticas podem estar no endófito e não na planta ou, provavelmente, na interação entre ambos (GOMES-FIGUEIREDO, 2006).

Exemplo de metabólitos secundários bioativos é o importante anticancerígeno, a vincristina, extraída da planta *Catharanthus roseus* e isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (KUMAR et al., 2013). Outro exemplo é a produção do Taxol, um importante fármaco anticancerígeno, produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância (STIERLE et al., 1995; CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Neste contexto, a literatura científica destaca que os fungos endofíticos são boa fonte de produção de um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011; ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

2.5 BIOSSURFACTANTES COMO ANTIMICROBIANOS

Os biossurfactantes apresentam um amplo espectro de usos, inclusive na área da saúde, destacando-se a atividade antimicrobiana de várias dessas moléculas. Essas atividades têm sido relatadas na literatura para diferentes aplicações (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004; NITSCHKE & COSTA, 2007).

Estudos com diferentes biossurfactantes demonstraram que muitos possuem atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos filamentosos, leveduras, algas e vírus (NITSCHKE & COSTA, 2007). Há relatos desta atividade em moléculas como ramnolipídio e surfactina (DAS; MUKHERJEE e SEM, 2008), sendo a classe dos lipopeptídeos a mais

relatada nesse sentido, assim como os ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa* e os sphorolipídios de *Candida bombicola* (ARAÚJO; FREIRE e NITSCHKE, 2013).

A atividade antimicrobiana de uma mistura de sete homólogos de ramnolipídios produzida por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 sobre ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos foi avaliada e, devido às propriedades físico-químicas e elevada atividade antimicrobiana, este produto poderia ser visto como uma ferramenta útil em processos de biorremediação, cosméticos e aplicações em indústrias de alimentos (ABALOS et al., 2001).

Pesquisas descrevem o mecanismo de ação dos biossurfactantes como antimicrobianos por meio de sua possível ação sobre a membrana plasmática, interferindo em sua integridade, causando mudanças ultra-estruturais ou formando poros e obstruindo-a (SHARMA; SAHARAN; KAPIL, 2016; GOMAA, 2013; MNIF & GHRIBI, 2015).

Entre as várias categorias de biossurfactantes, os lipopeptídeos são particularmente interessantes por causa de suas atividades de alta superfície e potencial antibiótico. Os lipopeptídeos podem atuar como antibióticos, e antitumorais, imunomoduladores ou toxinas específicas e inibidores enzimáticos (RODRIGUES et al., 2006). Nesse aspecto o uso de biossurfactantes na indústria farmacêutica, tem apresentado fortes índices de características promissoras no controle de patógenos também na microbiota oral.

2.6 BIOSSURFACTANTES COMO POTENCIAL NA ODONTOLOGIA

Na área odontológica um dos mais importantes fatores para o desencadeamento de problemas periodontais e cáries é a formação de biofilmes dentários (COSTERTON, STEWART e GREENBERG, 1999) Na cavidade oral os patógenos associados com a etiologia da cárie dentária são: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Rothia dentocariosa*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Bifidobacterium*, *Scardovia* e *Enterococcus faecalis* (KARPINSKI e SZKARADKIEWICZ, 2013). Também fazem parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis, espécies de *Candida* residindo como comensais. Em situações de alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas podem desenvolver patogenicidade. A *Candida albicans* causa a candidíase que é a infecção fúngica mais frequente na mucosa oral. (PADILHA et al., 2014).

De acordo com Agarwal e Nagesh (2011), a cárie dentária, é uma doença de origem infecciosa bem comum em humanos, e é um dos principais agravos do biofilme dental. A doença cárie está associada com a ingestão de carboidratos fermentáveis, como exemplo, a sacarose (PAES LEME et al., 2006; MARSH, 2010; ZHANG et al., 2018). Apesar da complexidade da microbiota bucal, há evidências convincentes que *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, bactérias acidogênicas e acidúricas, são os principais microrganismos envolvidos na etiologia da cárie dentária (FEJERSKOV e KIDD, 2005; STRUZYCKA, 2014).

2.6.1 Microbiota Oral

2.6.1.1 *Streptococcus mutans*

O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é uma bactéria gram-positiva, intimamente associada à cárie dentária, apresentando a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares aderentes, a partir da sacarose, e polissacarídeos intracelulares a partir de carboidratos fermentáveis (SHEN; SAMARANAYAKE; YIP, 2004). As células do *S. mutans* podem rapidamente orquestrar a formação de biofilmes em superfícies de dentes quando são expostos frequentemente a sacarose dietética e tem sido considerado como um dos agentes etiológicos principais da cárie na primeira infância, embora outros organismos também possam contribuir para a sua patogênese (FALSETTA et al., 2014).

O *S. mutans* é considerado o mais cariogênico a colonizar a cavidade oral humana, isso se deve, entre outros fatores, à sua alta virulência e ao mecanismo de desenvolvimento do biofilme dental, posteriormente colonizado por uma série de outras bactérias (LOESCHE, 1986; KHAN et al., 2017). A expressão de vários genes de virulência do *S. mutans* influenciam seu crescimento e acúmulo na superfície dentária tornando-o como principal patógeno associado à doença cárie (COTA; SILVA; DA SILVA, 2020). Dessa forma, é importante salientar que a cárie é uma doença na qual há formação de biofilme quando as mudanças no ambiente oral reforçam o crescimento de bactérias cariogênicas (HÖFLING et al., 1999). Por sua vez, os biofilmes apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos e são mais difíceis de tratar (AHN et al., 2008; CURTIS et al., 2011). *S. mutans* pode se beneficiar da disponibilidade de mecanismos de adesão específicos, particularmente aqueles mediados por genes (SILVA; DA SILVA; COTA, 2020).

A principal via de transmissão desta bactéria é vertical, acontecendo sobretudo no âmbito familiar, ainda na primeira infância. Por este motivo este microorganismo é altamente prevalente na espécie humana, podendo estar presente durante toda a vida do indivíduo, ainda que este não desenvolva nenhuma doença (COTA; SILVA; DA SILVA, 2020; TINANOFF e REISINE, 2009). Ademais, é importante conhecer o mecanismo de ação do *S. mutans* para que dessa forma seja possível combatê-lo de forma adequada, desde a primeira infância, uma vez que a cárie dentária é uma das doenças mais prevalentes em seres humanos (JAIN et al., 2015).

2.6.1.2 *Lactobacillus casei*

As bactérias do gênero *Lactobacillus* compreendem um grupo de microrganismos que tem um importante papel na progressão da cárie dental. São bastonetes Gram positivos, anaeróbios facultativos e às vezes microaerófilos. Entre suas características está relacionada ao seu metabolismo. Algumas são acidogênicas e outras são acidúricas. As espécies *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, são homofermentativas, produzem ácido lático. *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. cellobiosus* são heterofermentativos, produzem vários ácidos orgânicos (ácido acético, ácido lático) além do etanol e dióxido de carbono (UZEDA, 2002).

As bactérias do gênero *L. casei* são microrganismos presentes no intestino e na boca dos seres humanos e desempenham papel importante na progressão da cárie, especialmente nos casos de lesões cavitadas, tendo em vista que fazem parte do grupo de colonizadores secundários do biofilme cariogênico e, devido às características acidogênicas, contribuem para progressão do efeito destrutivo (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

A cárie dentária tem relação direta, entre outros fatores, com a microbiota presente na estrutura dentária. Dentre as espécies de bactérias atuantes nesse processo o *Lactobacillus casei*, se mostra bastante importante devido ao fato de estar relacionada com o comprometimento da lesão, sendo bastante presente em uma etapa já de cavitação da lesão (CASTRO et al., 2010),

2.6.1.3 *Candida albicans*

A infecção causada pela *Candida albicans* é denominada candidíase oral. Abrange infecções da língua, palato e outros locais da mucosa oral, sendo caracterizada por crescimento excessivo de fungos e invasão de tecidos superficiais. Podem existir duas formas desse microrganismo, característica conhecida como dimorfismo. Acredita-se que a forma de levedura do organismo seja relativamente inócua, mas a forma de hifa geralmente está associada à invasão do tecido hospedeiro (NEVILLE, 2016; VILA, et al., 2020).

Cerca de 95% dos casos de candidíase oral são causados pela *C. albicans*. Mesmo sendo considerado um patógeno, esse microrganismo é facilmente encontrado na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo cerca de 80% da população em geral são portadores assintomáticos desse fungo. A grande maioria desses microrganismos existe como colonização comensal e não como um processo patológico (WILLIAMS; LEWIS, 2011; HELLSTEIN & MAREK, 2019; VILA et al., 2020).

É preciso considerar a diferença entre comensalismo e patogênese. A colonização patológica de espécies de *Candida* está relacionada a vários fatores, incluindo, entre outros: extremos etários, desnutrição, doença metabólica, infecções concomitantes, terapia antibacteriana, imunossupressão, radioterapia, pacientes transplantados, hipofunção da glândula salivar e uso a longo prazo de esteroides (ODDS, 1988; HELLSTEIN & MAREK, 2019).

2.6.2. Controle do Biofilme

O desequilíbrio da placa bacteriana leva ao aparecimento de doenças orais, sendo a cárie e a doença periodontal as principais. Para o controle do biofilme, habitualmente utilizam-se procedimentos de natureza mecânica, como a escovação dos dentes e o uso do fio dental e os de natureza química, como os enxaguatórios bucais, que podem ter função detergente, fungicida e bactericida (KLUK et al., 2016; FARIAS, 2019a). Kluk et al. (2016) destacam que para melhorar as formulações dos enxaguatórios bucais são adicionadas substâncias químicas como a clorexidina em suas composições. Essa composição diminui a atividade metabólica dos microrganismos, paralisando seus componentes metabólicos (MEYER et al., 2007).

A clorexidina destaca-se entre os anti-sépticos utilizados para controle químico em odontologia. É considerada um antimicrobiano eficiente, pois atua no rompimento da

membrana plasmática dos microrganismos, apresentando como vantagens no seu uso o controle da placa bacteriana, diminuição do sangramento e inflamação gengival (MAGALHÃES, et al. 2011). Possui largo espectro bacteriano, alta substantividade, é segura e efetiva e pode ser encontrada veiculada em dentifrícios, géis, vernizes ou soluções (CORRÊA, 1998). Entretanto, a eficácia da clorexidina, nos dentifrícios pode ser diminuída, pois estes em geral apresentam detergentes, nas suas formulações, incompatíveis com a clorexidina, reduzindo sua ação (CORRÊA, 1998; TORRES et al., 2000; MARTINS, et al., 2012; DINGUESLESKI et al., 2015).

Zanatta e Rosing (2007) descrevem que evidências recentes demonstram claramente a diminuição de sua eficácia no biofilme supragengival formado, o que reforça a necessidade de uma deplacagem (remoção da placa dos dentes) prévia na sua utilização para potencializar seu efeito antiplaca e anti-gengivite, bem como diminuir seus efeitos adversos de manchamento e formação de cálculo.

Estudos sobre a eficácia de produtos que influenciam a adesão e colonização bacteriana sobre as superfícies dentárias tem sido descritos em alguns trabalhos, apesar de serem ainda em número reduzido. Essas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de prevenir a desmineralização do esmalte dentário e a formação do biofilme dental (SANO et al., 2003; TAO et al., 2017).

Sakaue et al. (2018), realizaram estudos *in vitro* no qual biofilmes foram periodicamente expostos a aplicações de Gluconato de Clorexidina a 0,12% a cada 12 horas por 1 minuto e incubados por até 2 dias. Os resultados sugeriram que o Gluconato de Clorexidina pode promover a absorção de minerais no biofilme logo após seu uso, sendo necessário romper o biofilme antes do uso de um enxaguatório bucal a fim de reduzir os efeitos colaterais associados a este procedimento, ou seja a formação de cálculo. Estudos voltados ao uso de produtos naturais ao invés de sintéticos neste tipo de tratamento ainda são raros e merecem mais atenção.

Em suas pesquisas Cochis et al. (2012) demonstraram a eficácia anti-biofilme de três biossurfactantes obtidos a partir de endófitos selecionados de duas espécies botânicas diferentes, a *Robinia pseudoacacia* (AC5 e AC7) e *Nerium oleander* (OC5). Os estudos demonstraram que a formação de biofilme de *C. albicans* em superfícies de silício ou resina de elastômero pré-revestidas com estes biossurfactantes utilizados em baixas concentrações foi significativamente reduzido, graças à sua boa atividade anti-aderência. Os biossurfactantes testados mostraram uma atividade anti-Candida maior do que a da Clorexidina e uma citocompatibilidade com células epiteliais e fibroblastos (COCHIS et al., 2012). Esses autores

concluíram que biossurfactantes obtidos de endófitos são novos compostos promissores para aplicação em higiene bucal visto que tais moléculas também apresentam baixa citotoxicidade e boa atividade antiadesiva conforme foi comprovado contra o biofilme de *C. albicans*.

Destacam-se, assim algumas pesquisas na área odontológica realizadas por Das et al., (2013b) onde foi verificado que dois diferentes biossurfactantes utilizados na pesquisa atuaram como um bom ingrediente na formulação de pasta de dente, com destaque para a boa capacidade de formação de espuma, boa eficiência na limpeza e remoção de manchas e um pH alcalino necessário para a neutralização do biofilme ácido.

Os estudos de Bouassida et al. (2017) demonstram a atividade antimicrobiana de dentifrício formulado com biossurfactante SPB1 contra oito tipos de bactérias, onde os resultados obtidos mostram que produto formulado exibiu atividade antimicrobiana importante e eficaz contra *Enterobacter* sp e *Salmonella typhimurium*.

Elshikh, Marchant, Banat (2016) apresentaram em artigo de revisão pesquisas que demonstraram o papel dos biossurfactantes em inibir e / ou matar microrganismos. Os referidos autores discorrem que um grande problema em muitos estudos é a falta de evidências de pureza completa ou caracterização das frações ativas do biossurfactante utilizadas.

E possível avaliar de forma clara, através das pesquisas já desenvolvidas, que a aplicação de biossurfactantes na saúde bucal ainda está em um estágio inicial, com capacidade promissora e em desenvolvimento. Porém deve-se levar em conta a importância de desenvolver pesquisas e trabalhar de forma multidisciplinar quando se pretende investigar os biossurfactantes, por se tratar de uma área de pesquisa bastante complexa (ELSHIKH, MARCHANT, BANAT, 2016).

Estudos sobre a eficácia de produtos que influenciam a adesão e colonização bacteriana sobre as superfícies dentárias tem sido descrita sem alguns trabalhos, apesar de serem ainda em número reduzido. Elshikh, Marchant, Banat (2016) afirmam que os resultados da pesquisa nesta área revelam que os biossurfactantes têm potencial para serem aplicados em diferentes áreas relacionadas com a boca o que tornaria os biossurfactantes candidatos potenciais importantes para aplicações relacionadas à saúde bucal. Farias (2019a) salienta que dentre os compostos alternativos, naturais e pouco tóxicos que podem ser usados em substituição aos produtos sintéticos existentes estão os biossurfactantes, conforme apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Uso de biossurfactantes na área odontológica

Biossurfactante	Produtor	Principais conclusões /atividade biossurfactantes	Referências
Não Caracterizado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida bombicola</i>	Enxaguatórios bucais à base de biossurfactantes são alternativas seguras, válidas e viáveis. A interação quitosana + biossurfactantes tem efeito antimicrobiano aumentado para bactérias Gram-positivas <i>S. aureus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. salivarius</i> e <i>S. mutans</i> .	(FARIAS et al., 2019)
Não caracterizado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Candida bombicola</i>	Creme dentais com biossurfactantes são promissores quando comparadas ao creme dental comercial. Formulações testadas inibiram a viabilidade celular de <i>S. mutans</i> no biofilme formado	(FARIAS, 2019)
biossurfactante lipopeptídico SPB1	<i>Bacillus subtilis</i> SPB1.	O biossurfactante SPB1 apresentou potencial utilização na formulação de creme dental. A atividade antimicrobiana do dentifrício com BS demonstrou eficácia contra <i>Enterobacter</i> sp e <i>Salmonella typhimurium</i> .	(BOUASSIDA, et al., 2017)
Glicoproteína Não caracterizado	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>L. casei</i> / <i>L. reuteri</i> / <i>L. fermentum</i>	Efeito do tipo de biossurfactante na expressão de genes de <i>S. mutans</i> de genes de glucosiltransferase (gtfB e gtfC) e fructosiltransferase (ftf) - formação de matriz de biofilmes. Todos os genes encontrados foram regulados após a aplicação do biossurfactante.	(SAVABI et al., 2014) (SALEHI et al., 2014) (TAHMOURESPOUR, SALEHI & KASRAKERMANS HAHI, 2011)
Não caracterizado	<i>Robinia pseudoacacia</i> e <i>N.oleandae</i>	Prevenção da formação de biofilmes em silício e resina acrílica para próteses dentárias.	(COCHIS et al., 2012)
Rhamnolípido não caracterizado	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50% e 67% de inibição da formação de biofilme de <i>Y. lipolytica</i> (placa de 96 poços e superfície de vidro).	(DUSANE et al., 2012)
Descaracterizado	<i>Candida lipolytica</i>	O biossurfactante induz a inibição visível de vários biofilmes de cepa de <i>Lactobacillus</i> e <i>S. mutans</i> HG985 em diferentes concentrações.	(RUFINO et al., 2011)
Descaracterizado	<i>Lactobacillus paracasei</i> A20	As atividades antimicrobianas e anti-aderentes do extrato bruto de biossurfactante foram investigadas. Boa eficácia <i>in vitro</i> nas concentrações entre 25 e 50 mg/ml contra vários agentes patogênicos.	(GUDIÑA et al., 2010)
Caracterização parcial lipoproteína	<i>Lactococcus lactis</i> 53	Eficácia do biossurfactante extraído contra microrganismos isolados de uma prótese de voz explantada.	(RODRIGUES et al., 2006)
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Controle da placa dentária e cárie	US 4737359 A. Patente

Fonte: FARIAS, 2019 com atualizações.

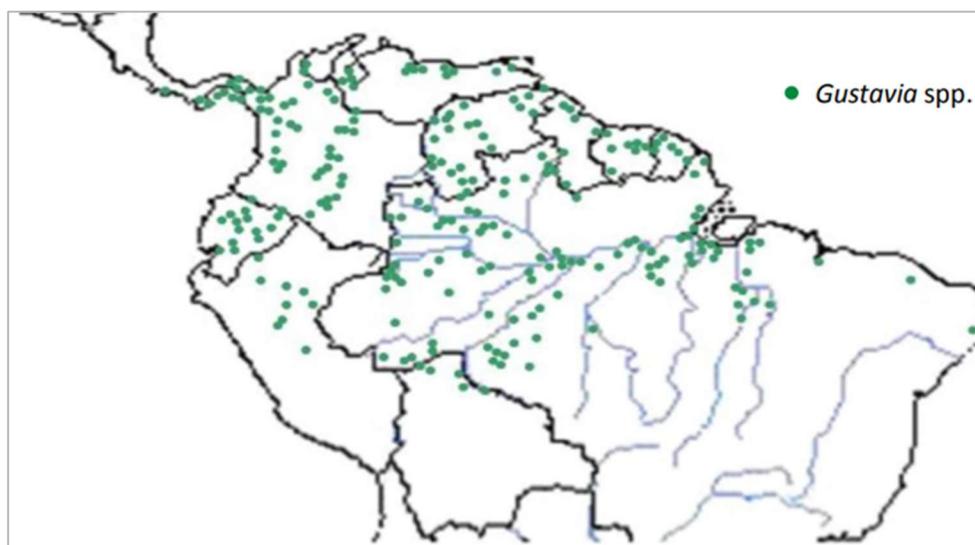
Conforme relatos na literatura, as propriedades dos biossurfactantes, tais como: atividade antimicrobiana (biocida ou bioestática) e contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, capacidade de formação de emulsão e a capacidade de aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, além de algumas atividades anticâncer em relação a algumas linhas celulares, tornam os biossurfactantes candidatos potenciais em produtos cosméticos ou terapêuticos de higiene oral e também em dispositivos médicos relacionados com a saúde oral (ELSHIKH, MARCHANT, BANAT, 2016).

2.7 A PLANTA HOSPEDEIRA - *Gustavia* cf. *hexapetala* (Lecythidaceae)

Lecythidaceae é uma família Pantropical, com pequenas a grandes árvores e arbustos e conta com 24 gêneros e aproximadamente 300 espécies (MORI et al., 2007). Apresentam seu melhor desenvolvimento nas florestas úmidas, especialmente as da América do Sul (MORTON et al., 1977). Pouco mais de 50% das espécies neotropicais são vistas na Amazônia, principalmente na Amazônia central e nas florestas do Rio Negro. Exemplos de plantas dessa família são a castanheira (*Bertholletia excelsa*), jarana e a sapucaia (*Lecythis*), que chegam a atingir 55 metros de altura (MORI, 2001). Mori (1979) e os frutos indeiscentes são plesiomorfias que compartilham com as Lecythidaceae do Velho Mundo (MORI et al. 2007). A figura 5 mostra sua distribuição que vai de Vera Cruz, no México, ao Brasil Meridional (RIBEIRO et al., 1999; MORI e PRANCE, 1981).

O gênero *Gustavia*, pertencente à família Lecythidaceae, possui cerca de 40 espécies distribuídas na América Tropical (PRANCE e MORI, 1979). No Brasil ocorrem dez espécies sendo quatro endêmicas, seu domínio fitogeográfico é Amazônia e Mata Atlântica e sua distribuição geográfica Norte, Nordeste e Centro Oeste. Quanto a forma de vida podem ser arbustos ou árvores (FLORA DO BRASIL, 2020). É um gênero basal dentro das Lecythidaceae Neotropicais. As principais características do gênero são flores actinomorfas, a presença do hábito paquicaule (forma de crescimento em que as folhas, geralmente grandes, ficam inseridas de forma congesta na porção apical de poucos ramos terminais, segundo definição de Prance e Mori (1979) e os frutos indeiscentes são plesiomorfias que compartilham com as Lecythidaceae do Velho Mundo (MORI et al. 2007).

Figura 5: Distribuição geográfica de *Gustavia* spp. De Vera Cruz no México ao Brasil Meridional.



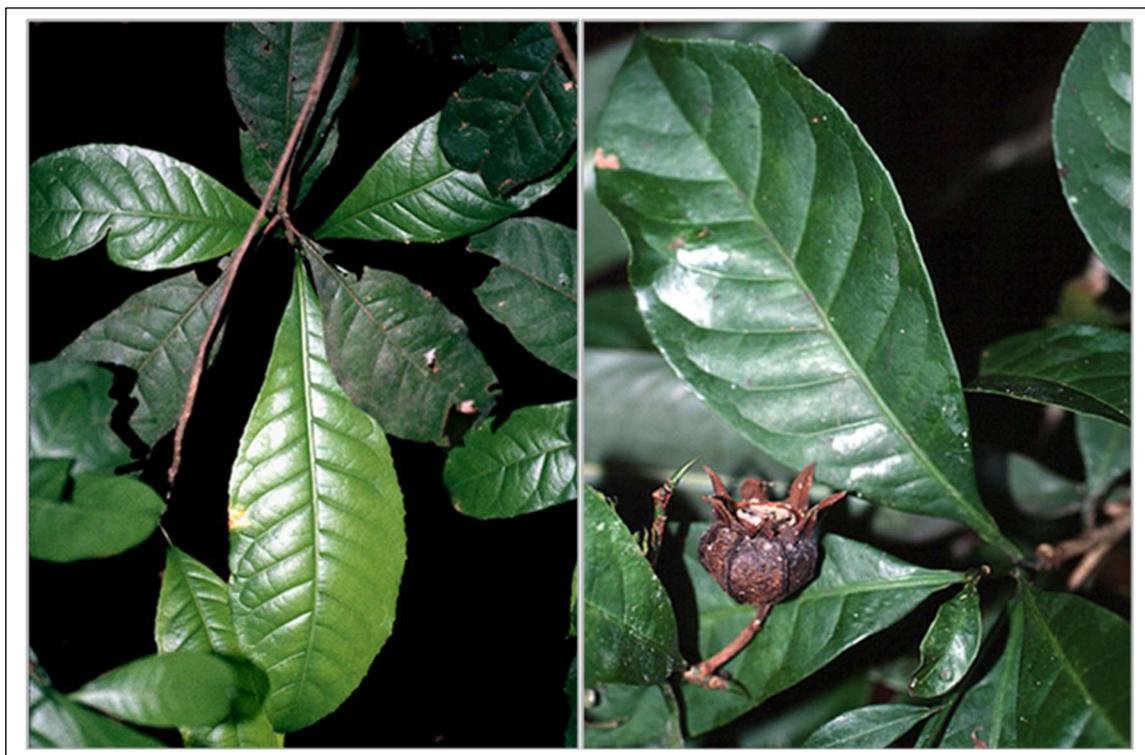
Fonte: ALMEIDA 2014, Adaptado de PLANCE e MORI, 1979.

As utilizações de espécies deste gênero para estudos químicos ainda são escassas, mas já vêm sendo realizadas, principalmente para tratamento de leishmaniose (GRENAND et al, 1987), durante estes estudos foi possível constatar atividades anti-tumorais e anti-inflamatórias (BASTOS et al. 2007).

Vários compostos químicos já foram isolados de espécies pertencentes ao gênero *Gustavia*. El-Seide et al (1999) isolou 10 substâncias ao estudar os estratos de casca do caule de *G. longifolia*. Souza et al., 2001 realizou estudos com casca do caule de *G. augusta* e isolou 16 substâncias. Pettit; Zhang; Penilla (2004) isolou 4 substâncias dos extratos de casca do caule e galhos de *G. hexapétala*. Melo (2003) e Almeida et al (2011) utilizaram casca do caule e folhas de *G. eliptica* em suas pesquisas e isolaram 14 substâncias. Esses estudos possibilitaram o isolamento e a identificação de 40 substâncias diferentes nas 4 espécies do gênero *Gustavia* estudadas. Esses resultados mostram o grande potencial do gênero para a produção de produtos bioativos de interesse.

A espécie *Gustavia hexapétala*, (Alb.) Sm. (Figura 6) tem sido relatada por suas propriedades medicinais uma vez que uso das cascas do caule são descritas como anti-reumática (Revilla 2002), o uso das folhas no tratamento de problemas hepáticos e redução de úlceras, dos frutos como vomitivos ou eméticos (indução do vômito) e da casca da raiz como tônica e laxativa (Corrêa, 1994).

Figura 6: Aspectos morfológicos de folhas de *Gustavia hexapetala* (Lecythidaceae).



Fonte: Foto: ©ROBIN B. FOSTER, BOLIVIA.

<https://plantidtools.fieldmuseum.org/es/nlp/catalogue/3669766>

Conforme os dados disponíveis na literatura os microrganismos endofíticos de plantas medicinais podem sintetizar metabólitos secundários de grande interesse (KUSARI et al., 2008; FACUNDO et al., 2008). Neste contexto, a microbiota associada às plantas amazônicas se apresenta como uma fonte economicamente promissora de bioativos (PEREIRA et al., 2017). Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, avaliando o potencial de fungos endofíticos isolados de *Gustavia elipita*, verificou-se a produção de substâncias com atividade antimicrobiana e citotóxica (ALMEIDA, 2014; PEREIRA et al., 2017).

Uma visão geral sobre biodiversidade e potencial biotecnológico de microrganismos da Amazônia Brasileira foi apresentado por Pereira et al. (2017), no qual mostra os resultados de pesquisas do primeiro estudo de fungos endofíticos de *G. eliptica* coletados no Amazonas. O referido estudo realizado por Almeida (2014) proporcionou o isolamento de 93 fungos endofíticos dos tecidos vegetais (folha, galho, caule e raiz) de *G. eliptica* os quais posteriormente foram classificados nos seguintes gêneros: *Fusarium*,

Xylaria, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* e *Colletotrichum* (*Glomerella*), *Nectria* e outros quatro Ascomycetos desconhecidos.

Ensaio biológicos dos extratos contra patógenos (bactérias Gram negativas, Gram positivas e uma levedura), indicou potencial para os extratos de *Nectria setofusariae*. Frações dessa linhagem e de *Penicillium chrysogenum* mostraram-se as mais promissoras contra os patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Os ensaios citotóxicos de extratos, frações e compostos puros mostraram alto potencial citotóxico contra três linhagens de células tumorais para uma fração de *N. setofusariae* contra células de Cólon e Ovário e esterigmatocistina de *P. chrysogenum* contra células de leucemia, ovário e cólon (PEREIRA et al., 2017; ALMEIDA, 2014).

Os estudos químicos dos extratos fúngicos resultaram na identificação por meio de análises 1D e 2D NMR e espectrometria de massa de vários constituintes, conforme mostrado na Tabela 6. Estes estudos mostram a importância de conhecer o potencial promissor destes microrganismos isolados de plantas do gênero *Gustavia* para a biotecnologia e desenvolvimento de novos produtos.

Tabela 6: Substâncias isoladas de extratos de fungos endofíticos isolados de *G. elliptica*.

Endofíticos	Substâncias químicas identificadas nos extratos fúngicos		
<i>X. adscendens</i>	ácido piliforme	5-carboxilmelleína	-
<i>Aspergillus sp.</i>	mistura de ácido fenilacético	4-metoxifenilacético	-
<i>N. setofusariae</i>	ácido fusárico	ácido fenilacético	-
<i>P. chrysogenum</i>	peróxido de ergosterol (endo e exo)	bisorbicilinoídeos: tricodimerol, dihidrotrichodimerol, tetrahydrotrichodimerol	mistura de ácidos graxos, esterigmatocistina (STC);

Fonte: ALMEIDA 2014; PEREIRA et al., 2017

Considerando o potencial dos microrganismos endofíticos (fungos, bactérias e leveduras) associados com as plantas tropicais, em particular com espécies medicinais, a prospecção para o isolamento e a consequente possibilidade de se obter metabólitos de interesse biotecnológico como os biossurfactantes, a partir destes isolados, este trabalho visa contribuir para a descoberta de microrganismos com potencial para a produção de moléculas antimicrobianas contra patógenos da microbiota oral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a produção e a atividade de biossurfactantes obtidos de fungos endofíticos de *Gustavia cf. hexapetala*, contra patógenos da cavidade oral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a diversidade de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapetala*.
- Identificar fungos potencialmente produtores de biossurfactantes isolados de *Gustavia cf. hexapétala* em diferentes meios de cultivo.
- Realizar a caracterização morfológica e molecular dos fungos endofíticos mais promissores para a produção de biossurfactantes.
- Determinar índice de emulsificação, tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes extraídos dos meios de cultivo dos fungos mais promissores.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos com biossurfactantes contra patógenos da cavidade oral.
- Analisar o perfil químico dos extratos fúngicos que apresentarem os melhores resultados para produção de biossurfactantes.

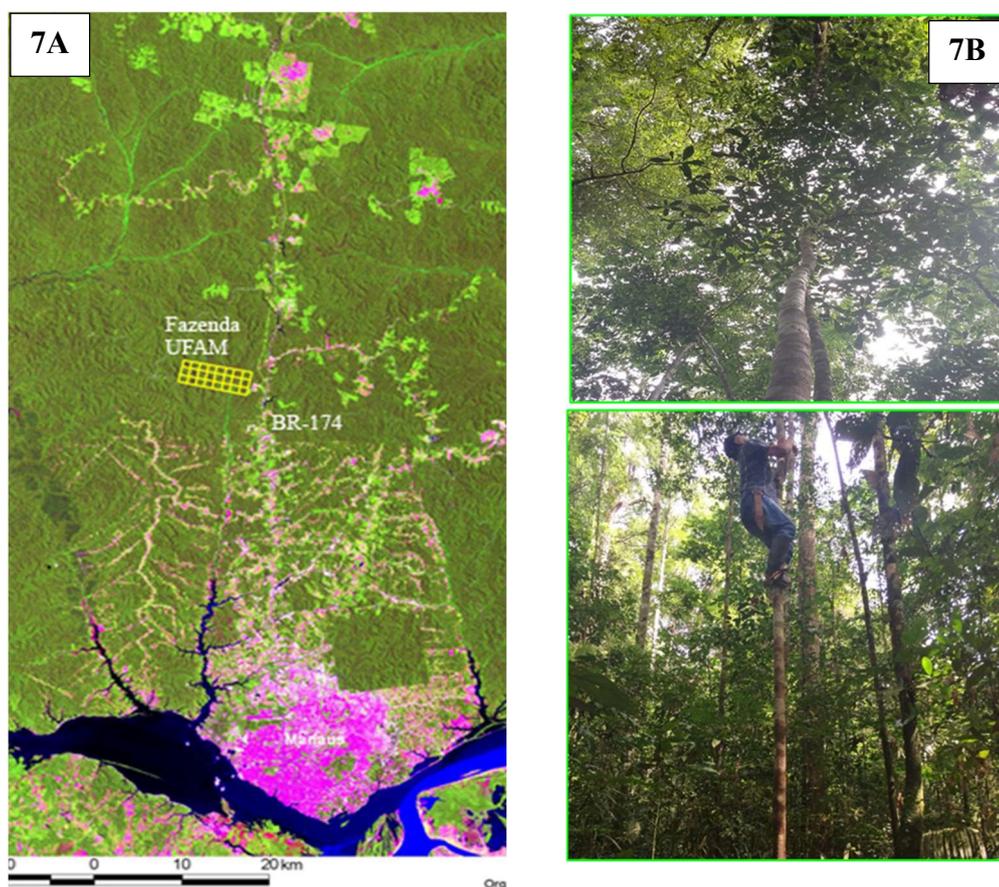
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DmE *Gustavia* cf. *hexapétala*

4.1.1 Coleta do material botânico

Os materiais botânicos foram coletados na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizada no km 38 da BR-174, de coordenadas geográficas: 020° 30' 40.9" S e 60° 02' 56.9" O. A coleta de folhas e galhos da planta *G. cf. hexapétala* foi realizada no final do mês de março de 2016, estação chuvosa na região Amazônica, utilizando-se como critérios de escolha: folhas e galhos com aparência sadia, sem sintomas visuais de doenças ou lesões. (Figuras 7A e 7B).

Figura 7: Localização geográfica do local de coleta do material botânico (Figura 7A); Vegetal onde foi realizada a coleta (Figura 7B).



FONTE: - Foto por GPS – Fazenda Experimental da UFAM (km 38 BR-174) <https://ppbio.inpa.gov.br/sitios/fazufam>; - Figura 7A.
Arquivo Pessoal (FERREIRA,2016) - Figura 7B.

Na sede da Fazenda Experimental, os materiais botânicos foram selecionados e pré-lavados com água estéril, armazenados em sacos plásticos limpos e acondicionados em caixa de isopor com bolsas de gelo, para conservação do material coletado (Figura 8). Em seguida foram transportados para o Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA), no Centro de apoio Multidisciplinar (Central Analítica) da UFAM.

Figura 8: Lavagem de folhas e galhos após coleta (Figura 8 A). Acondicionamento do material botânico pós lavagem, para serem transportados ao local de processamento (Figura 8 B).

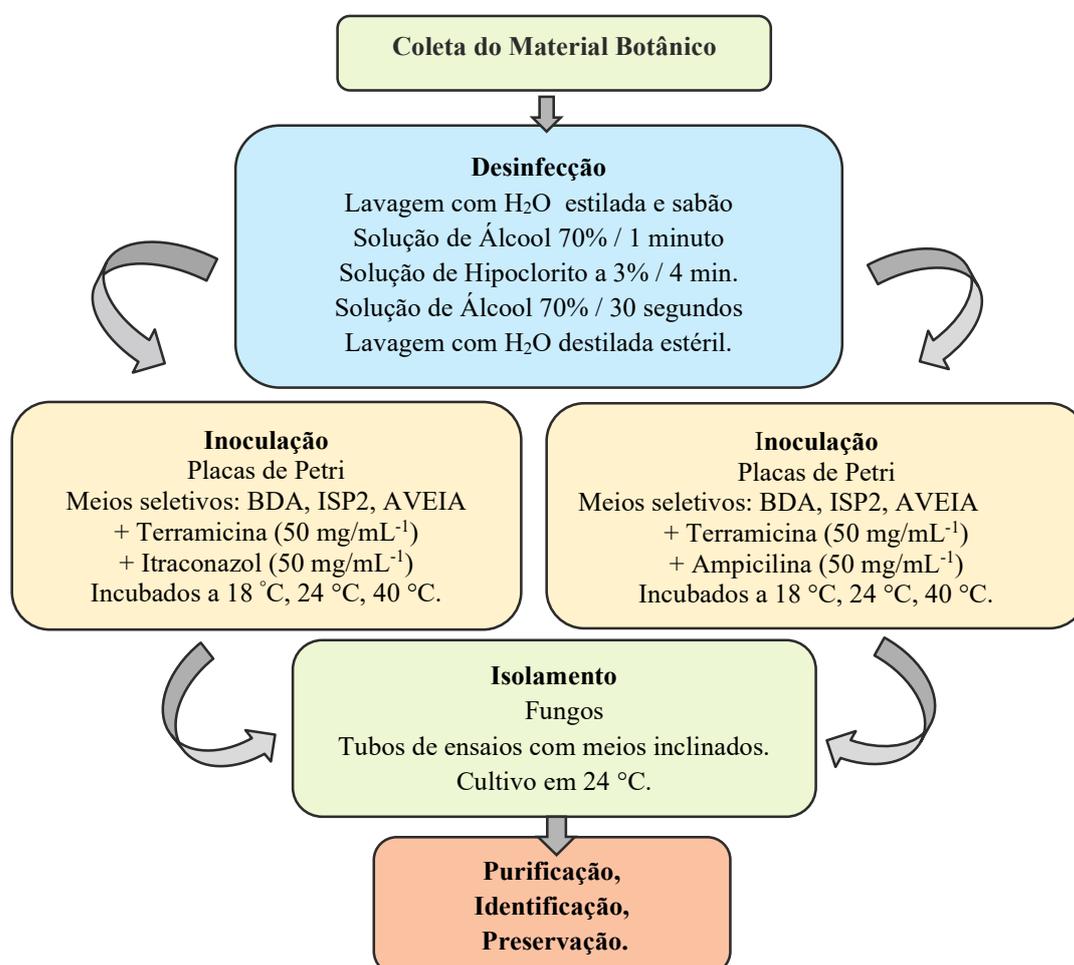


Fonte: Arquivo pessoal (FERREIRA, 2016)

4.1.2 Desinfecção do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos de *G. cf. hexapetala*

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 h após a coleta, sendo lavado com água corrente e detergente neutro com o auxílio de uma esponja nova e macia para retirar o excesso de epifíticos. Em seguida, em cabine de segurança biológica, o material foi imerso em um recipiente com álcool 70% por 1 min, em hipoclorito de sódio a 3% por 4 min, e novamente em álcool 70% por 30s para retirar o excesso da solução de hipoclorito de sódio. Processou-se inicialmente as folhas e com novas soluções desinfetantes foi realizado a antissepsia dos fragmentos de galhos. Em seguida, o material vegetal foi individualmente lavado em novo recipiente contendo água destilada estéril da qual se retirou 50 μ L, utilizando uma pipeta calibrada para fazer o controle da antissepsia, dispensando esse volume em placas contendo os três diferentes meios e assim realizar o controle do crescimento de epifíticos (PEREIRA, 1993; SOUZA, 2006). A Figura 9 apresenta de forma resumida a metodologia utilizada para o isolamento dos fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapétala*.

Figura 9: Fluxograma da Metodologia de isolamento dos microrganismos endofíticos de *Gustavia* cf. *hexapetala*.



Após a antissepsia, 4 pequenos fragmentos dos tecidos vegetais, medindo aproximadamente 0,5cm de diâmetro foram inoculados em placas com diferentes meios na forma de matriz 2 x 2, (Figura 10).

Figura 10: Antissepsia e Inoculação (folhas e galhos) nas placas de Petri.



A realização do estudo utilizando diferente meios, diferentes temperaturas e diferentes combinações de antibióticos para o isolamento visou ampliar a seleção dos fungos endofíticos isolados. Todo o experimento foi realizado em triplicata. As placas com os fragmentos vegetais foram vedadas com filme plástico e incubadas em 3 temperaturas controladas: 18 °C, 24 °C e 40 °C, em incubadora BOD por 15 dias conforme apresentado e descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Condições de cultivo para o isolamento dos endofíticos de *Gustavia cf. hexapétala*.

Temperatura	Meios e Antibióticos*						Total de Placas	
	AVEIA		BDA		ISP2		Folha	Galho
18°C	T+A	T+I	T+A	T+I	T+A	T+I	18	18
24°C	T+A	T+I	T+A	T+I	T+A	T+I	18	18
40°C	T+A	T+I	T+A	T+I	T+A	T+I	18	18
Total de Placas inoculadas	09	09	09	09	09	09	54	54
Controle	03	03	03	03	03	03		
Total de fragmentos inoculados							216	216

*T + A Tetraciclina + Ampicilina; T+I: Tetraciclina + Itraconazol

Os fungos endofíticos começaram a ser transferidos após 24 horas de incubação para tubos de ensaio com os meios específicos onde foram inicialmente isolados (AVEIA, ISP2 e BDA). As placas com o material vegetal inoculado foram monitoradas diariamente até completar o tempo previsto para o experimento (15 dias) e realizar a coleta e transferência de cada nova linhagem para os tubos de ensaio contendo os mesmos meios de cultura inclinados e cultivados em 24°C. As soluções para antissepsia do material vegetal, preparação das soluções com antibióticos e preparo dos meios de cultivo (BDA+L, AVEIA e ISP2) contam no apêndice A.

4.1.3 Purificação, identificação e preservação dos endófitos isolados de *G. cf. hexapetala*

Concluída a etapa de isolamento dos fungos endofíticos, a etapa de purificação iniciou com a realização de repiques sucessivos e transferência das cepas dos tubos inclinados para placas de Petri contendo os mesmos meios de cultura do isolamento, com antibiótico para as culturas contaminadas e sem antibióticos para as que, aparentemente, não tinham contaminantes. A purificação foi feita com base na técnica de tween (Azevedo e Costa, 1973) quando apresentaram conídios ou esporos e repiques sucessivos para os que foram *Mycelia sterilia*. Dessa forma, para obtenção de culturas puras foi realizado os seguintes procedimentos: plaqueamento com três ou quatro pontos equidistantes e cultura de ponto central, microcultivo com cultura monospórica para as culturas mitospóricas. Os isolados purificados foram posteriormente conservados em quintuplicata pelos métodos Castellani (1939) e em glicerol a 20% (SOUZA et al., 2004), posteriormente, armazenados a -20 °C.

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada através da análise macromorfológica por observação das características presente nas colônias de cada indivíduo, tais como: aspecto, forma, coloração e consistência das colônias. Para visualização das estruturas microscópicas (hifas, micélio e estruturas de reprodução - sexual e assexual) foram produzidas lâminas a fresco e semipermanentes pela técnica de microcultivo, utilizando corante azul de lactofenol (blue coton) sobre as lâminas de microscopia. As estruturas foram visualizadas em microscópio óptico binocular ZEISS® acoplado a câmera fotográfica com auxílio das objetivas com aumento de 10x 20x e 40x. As imagens das estruturas observadas foram fotografadas e comparadas com imagens da literatura especializadas em taxonomia de cada grupo (GILMAR, 1959; BONONI, 1998; KIFFER e MORELET, 1999; GUERRERO e SILVEIRA, 2003). A atividade de pesquisa foi Registrada no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) com o número A3 F9157.

4.1.4 Cálculo da frequência de isolamento

Foi realizada uma coleta de material botânico da planta selecionada no período chuvoso (final do mês de março de 2016). Os resultados foram analisados para avaliação do índice de colonização e a taxa de frequência dos endófitos isolados a partir dos fragmentos inoculados. O índice de colonização e as taxas de frequência foram calculados conforme descrito por Azevedo (1998), representadas a seguir:

Taxa de Colonização:

$$Cr = \frac{\text{Número Total de Isolados } \geq 1}{\text{Número de Fragmentos da Amostragem}}$$

Frequência Relativa:

$$Fr = \frac{\text{Número Total de Isolados de um Grupo} \times 100}{\text{Número de Isolados Total}}$$

4.2 SELEÇÃO DE ENDÓFITOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Na seleção dos fungos representativos de diferentes morfogrupos de endófitos isolados de *G. cf. hexapetala* foram utilizadas 24 cepas preservados em Castellani (1939). Foram selecionados de 1 a 3 fungos representativos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* e outros não identificados. Na seleção foi considerado os critérios em que houve maior destaque no número de isolado para os fragmentos de folhas e galhos e dessa forma as cepas selecionadas foram provenientes do meio de cultivo BDA+L e temperatura de isolamento de 24 °C. A reativação foi feita em placas de Petri contendo 25 mL de meio em cada placa (BDA+L). O meio foi enriquecido com 0,5 g/L de óleo de soja, para adaptação dos fungos à fonte indutora da produção de biossurfactantes e mantidos em temperatura de 28° C, por cinco dias.

4.2.1 Meios de Cultivo para Produção de Biossurfactantes

4.2.1.1 Composição do meio mineral + óleo de soja (0,5 g/L)

O meio de cultura mineral conforme descrito por Jacobucci (2000), foi composto por: 0,5 g/L de sulfato de magnésio (MgSO₄), 3,0 g/L de fosfato dissódico (Na₂HPO₄), 1,0 g/L de fosfato de monopotássio (KH₂PO₄) e 1,3 g/L de extrato de levedura diluídos em água destilada. Em frascos Erlenmeyers de 250 mL, 100 ml do meio de cultura foi distribuído e autoclavado a 1 ATM em temperatura de 121 °C por 15 min. Foi acrescido ao meio 0,5 g/L de óleo de soja filtrado em membrana millipore 0,22 µm, após autoclavagem do meio.

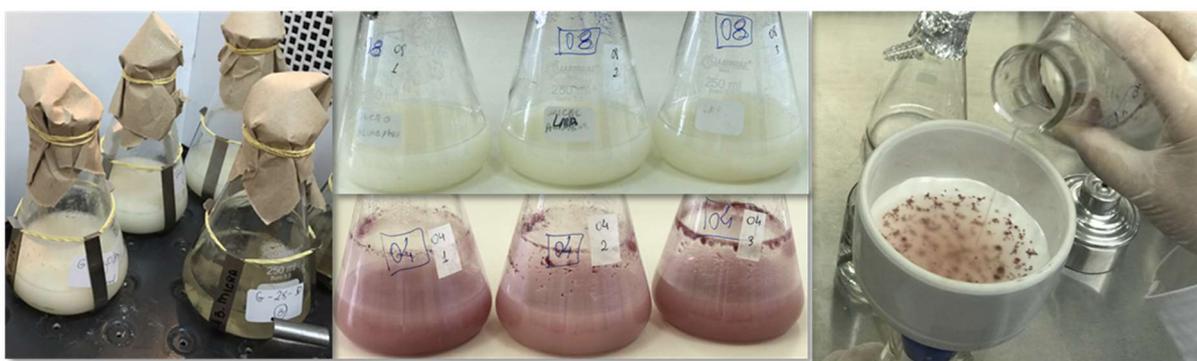
4.2.1.2. Composição do Meio de Cultura BDL + óleo de soja (0,5 g/L)

Em cada litro de meio de cultura foi utilizado: Água destilada para cozimento de 200 g de batata cortada em cubinhos (2cm x 2cm), 20 g de dextrose e 2 g de extrato de levedura (SOUZA, 2004). A batata foi cozida e em seguida o caldo do cozimento foi coado. Adicionou-se água destilada ao caldo da batata até completar o volume final de 1L. Posteriormente 100 mL do meio de cultivo foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 250 mL, autoclavado e adicionado 0,5 g/L de óleo de soja em condições semelhantes ao item 4.2.1.1.

4.2.2 Cultivo de fungos nos meios indutores

Em cada frasco Erlenmeyers contendo os meios líquidos (Mineral ou BD +L) foram adicionados cinco fragmentos do micélio de cada fungo selecionado, com dimensão de 5x5 mm, recortados com auxílio de lâminas de bisturi estéril (SOUZA, 2001). Cada experimento foi realizado em triplicata. Os frascos de meios com os fragmentos dos fungos foram incubados em Shaker (Innova Incubator Shaker) por 10 dias, em 28 °C e 170 rpm. Foram utilizados como controles frascos contendo os mesmos meios com o óleo de soja, mas sem a presença de fragmentos fúngicos (BATISTA, 2009; BATISTA et al., 2016). Após o crescimento microbiano, os meios de cultivo foram filtrados com auxílio de bomba a vácuo em papel filtro autoclavado (Figura 11) e transferidos para tubos falcons estéreis de 50 mL. Em seguida foram centrifugados (Centrífuge 5424-Eppendorf) por 20 minutos a 4000 rpm e filtrados em membrana millipore 0,45µm para obtenção dos extratos livres de células. Para a realização dos testes futuros os sobrenadantes foram congelados à -20 °C. Todos os experimentos foram realizados em ambiente estéril (Cabine de Segurança Biológica- Pachane ® PA 420, Brasil).

Figura 11: Cultivo em meio líquido e filtração dos caldos metabólitos dos fungos endofíticos.



4.2.3 Determinação do Índice de Emulsificação

A produção de biossurfactante foi avaliada a partir da análise da atividade de emulsificação água em óleo (A/O). Os experimentos foram realizados de acordo com o item 4.2.2. Para cada 3,5 mL dos caldos de cultivo, foram adicionados 2 mL de óleo de soja em tubos de ensaio, em triplicata, realizando-se a medida da altura total do conteúdo adicionado ao tubo de ensaio. Cada amostra foi agitada durante 2 minutos, em 2000 rpm, medindo-se a altura da emulsão formada logo após 5 min e após 24 h em repouso. Após esses períodos, a altura do óleo emulsificado (cm) foi comparado à altura total adicionada (COOPER E GOLDENBERG, 1987). O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado pela equação abaixo:

$$E_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100$$

Sendo:

E_{24} = Índice de emulsificação após 24 h (%)

He = Altura da emulsão

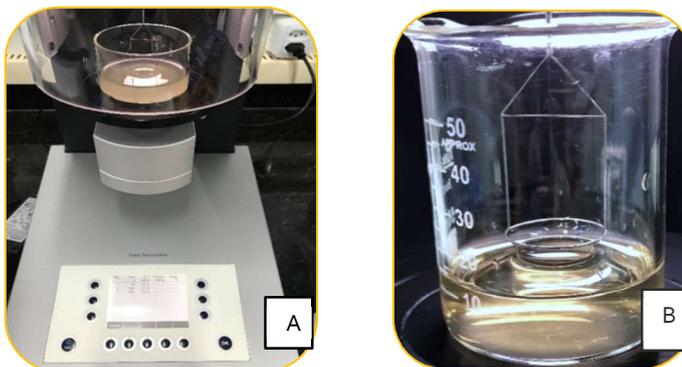
Ht = Altura total

4.2.4 Medida da Tensão Superficial

A determinação da tensão superficial é um importante parâmetro para indicar a presença do biossurfactante no caldo de fermentação. Quanto mais eficiente for o biossurfactante, menor será o seu valor. A medida da tensão superficial dos extratos microbianos foi realizada no tensiômetro (Kruss® modelo K20), que utiliza o método do anel (Du Noüy). O tensiômetro (Figura 12-A) foi programado para realizar cinco medições para cada um dos sobrenadantes de cada triplicata, sendo considerada a média aritmética dos resultados (JACKISCH-MATSUURA et al., 2014). Para cada amostra foram utilizados 30 mL dos caldos livres de células em temperatura de 25 °C. Antes das medições, o anel foi calibrado verificando a tensão superficial da água destilada, cujo valor é de aproximadamente 72,8 mN/m. Entre cada medição das triplicatas o anel foi lavado com acetona e água ultrapura (Milli-Q®). A Figura 12-B mostra o anel ainda em contato com a superfície do caldo de cultivo sem haver rompido a tensão superficial do líquido em estudo. O experimento foi

realizado na Central de Análises Químicas da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

Figura 12: Medida da Tensão Superficial no tensiômetro (A), que utiliza o método do anel (B) (Du Noüy).



4.2.5 Variação da produção de biosurfactantes

Após os resultados obtidos através dos testes de determinação do Índice de Emulsificação e da Tensão Superficial, foram selecionados os melhores fungos produtores de biosurfactantes para realizar novos ensaios a fim de avaliar o melhor tempo de produção das moléculas de interesse. O experimento foi realizado utilizando o meio mineral conforme descrito no item 4.2.1.1. O pH do meio de cultura foi aferido em 7,0. O experimento foi planejado para ocorrer durante um período de 14 a 16 dias de cultivo em incubadora (Khaker Solab®) a 28 °C, e 120 rpm. A cada 48 h o caldo de cultivo de uma das triplicatas do experimento foi filtrado e realizada a medida da tensão superficial do filtrado livre de células. O controle continha apenas o meio de cultivo acrescido do óleo de soja sem os fragmentos de fungos. O experimento foi realizado no Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia – LABMICRA - Central Analítica da UFAM.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Os procedimentos de extração de DNA foram realizados no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas. A PCR e o sequenciamento foram feitos no laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA - Amazônia Ocidental.

4.3.1 Extração de DNA e PCR das Regiões ITS-1 a 2 dos fungos endofíticos

As linhagens fúngicas selecionadas como produtoras de biossurfactantes, a partir dos testes de emulsificação e análise da tensão superficial foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BD+L (SOUZA, 2001) por 48 horas a 30 °C e 120 rpm. Após esse período o cultivo foi filtrado a vácuo em filtro de papel autoclavado, sendo obtida a massa micelial para extração de DNA. O DNA total foi extraído com kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™, de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo A).

A quantificação do DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Após obtenção do DNA total, foi realizada a amplificação de um fragmento interno com, aproximadamente, 700 pb das regiões *Its*-1 a 2 do rDNA. Nessa etapa foi utilizado os primers *Its1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e *Its4* (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). As reações de amplificação tiveram o volume final de 25 µL utilizando 2 µL de DNA e 2 µL de cada Primer (10 pmol) e mais 19 µL de água ultrapura (milliQ®). A amplificação foi realizada em termociclador Thermal Cycler®. O Termociclo da reação foi: um ciclo inicial a 94 °C por 4 min seguido por 35 ciclos de 94 °C por 2 min, 55 °C por 2 min e 72 °C por 2 min. Ao final mais um ciclo a 72 °C por 10 min e para finalizar a 4 °C, conforme Souza, (2006).

A verificação do produto da PCR foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% coradas com gel Red e como marcador foi usado o Ladder de 1 Kb plus da Invitrogen®. Após a corrida, o gel foi fotodocumentado pelo Sistema de Fotodocumentação L-Pix Touch Locus®, posteriormente os amplicons seguiram para a etapa de sequenciamento.

4.3.2 Sequenciamento e Análise das Sequências

Os produtos da PCR foram purificados com polietilenoglicol (PEG). Após a quantificação a concentração foi ajustada para 10 ng/ μ L. O sequenciamento foi realizado pelo método Sanger, usando o kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA). As sequências obtidas foram analisadas com o Editor de Alinhamento de Sequência BioEdit (versão 7.2.5) e comparadas com sequências depositadas na base de dados do NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information). As sequências que compartilharam 98 - 100% de semelhanças foram identificadas como sendo da mesma espécie, quando os dados apresentados estiveram de acordo com as análises morfológicas e de literatura.

4.4 CULTIVO EM ESCALA AMPLIADA DOS FUNGOS MAIS PROMISSORES PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

As cepas que apresentaram os melhores resultados durante a análise de tensão superficial foram selecionados para a continuidade da pesquisa. Os fungos utilizados foram cultivados em BDA a 28 °C por sete dias para a obtenção de conídios. A concentração de conídios foi determinada por contagem em câmara de Neubauer após diluição em solução de água destilada autoclavada contendo 20% de glicerol. A suspensão de esporos foi obtida dispersando 1 mL de água destilada autoclavada sobre a placa contendo o fungo, sendo feita uma raspagem por toda a superfície da cultura fúngica, usando uma alça de platina. Em seguida, os esporos foram recolhidos e transferidos para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 1%. A suspensão foi agitada em agitador por 2 minutos e a contagem dos esporos foi realizada com o auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio óptico.

O experimento foi realizado utilizando 14 frascos Erlenmeyer (1000 mL) para cada fungo. Em cada frasco foi adicionado 300 mL de meio mineral (item 4.2.2.1) acrescido de 0,5 g/L de óleo de soja. O pH do meio de cultura foi aferido em 7,0. A inoculação nos meios foi realizada adicionando-se suspensão de conídios com concentração final de 1×10^8 esporos mL^{-1} para cada 100 mL de meio (COSTA et al., 2012). O cultivo foi realizado durante 10 dias em incubadora Shaker em temperatura de 28 °C a 170 rpm, nas dependências do Laboratório de Purificação de Biomoléculas da UFAM (Bloco G). Após o tempo previsto do experimento os frascos com o caldo de cultivo foram processados no Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LABMICRA). O meio metabólico foi filtrado

com auxílio de bomba a vácuo em funil de Büchner usando touca de TNT e papel filtro autoclavados. Em seguida o filtrado metabólico foi centrifugado (Centrifuge Eppendorf®) em tubos falcons de 50 mL a 4000 rpm por 20 minutos. O volume total foi reunido em um frasco ambar e ao caldo livre de células foi adicionado 5% de metanol (MeOH) e 300 mL de Acetato de Etila (ACOET) e conservado na temperatura de 4 °C até o dia seguinte, quando foi realizado a partição dos metabólitos de interesse presentes no caldo de cultivo.

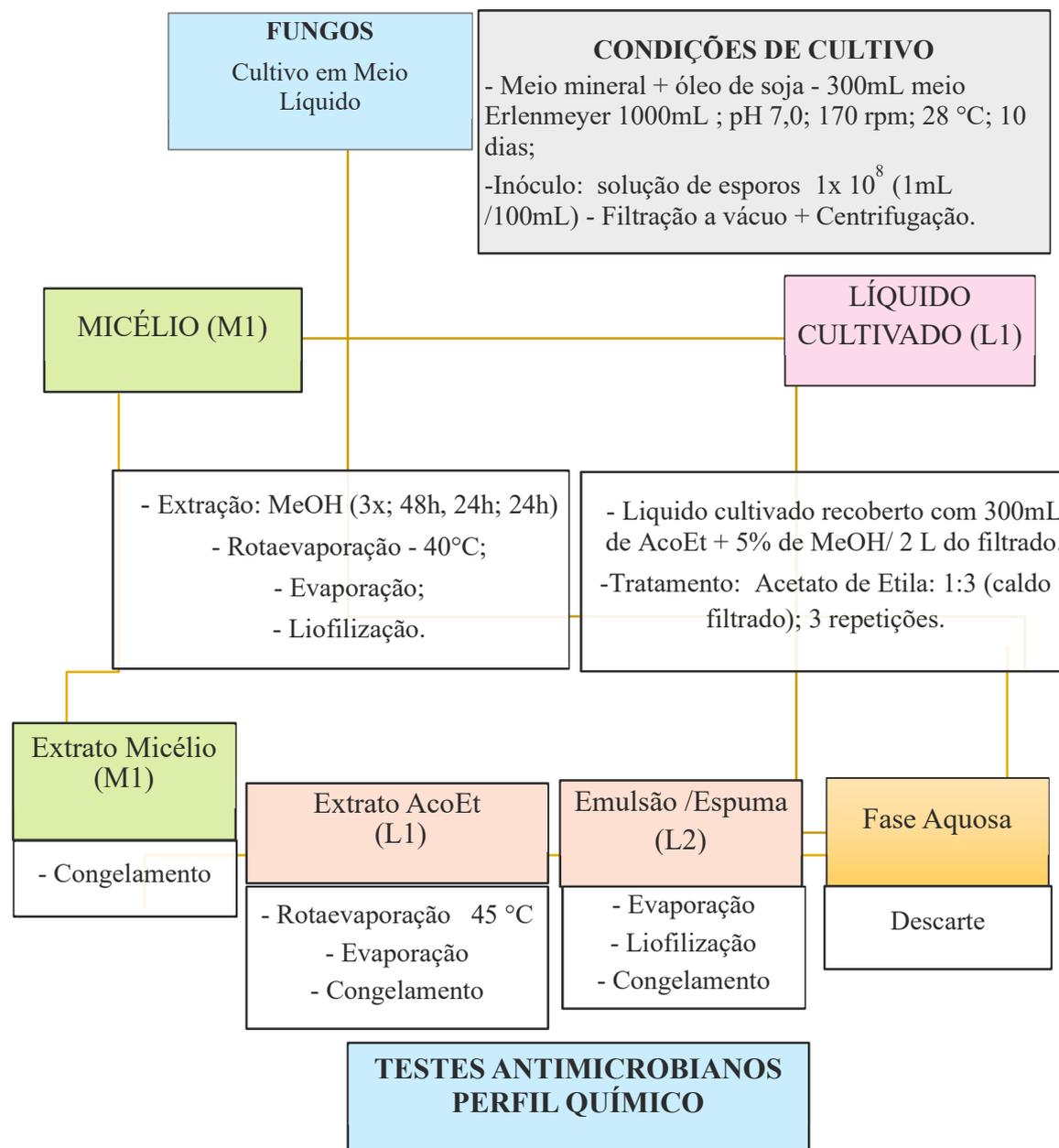
4.5 EXTRAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes foram isolados do meio de cultura livre de células por partição com acetato de etila de acordo com metodologia descrita por Hewald; Josephs; Bolker (2005), com modificações. Nesta técnica, foi adicionado 5% de metanol (MeOH) e Acetato de Etila (AcoEt) na proporção 3:1 ao caldo livre de células, em um balão de separação e o processo foi repetido 3 vezes. Essa etapa da pesquisa foi realizada no Laboratório de Abertura de Amostras e Ensaio Químicos - LAEQ - Central Analítica da UFAM.

A partição com acetato de etila resultou inicialmente em uma Emulsão/Espuma (Extratos L1.1 a L4.1) que foi coletada separadamente em um recipiente de vidro estéril. Posteriormente, seguiu-se as fases de evaporação e liofilização, pesagem e congelamento a -20 °C. A parte contendo o solvente (Extrato AcoEt - L1 a L4) foi concentrado em rotaevaporador a 45 °C e os resíduos de solvente ainda presente na amostra foi evaporado no interior de capela de fluxo até peso constante sendo posteriormente congelados a -20° C.

Os metabólitos da massa micelial (Extrato do Micélio - M1 a M4) foram extraídos em metanol (MeOH). Foi adicionado o solvente até que recobrisse todo o micélio em frasco tampado e colocado em repouso a 25 °C. O processo foi repetido uma vez em intervalo de 48h e duas vezes, em intervalos 24h. O filtrado foi reunido em um novo frasco e rotaevaporado a 40 °C. Os resíduos de solvente ainda presentes na amostra foram evaporados no interior de capela de fluxo até peso constante sendo, posteriormente, congelados a -20° C. Os extratos produzidos foram utilizados nas etapas posteriores da pesquisa. A Figura 13 representa um resumo das etapas para a produção dos extratos fúngicos.

Figura 13: Fluxograma para obtenção dos extratos fúngicos: Extratos do Micélio e do caldo de cultivo.



4.6 MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A Medida da Concentração Micelar Crítica foi realizada com os extratos brutos - FF 51 (extrato L1.1- espuma), FF17 (extrato L5), FF45 (extrato L.2.1 – espuma), FF 33 (extrato L4), contendo biossurfactantes obtidos pela seleção das melhores cepas produtoras da substância de interesse. A determinação da CMC foi realizada por meio da medição da tensão superficial dos extratos brutos em diferentes concentrações dissolvidos em água

ultrapura (Milli-Q®) utilizando o tensiômetro (Kruss® modelo K20). O experimento foi realizado na Central de Análises Químicas da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). O equipamento foi programado para realizar cinco medições para cada um dos extratos na concentração testada, sendo considerada a média aritmética dos resultados (JACKISCH-MATSUURA et al., 2014). A CMC foi determinada construindo-se gráficos da tensão superficial versus diferentes concentrações dos extratos contendo os biossurfactantes, após serem extraídos dos meios de cultivo. O ponto central de inflexão da curva determinou a CMC (SHEPPARD e MULLIGAN, 1987).

4.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Ensaio antimicrobianos com os extratos brutos dos fungos endofíticos produtores de biossurfactantes foram realizados para a avaliação de sua atividade frente a patógenos da cavidade oral. Os testes antimicrobianos foram realizados nas dependências do Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterapia na Odontologia – LABFITO, da Faculdade de Odontologia (FAO) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.7.1 Microrganismos teste

As cepas bacterianas padrão utilizadas neste estudo foram *Streptococcus mutans* - ATCC25175, *Lactobacillus casei* - ATCC7469, e a levedura *Candida albicans* CCCD- CC01- ATCC 10231. As bactérias testadas foram cedidas pelo Laboratório de Atividades Biológicas de Fitoterapia na Odontologia – LABFITO, da Faculdade de Odontologia (FAO) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A Levedura *C. albicans* foi cedida pelo Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia LABMICRA – CA, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os experimentos foram realizados no LABFITO-FAO-UFAM.

4.7.2 Reativação dos patógenos

A reativação dos patógenos foi realizada em diferentes meios de cultivo. A levedura *C. albicans* foi reativada em caldo Saboraud (KASVI®), o *L. casei* em caldo MRS (Sigma-Aldrich®, Suíça) e o *S. mutans* em caldo Brain Heart Infusion - BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO). Os cultivos foram mantidos, em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 a

48 h. Posteriormente, as bactérias foram cultivadas em ágar BHI e a levedura em ágar Saboraud. Os meios de cultura foram distribuídos em placas de Petri (90 x 15mm) a 40 °C. Em seguida, os inóculos foram mantidos em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 a 48 horas. Após esse período foram conservados em temperatura de 4 °C para posteriormente serem utilizadas nos experimentos desta pesquisa.

4.7.3 Padronização do inóculo

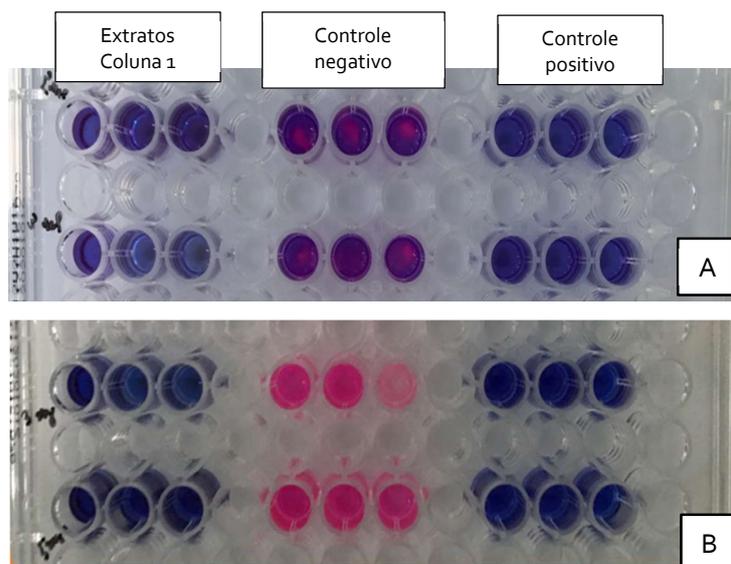
Para obtenção dos inóculos as bactérias foram repicadas e cultivadas em Placas de Petri em ágar BHI e a levedura em ágar Saboraud. Os cultivos foram obtidos no período de 24 h a 37 °C. Em seguida, em condições assépticas foram retiradas com alça de repique descartável e estéril (5 mm de diâmetro), alíquotas dos microrganismos, para inoculação em tubos cônicos de 50 mL estéreis contendo 5 mL de caldo de cultivo, sendo caldo Saboraud para *C.albicans* e caldo BHI para *L. casei* e *S. mutans*. Os meios líquidos contendo os patógenos foram colocados em estufa a 37 °C (overnigth) por 18 h, em aerofilia para a *C. albicans* e *L. casei* e em microaerofilia para o *S. mutans*. Após o período pré-determinado, os tubos contendo os patógenos foram agitados por 30 s e transferidas alíquotas do caldo de cultivo para tubos de ensaio de 10 x 150 mm contendo água destilada autoclavada. Os preparos foram homogeneizados em agitador e as suspensões dos inóculos padronizados pela escala #0,5 de McFarland.

4.7.4 Bioensaio antimicrobiano (Triagem)

A avaliação da atividade antibiótica dos extratos brutos foi realizada em microplacas de Elisa. Os extratos brutos contendo os biossurfactantes foram preparados nas concentrações de 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL e 6 mg/mL solubilizadas em 10 % de DMSO e água deionizada autoclavada. Para a triagem das amostras dos extratos testes, cada poço da placa de Elisa foi preenchido com: (I) 45 µL do meio de cultura adequado, (II) 50 µL da solução de cada amostra dos extratos fúngicos e (III) 5 µL da suspensão de células do patógeno na concentração 0,5 da escala de Mc Farland. Para o controle negativo foi adicionado 50 µL de solvente (DMSO) utilizado no preparo das amostras, 45 µL do meio de cultivo e 5 µL do patógeno. Para o controle positivo foi utilizado 45 µL do meio de cultivo adequado, 50 µL de Digluconato de Clorexidina 0,12% e 5 µL do patógeno. Tanto as amostras, quanto os controles foram feitos em triplicatas.

As placas preenchidas com os meios de culturas, amostras e patógenos, foram incubadas em B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio) à 37 °C, por 24 h. Após este período, no interior da cabine de segurança biológica, foi adicionado em cada poço 30 µL do reagente revelador resazurina (0,01%) preparado em solução aquosa (Figura 14A). As placas foram novamente incubadas a 37 °C nas mesmas condições anteriores durante 4 horas. A presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002) ou seja, ausência de mudança de cor do reagente resazurina indica sensibilidade do microrganismo ao extrato testado (Figura 14B). Essa mudança de cor no reagente ocorre, pois, as células bacterianas ativas reduzem a resazurina não fluorescente (azul) para a resorufina fluorescente (rosa), que pode ser ainda mais reduzida a hidroresorufina (O'BRIEN et al. 2000).

Figura 14: Bioensaio em microplaca: **A-** adição do reagente revelador resazurina nos poços e **B:** leitura da placa após o tempo de ação do corante resazurina (4 h).



A atividade antimicrobiana dos extratos foi confirmada semeando-se com alça de repique estéril alíquota de cada um dos poços, com coloração ou não, em placas de petri contendo os meios ágar Saboraud (*C. albicans*), ágar BHI (*S. mutans*), ou ágar Miller Hinton (*L. casei*). As placas foram seladas com fita parafilm “M” (Pechinery Plastic Packaging) e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente foi feita a leitura das placas para observar a intensidade do crescimento dos patógenos ou a sua ausência que indica, efetivamente, a ação bactericida ou bacteriostática dos extratos fúngicos testados (BANDEIRA, 1998).

4.7.5 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os extratos brutos testados que apresentaram atividade antimicrobiana nos testes de triagem dos extratos, conforme descritos no item 4.7.4 foram utilizados para avaliar a CIM. A atividade antibacteriana foi determinada, segundo metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em microdiluição proposta por Andrews (2001), adaptação de Sampaio et al. (2009). Os extratos brutos secos foram diluídos com Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec®, Alemanha) a 10% e água deionizada autoclavada. O controle positivo foi o digluconato de clorexidina a 0,12% (Biodinâmica®, PR, Brasil) e para o controle negativo foi o utilizado água deionizada e DMSO a 10%.

Todo o procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica, com todos os materiais necessários esterilizados (placas multipoços, alças de repique, vidrarias, ponteiras, meios de cultura, água deionizada). Foram utilizadas microplacas de 96 poços, sendo uma placa para cada patógeno testado. Na microplaca, as colunas foram distribuídas nos números de 1 a 12 e as linhas nas letras “A“ até o “G”. Nos poços foram distribuídos os extratos de forma a conter as diferentes concentrações testadas. O sistema de diluição foi controlado pelos volumes da solução-mãe utilizada, ocupando os poços 1 a 11 e o volume do meio de cultivo específico para cada patógeno testado. Cada poço recebeu 20 µL de inóculo (padronizados pela escala 0,5 de McFarland) totalizando um volume final de 100 µL em cada poço (Tabela 08).

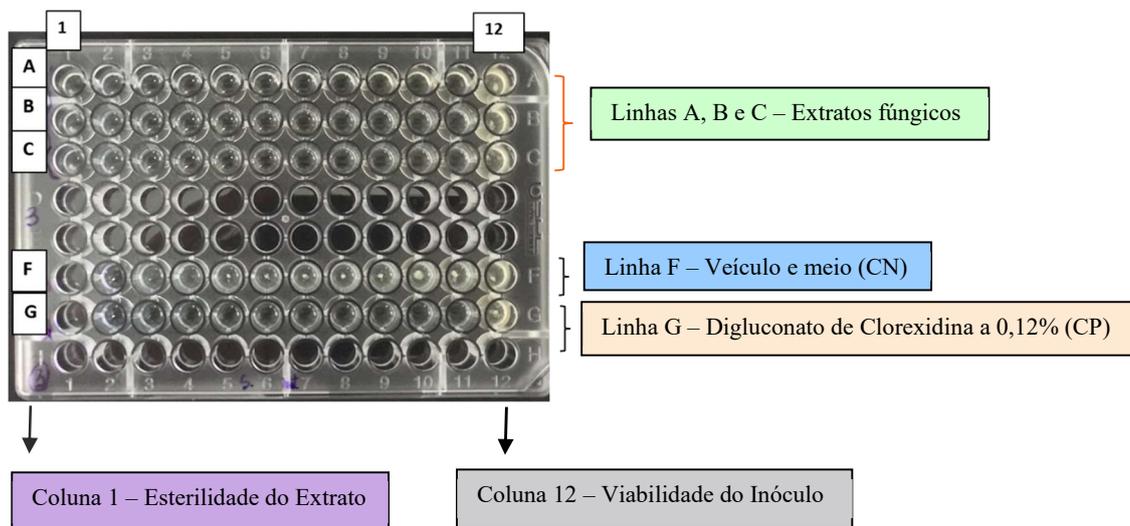
Tabela 8 – Condições do experimento em Placa de microdiluição (volumes em µL).

Conteúdo nos Poços	Volume nos Poços (µL)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EXTRATO FÚNGICO (µL)	80	80	70	60	55	50	45	40	35	30	25	-
MEIO (µL)	20	-	10	20	25	30	35	40	45	50	55	80
INÓCULO (µL)	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
CONCENTRAÇÃO FINAL DO EXTRATO-TESTE (mg/mL)												
6 mg/mL	4,8	4,8	4,2	3,6	3,3	3,0	2,7	2,4	2,1	1,8	1,5	-
5 mg/mL	4,0	4,0	3,5	3,0	2,75	2,5	2,25	2,0	1,75	1,5	1,25	-
3 mg/mL	2,4	2,4	2,1	1,8	1,65	1,5	1,35	1,2	1,05	0,9	0,75	-
1 mg/mL	0,8	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	-

Fonte: De Bari et al., 2016

A Figura 15 mostra a organização de como foram distribuídos nos poços da placa os constituintes do experimento. A coluna 01 indica a esterilidade da substância teste, extrato fúngico + meio sem bactérias. A coluna 12 indica a viabilidade das bactérias, meio + inóculo sem o extrato teste. A linha F representa o controle negativo (CN) e a linha G o Digluconato de Clorexidina a 0,12% usado como controle positivo (CP).

Figura 15: Representação esquemática da distribuição em microplaca dos extratos testes:



Fonte: Adaptado de MILERIO, 2015

A atividade antimicrobiana de cada extrato foi testada em triplicata. Após o preenchimento de todos os poços, as microplacas foram seladas com parafilm e incubadas a 37 °C por 24 h, em aerofilia para o *L. casei*, e a *C. albicans* e em microaerofilia para o *S. mutans*. Após o período de incubação, foram adicionadas aos poços 30 µL do reagente resazurina (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) preparado em solução aquosa (0,01%, 10 mg diluída em 100 mL). Em seguida, as placas foram novamente incubadas por 4 h. A ausência de mudança de cor nos orifícios foi interpretada como microrganismo sensível aos extratos fúngicos testados. Para a confirmação da concentração bactericida mínima (CBM) foram retiradas alíquotas de todos os poços de cada placa, incluindo os controles positivos e negativos, semeadas em meio Agar Saboraud, Agar MH, ou Ágar BHI, e incubadas a 37 °C durante 24h para confirmar a presença de bactérias viáveis e/ou leveduras viáveis, determinando assim a menor concentração capaz de impedir o crescimento dos microrganismos.

4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES

4.8.1 Estudo do perfil químico dos extratos fúngicos

Para estudo do perfil químico foram utilizadas alíquotas dos extratos líquidos (AcoEt) e do extrato liofilizado do micélio após concentração do extrato em MeOH (HPLC). O extrato bruto foi preparado utilizando 1mg de cada amostra, 500 μ L de água deionizada e 500 μ L de MeOH (HPLC). Os extratos da emulsão/espuma liofilizados foram dissolvidos e solubilizados em água deionizada e MeOH HPLC, obtendo-se uma solução a 1 mg/mL, como descrito por Souza et al (2005).

As amostras do extrato do caldo de cultivo foram levadas ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas (LABCEM /UFAM), onde foram analisadas por inserção direta em Espectrômetro de Massas Ion trap - LCQ Fleet da Thermo Scientific®, utilizando a fonte Eletronspray ionization (ESI) na faixa de massas de 100 a 2000 m/z tanto no modo positivo quanto no modo negativo (KOOLEN, 2011).

Para as análises espectrométricas dos resultados obtidos por ESI-MS será utilizado o software Xcalibur da Termo Scientific®. Os dados foram tabulados no programa Excel e transformados em matriz bidimensional dos valores de m/z x linhagem. As análises dos extratos liofilizados foram realizadas no mesmo laboratório.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Gustávia cf. hexapétala*

Foram isolados 399 fungos e uma levedura negra a partir dos tecidos vegetais da planta. Inicialmente as colônias foram agrupadas em cinquenta e cinco grupos de acordo com a macromorfologia do micélio e aspectos de crescimento, como coloração e produção de pigmentos no meio. Para os grupos com mais de 20 isolados foram selecionados, purificados e conservados 20%, das colônias (Figura 16 e 17A e B). Para o isolamento dos endófitos inoculou-se 216 fragmentos de folhas e 216 fragmentos de galhos da planta *G. cf. hexapetala*. A taxa de colonização dos endófitos cultiváveis encontrada na presente pesquisa a partir dos tecidos inoculados foi mais alta que as encontradas e descritas por Almeida (2014), que isolou endófitos do mesmo indivíduo, utilizando os mesmos meios de cultivo, porém com acréscimo de outros tecidos vegetais além de folhas e galhos (caule e raiz) e em temperaturas de 18, 26 e 32 °C. A partir de 384 fragmentos dos tecidos vegetais sadios de *Gustavia* sp. inoculados, Almeida (2014) conseguiu isolar 93 fungos.

Figura 16: Diferentes fungos (morfogrupos) isolados de fragmentos de folhas e galhos de *G. cf. hexapetala*

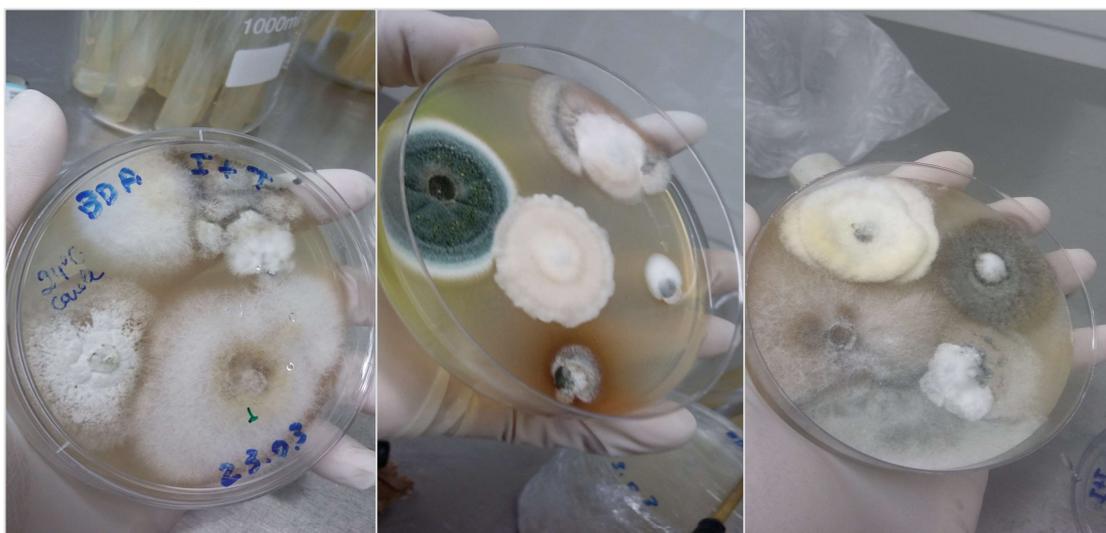
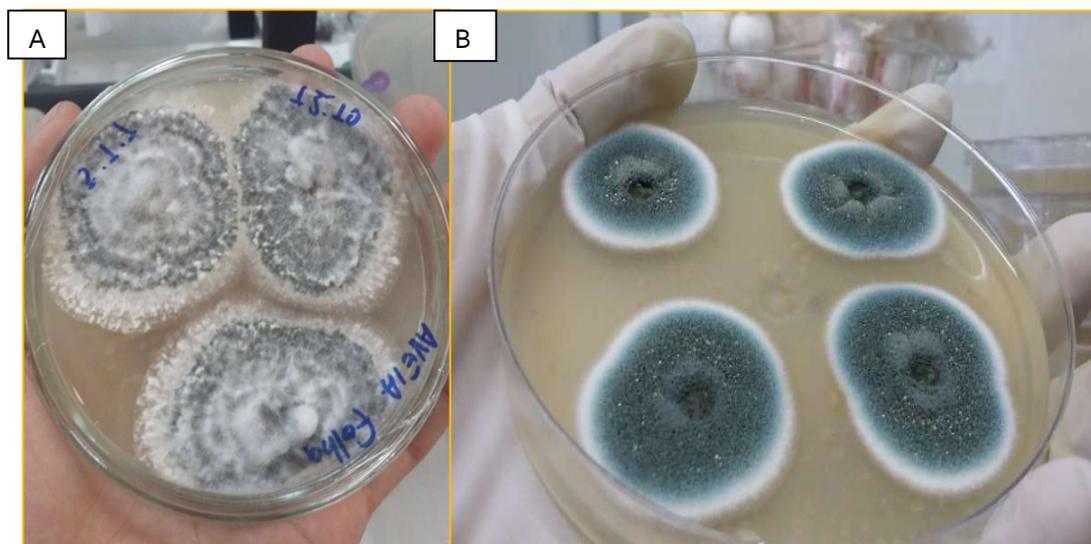


Figura 17: Purificação dos fungos endofíticos em diferentes meios. **17A:** meio aveia e **17B** meio BDA+L, em temperatura de 24 °C, por 5 dias.



Durante a etapa de purificação as colônias foram reagrupadas em 20 morfogrupos diferentes e foram conservadas 187 linhagens em quintuplicatas pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939) e em solução de glicerol a 20% (SOUZA et al., 2004). As diferentes temperaturas determinadas para a realização do experimento proporcionaram o isolamento de endófitos nas três temperaturas testadas (Tabela 9).

Tabela 9: Influência na temperatura de isolamento de fungos endofíticos de diferentes tecidos de *G. cf. hexapétala*.

TEMPERATURAS DE ISOLAMENTO	BDA		ISP2		AVEIA		TOTAL
	FOLHA	GALHO	FOLHA	GALHO	FOLHA	GALHO	
18°C	8	28	5	2	5	11	59
24°C	9	19	15	19	12	11	85
40°C	12	12	4	6	4	5	43
TOTAL	29	59	24	27	21	27	187

Os organismos podem ser considerados psicrófilos, mesófilos e termófilos, conforme a temperatura ideal de crescimento. Os psicrófilos crescem, preferencialmente, entre 15°C a 20°C, e ainda em temperaturas mais menores, já os mesófilos, que envolvem a maioria dos microrganismos relatados na literatura, crescem entre 25°C a 40°C. Assim, de

acordo com os autores, os isolados identificados na presente pesquisa são classificados como psicrofílicos e mesófilos (PELCZAR, CHAN E KRIEG, 1997), demonstrando a versatilidade de cultivo e adaptação das diferentes cepas de fungos endofíticos isolados de folhas e galhos de *G. cf. hexapétala*. Esse material biológico fará parte de uma coleção na Universidade do Estado do Amazonas, para futuras pesquisas, uma vez que, tais recursos representam um importante acervo para a geração de novos conhecimentos sobre fungos endofíticos de plantas da região Amazônica, possibilitando a descoberta de moléculas bioativas, contribuindo com a conservação da biodiversidade microbiana e geração de recursos socioeconômicos pela produção de substâncias de interesse biotecnológico na região.

5.1.1 Frequência de Isolamento e Caracterização dos Fungos

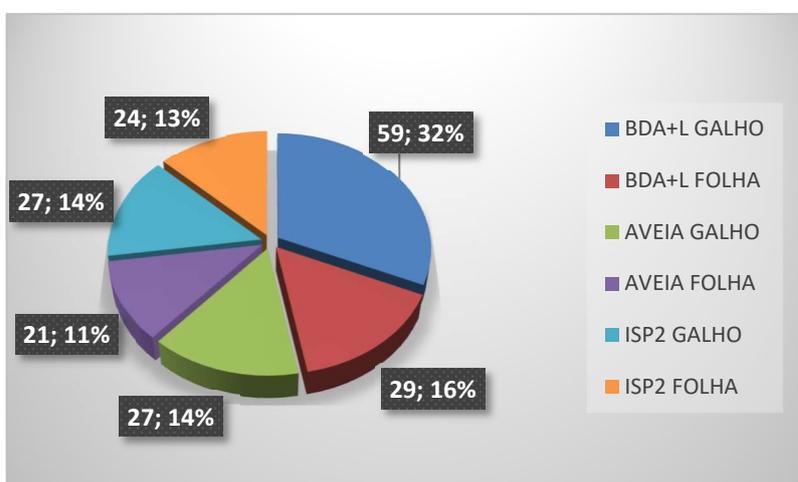
Em relação ao total de fungos isolados, a frequência de isolamento mostrou que houve maior número de isolados a partir de galhos, no meio BDA, com 74,6% de fragmentos colonizados. A partir das folhas, também em meio BDA, a frequência foi de 49,6%. Para os meios Aveia e ISP2 a frequência de isolamento também foi maior para galhos (47,2% e 41,5 respectivamente) e menor para folhas (Tabela 10). Esses resultados mostram-se diferente dos obtidos por Souza et al. (2004) que isolaram maior quantidade de endófitos das folhas (72,0%) do que com galhos (37,5%), quando realizaram suas pesquisas com *Palicourea longiflora* (Rubiaceae).

Tabela 10: Total de fungos isolados de *G. cf. hexapétala* e frequência de isolamento.

Meios de isolamento	Origem		Total de fungos isolados	Frequência de Colonização	
	Galho	Folha		Galho	Folha
BDA	59	29	88	74,6%	49,6%
ISP2	27	24	51	41,3%	36%
Aveia	27	21	48	47,2%	33,3%
Total	113	74	187 fungos		

Na pesquisa realizada por Souza et al. (2004) utilizando a planta *Strychnos cogens* (Loganiaceae) obtiveram a frequência de 66,6% e 21,6% para folhas e galhos, respectivamente. Ao estudar as plantas *Pueraria phaseoloides* (Fabaceae) e *Theobroma grandiflorum* (Sterculiaceae), Galvão (1998) obteve para as folhas, maiores frequências de isolamento (72,5% e 58,7% respectivamente), resultados que, também se diferenciam dos obtidos nessa pesquisa. O maior número de isolados ocorreu no meio BDA+L, a partir dos fragmentos de galhos com 59 linhagens purificadas (32%). No mesmo meio, foram isolados de folhas 29 linhagens representando 16% dos isolados (Figura 18).

Figura 18: Total de fungos endofíticos isolados de *G. cf. hexapétala*, a partir de fragmentos de folhas e galhos nos meios Aveia, BDA+L e ISP2.

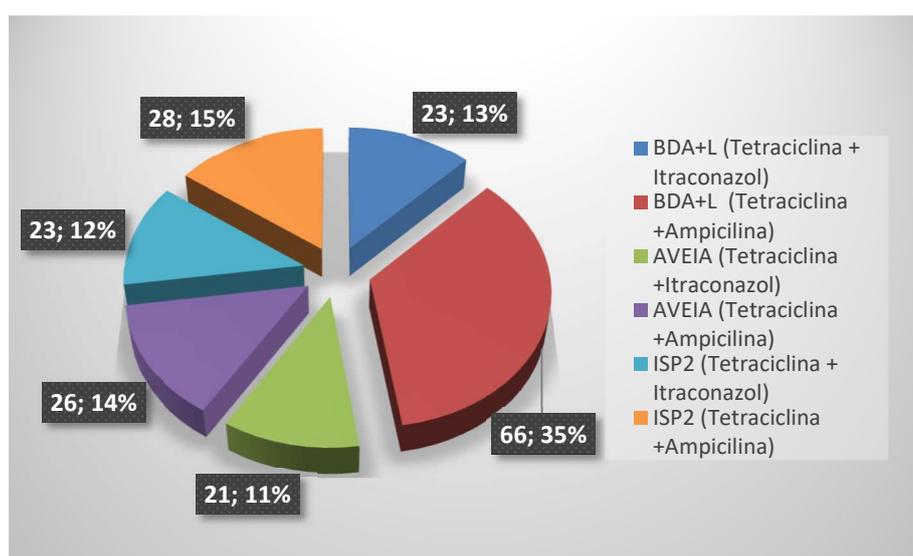


Dessa seleção, foram isoladas e conservadas nos três diferentes meios de cultura, 113 linhagens a partir de fragmentos de galho (60%) e 74 linhagens dos fragmentos de folha (40%). A taxa de colonização de fungos endofíticos cultiváveis encontrada neste estudo é mais alta do que a relatada por Banhos et al. (2014), que isolaram 156 endofíticos a partir de 270 fragmentos inoculados de *Myrcia guianensis* (Mirtaceae), obtendo 50 fungos de caule (32%) e 47 de folhas (30,1%). Os estudos de Almeida (2014), quando comparado aos resultados encontrados na presente pesquisa, também apresentaram números menores de fungos endofíticos isolados de *Gustavia* sp. (Lecythidaceae), obtendo a maior frequência de isolamento para a casca da raiz (23%), seguido de casca de caule (21%), casca de galho (21%), e folha (10%).

A Figura 19 apresenta o resultado da análise do crescimento dos fungos nos três meios de cultura (ISP2, Aveia e BDA), acrescidos de antibióticos. Nos meios contendo Tetraciclina e Ampicilina o número total de isolados foi de 120 fungos (64%). Nos meios

onde a combinação dos antibióticos foi a Ampicilina e Itraconazol, o número de isolados foi menor, apresentando 67 linhagens fúngicas (36%), porém esse percentual é significativo quando comparado ao isolamento realizado por Almeida (2014) em meio contendo Ampicilina e Cetoconazol, quando obteve 13 fungos (14%). O aparecimento dos fungos em meio de cultura contendo fungicida demonstra a resistência de várias linhagens ao fármaco usado, ou pode ainda, ter ocorrido a degradação dessas substâncias utilizados como componentes dos meios de cultivo.

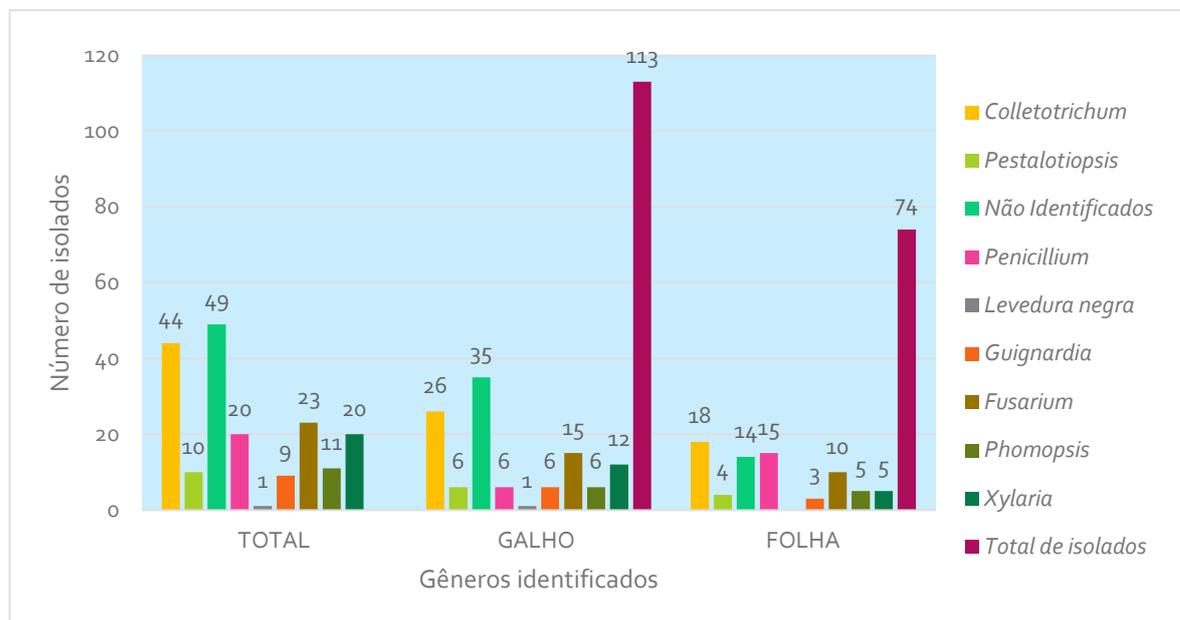
Figura 19: Fungos endofíticos isolados de *G. cf. hexapetala* em diferentes meios de cultivo e diferentes combinações de antibióticos.



5.1.2 Análise Taxonômica dos Fungos Isolados

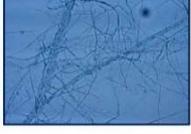
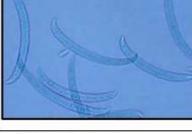
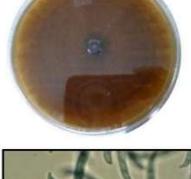
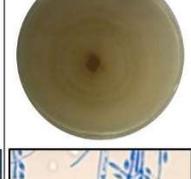
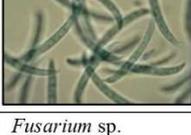
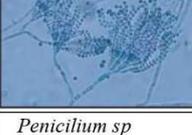
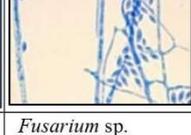
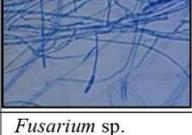
Os fungos endofíticos que apresentaram estruturas reprodutivas foram classificados após observação dos aspectos macro e micro morfológicos e comparação com dados específicos da literatura (GILMAR, 1959; BONONI, 1998; KIFFER e MORELET, 1999; GUERRERO e SILVEIRA, 2003). Foram identificados até o nível de gênero os seguintes grupos: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Guignardia*, *Phomopsis* e *Xylaria* e *Diaporthe* (Figura 20 e 21). Fungos endofíticos destes gêneros foram isolados de outras plantas tropicais tais como, *T. grandiflorum*, *P. phaseoloides* e *Scleria pterota* (GALVÃO, 1998; SOUZA et al., 2004; ALMEIDA, 2014). Outros fungos, especialmente os que não apresentaram estruturas reprodutivas não foram identificados.

Figura 20: Diversidade de fungos endofíticos isolados de *G. cf. hexapetala*, identificados morfologicamente.



Em seus estudos Souza et al. (2004) destacaram que a carência de especialistas em taxonomia das diferentes espécies e de conhecimento sobre seus micro-habitat tem tornado a identificação completa dos fungos endofíticos um desafio importante, o que ainda impede o avanço das pesquisas neste quesito, podendo haver entre os endófitos isolados, muitas espécies inéditas.

Figura 21: Aspectos macro e micromorfológicos de colônias de fungos endofíticos isolados de *G. cf hexapetala* representando grupos identificados a nível de gênero e grupos não identificados.

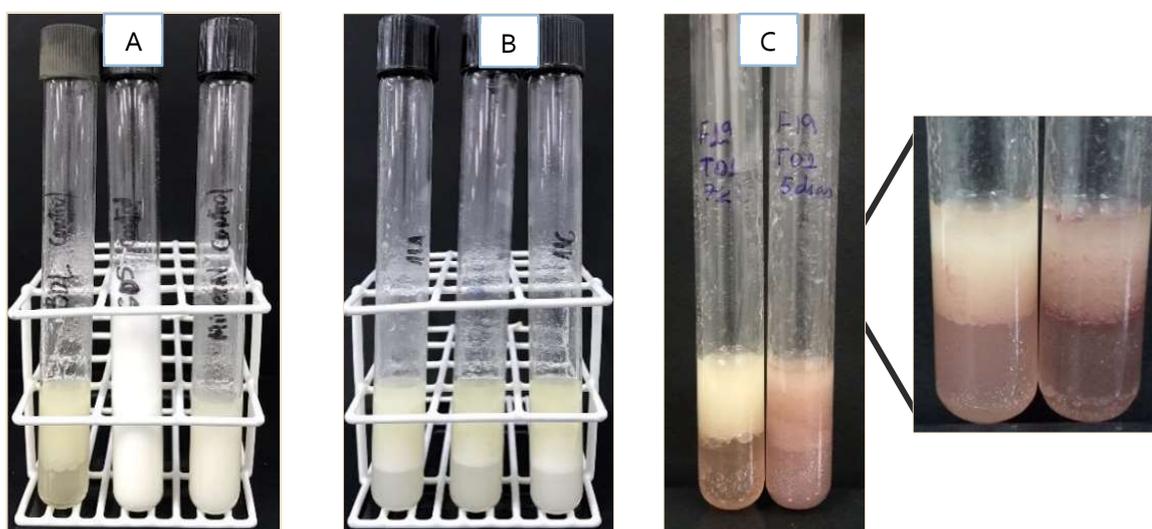
					
					
					
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Penicilium</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.
					
					
					
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Diaporthe</i> sp.	Levedura negra	<i>Guignardia</i> sp.	Não identificado
					
					
					
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicilium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	Não identificado	Não identificado

5.2 FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

5.2.1 Testes de Emulsificação

A produção de biossurfactantes pelos 24 fungos foi avaliada pelo teste de emulsificação realizado. Houve formação de emulsão nos caldos metabólicos em 66,66% das amostras testadas (Figura 22). A altura da emulsão foi medida após 24 horas. Os fungos testados apresentaram resultados positivos para a produção de biossurfactantes. O índice de Emulsificação nos testes realizados apresentou variação percentual de 5,2 a 33,9 %.

Figura 22: Teste de Emulsificação dos caldos de cultivo de fungos endofíticos de *G. cf. hexapetala*: **A** – Emulsão formada com óleo de soja nos meios de controle BD+L e Mineral, e biossurfactante sintético Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); **B e C** emulsão formada com óleo de soja e os caldo de cultivo de fungos endofíticos.



Nesta pesquisa houve formação de emulsão indicando que os fungos endofíticos isolados de *G. cf. hexapetala* produziram moléculas tensoativas, no entanto, sem apresentar boa estabilidade e manutenção da emulsão formada. Após o tempo previsto 30% dos tubos de ensaio do experimento contendo o caldo metabólico, ainda mantinham as emulsões e os maiores valores do índice de Emulsificação (E_{24}) registrados foram 26,50%, 31,97 e 33,99% (Tabela 11). As demais amostras (70%) reduziram significativamente a altura das emulsões formadas, não apresentando estabilidade após 24 horas. Este fato pode ter relação com o peso molecular do metabólito uma vez que, quando apresentam alto peso molecular demonstram maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água, enquanto os biossurfactantes de baixo peso molecular apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos (RON; ROSEMBERG, 2002; HAMME; SINGH; WARD, 2006; PACWA-PLOCINICZAC et al., 2011; SILVA et al., 2018).

Tabela 11: Índice de Emulsificação (E_{24}) do meio de cultivo de fungos endofíticos de *G. cf. hexapetala* em meio mineral acrescido com óleo de soja como fonte de carbono.

Nº	Código de Registro	Código do Isolado	E_{24} (%)	Desvio Padrão
1	FF31	GhxF-3.2.2-TA	-	-
2	FF56	GhxF-3.1.1-TA	-	-
3	FF12	GhxG-1.3.1-TA	6,7	0,01
4	FF80	GhxF- 2.3.1	29,0	0,02
5	FF51	GhxF-2.4.1-TI	26,70	0,03
6	FF35	GhxG-1.3.1-TA	29,56	0,04
7	FF84	GhxF-2.4.1TA	5,10	0,04
8	FF82	GhxF-2.2.1-TA	9,94	0,05
9	FF79	GhxF-2.3.1 ^a	29,30	0,06
10	FF01	GhxF-1.2.1-TA	33,99	0,07
11	FF25a	GhxF-1.3.1a-TA	26,50	0,07
12	FF39	GhxG-1.4.1-TA	34,48	0,09
13	FF44	GhxG-3.4.1-TA	21,80	0,09
14	FF45	GhxG-3.3.1-TA	7,47	0,09
15	FF33	GhxF-3.4.2-TI	33,99	0,10
16	FF43	GhxG-3.4.1-TI	32,81	0,12
17	FF89	GhxF-4.4.1-TA	9,80	0,02
18	FF17	GhxG-3.3.1-TA	13,58	0,14
19	FF27	GhxF-1.2.3-TI	32,19	0,16
20	FF36	GhxG-1.2.1-TA	31,97	0,20
21	FF25b	GhxF-1.3.1b-TA	10,0	0,22
22	FF86	GhxG-2.4.2-TA	10,70	0,30
23	FF09	GhxG-1.2.1b-TA	5,20	0,32
24	FF38	GhxG-1.2.2-TI	5,16	0,37
CP	SDS	Dodecilsulfato de Sódio a 10%	82,50	-

Ghx = *G. cf. hexapetala.*; G = galho; F = folha; TA = Tetraciclina+Ampicilina; TI = Tetraciclina + Itraconazol; CP = controle positivo; SDS – Dodecilsulfato de Sódio; FF – Iniciais do nome do responsável pela coleta da Planta (Código no Livro de Registro da Coleção).

Valores superiores aos encontrados nesse estudo são descritos em trabalhos como os de Pereira, Duvoisin Jr. e Albuquerque (2017) que citam para o fungo UEA115, cultivado em meio mineral contendo óleo de soja, o índice de emulsificação no valor de 62,41%, e Sena et al. (2018) que encontrou para os gêneros *Fusarium sp.*, *Penicilium sp.* e *Trichoderma sp.* valores que variaram de 40,3 a 64,28%. Reis et al. (2018) isolaram 10 fungos de amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos e verificaram sua capacidade de produzir biossurfactantes. Constataram que 5 isolados foram capazes de produzir emulsão na presença de óleo diesel após 6 dias, sendo o maior índice de emulsificação de 24,4%. Qazi et al. (2014) obtiveram valores que variaram de 36% para o gênero *Aspergillus flavus* e 46% para o *Penicilium sp.*

Ao considerarmos o tempo de mensuração após 24h os extratos fúngicos com melhor atividade de emulsificação foram: FF33 que apresentou 33,99%, FF36 com 31,97%, FF79 com 29,30%, FF80 com 29,00%, FF35 com 29,56% e FF51 com 26,70%. Esses extratos foram provenientes do meio mineral.

Os extratos dos fungos FF17 e FF45 apresentaram índice de emulsificação mais baixos, porém com a realização do teste de tensão superficial, demonstraram uma redução da tensão superficial do meio de cultivo o que comprova a importância da realização de diferentes métodos de pesquisa evitando possíveis erros na seleção de microrganismos promissores que podem ser descartados se for levado em conta apenas um ou outro método de análise (UZOIGWE et al., 2015). Segundo Haba et al. (2000), os microrganismos considerados bons produtores de biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial a 40 mN.m⁻¹ ou menos. A tensão superficial verificada para os fungos FF17 e FF45 foram de 32,8 mN.m⁻¹ e 30,1 mN.m⁻¹, respectivamente.

5.2.2 Determinação da Tensão Superficial

No cultivo dos fungos em meio mineral, todos os fungos testados reduziram a tensão do meio de cultivo. A TS do meio baixou de 61,0 mN/m⁻¹ para 32,8 mN/m⁻¹ com redução de 46,2%, no extrato do fungo FF17, e 30,1 mN/m⁻¹ nos extratos fúngicos FF45 e FF51 com redução de 50,7%, configurando os melhores resultados. Foi observada a diminuição da TS abaixo de 35,0 mN/m⁻¹ para nove extratos fúngicos testados (Tabela 12). Esse resultado corrobora com estudos anteriores que afirmam que abaixo de 35,0 mN/m⁻¹ os microrganismos são considerados eficientes na produção de biossurfactantes (LUNA et al., 2011).

Tabela 12: Tensão Superficial (TS) de caldos do metabolismo de fungos endofíticos cultivados em Meio Mineral acrescido de óleo de soja (0,5g/L) como fonte de carbono.

Nº	Registro coleção	Isolado	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹) Meio Mineral	Redução da TS %	Desvio Padrão
1	FF84	GhxF-2.4.1-TA	-	-	-
2	FF43	GhxG-3.4.1-TI	-	-	-
3	FF80	GhxF-2.3.1	-	-	-
4	FF31	GhxF-3.2.2-TA	-	--	-
5	FF01	GhxF-1.2.1-TA	32,8	46,2	0,02
6	FF35	GhxG-1.3.1-TA	33,2	45,6	0,03
7	FF45	GhxG-3.3.1-TA	30,1	50,7	0,06
8	FF36	GhxG-1.2.1-TA	30,9	49,3	0,07
9	FF79	GhxF-2.3.1a	30,9	49,3	0,07
10	FF44	GhxG-3.4.1-TA	39,7	34,9	0,08
11	FF27	GhxF-1.2.3-TI	34,7	43,1	0,09
12	FF51	GhxF2.4.1-TI	30,1	50,7	0,1
13	FF33	GhxF-3.4.2-TI	31,8	47,9	0,11
14	FF39	GhxG-1.4.1-TA	44,8	26,6	0,21
15	FF17	GhxG-3.3.1-TA	32,8	46,2	0,36
16	FF25b	GhxF-1.3.1b-TA	37,8	38,0	0,4
17	FF25a	GhxF-1.3.1a-TA	39,4	35,4	0,48
18	FF12	GhxG-1.3.1-TA	40,2	34,1	0,58
19	FF89	GhxF-4.4.1-TA	49,4	19,0	0,64
20	FF86	GhxG-2.4.2-TA	37,8	38,0	0,69
21	FF09	GhxG-1.2.1b-TA	50,0	18,0	0,7
22	FF82	GhxF-2.2.1-TA	46,9	23,1	0,82
23	FF56	GhxF3.1.1-TA	51,9	14,9	1,24
24	FF38	GhxG-1.2.2-TI	39,9	34,6	1,54
	MC	Meio de Cultivo	61,0		

Ghx = G. cf. hexapetala.; G = galho; F = folha; TA = Tetraciclina+Ampicilina; TI = Tetraciclina + Itraconazol; FF – Iniciais do nome do responsável pela coleta da planta (Código no Livro de Registro da Coleção).

A Redução da tensão superficial do meio BDL (58,2) foi de 50,2 % para o fungo FF51 configurando o melhor resultado. Destaque ainda para outros oito fungos que diminuíram a tensão superficial entre 44,8% a 50,1% (Tabela 13). As maiores reduções da tensão superficial para essas 09 linhagens foram: **28,4** mN/m para o fungo FF27; **28,7** mN/m para FF51; **29,6** mN/m para FF79; **31,5** mN/m para o FF45; **31,7**, mN/m para o fungo FF82; **32,4** mN/m FF33; **32,6** mN/m para o FF35; **32,7** mN/m para FF36 e **32,7** para o FF01.

Tabela 13: Tensão Superficial de caldos do metabolismo de fungos endofíticos cultivados em Meio BDL acrescido de óleo de soja (0,5g/L) como fonte de carbono adicional.

Nº	Registro coleção	Isolado	Tensão Superficial (mN.m-1) BDL	Redução da TS %	Desvio Padrão
1	FF09	GhxG-1.2.1b-TA	-	-	-
2	FF12	GhxG-1.3.1-TA	-	-	-
3	FF25	GhxF-1.3.1b-TA	-	-	-
4	FF38	GhxG-1.2.2-TI	-	--	-
5	FF44	GhxG-3.4.1-TA	-	-	-
6	FF51	GhxF2.4.1-TI	28,7	50,2	0,02
7	FF45	GhxG-3.3.1-TA	31,5	45,7	0,06
8	FF79	GhxF-2.3.1a	29,6	49,1	0,07
9	FF33	GhxF-3.4.2-TI	32,4	44,3	0,08
10	FF27	GhxF-1.2.3-TI	28,4	51,2	0,10
11	FF82	GhxF-2.2.1-TA	31,7	45,5	0,10
12	FF01	GhxF-1.2.1-TA	32,7	43,8	0,16
13	FF36	GhxG-1.2.1-TA	32,7	43,8	0,16
14	FF31	GhxF-3.2.2-TA	36,1	38,0	0,18
15	FF43	GhxG-3.4.1-TI	43,8	24,7	0,27
16	FF89	GhxF-4.4.1-TA	38,7	33,5	0,28
17	FF35	GhxG-1.3.1-TA	32,6	44,0	0,30
18	FF84	GhxF-2.4.1TA	37,88	34,9	0,41
19	FF17	GhxG-3.3.1-TA	43,8	24,7	0,52
20	FF39	GhxG-1.4.1-TA	48,7	16,3	0,68
21	FF56	GhxF3.1.1-TA	53,3	8,4	0,78
22	FF80	GhxF-2.3.1	39,8	31,6	0,81
23	FF86	GhxG-2.4.2-TA	52,5	9,8	0,92
24	FF25a	GhxF-1.3.1a-TA	38,7	33,5	1,28
25	MC	Meio de Cultivo	58,2		0,16

Ghx = G. cf. hexapetala.; G = galho; F = folha; TA = Tetraciclina+Ampicilina; TI = Tetraciclina + Itraconazol; FF – Iniciais do nome do responsável pela coleta da planta (Código no Livro de Registro da Coleção).

Os resultados da redução da tensão superficial dos caldos metabólitos dos fungos cultivados, quando submetidos a análise estatística por meio do teste de Tukey, demonstraram não haver diferença significativa a nível de 5% de probabilidade entre os dois tratamentos conforme Tabela 14.

Tabela 14: Comparação da Tensão Superficial (TS) em extratos de fungos cultivados em diferentes meios.

Isolados	Espécie identificadas	Meio de Cultivo	Índice estatístico da TS
FF43	-	mineral	35.06000 ^{hij}
FF43	-	BD+L	43.83333 ^{ef}
FF35	-	mineral	33.16000 ^{ijlmn}
FF35	-	BD+L	32.56667 ^{ijlmn}
FF36	<i>Diaporthe</i> sp.	mineral	30.90000^{lmno}
FF36		BD+L	32.71333^{ijlmn}
FF01	-	mineral	32.77333 ^{ijlmn}
FF01	-	BD+L	37.82667 ^{gh}
FF33	<i>Colletotrichum vietnamensi</i>	mineral	31.76667^{ijlmno}
FF33		BD+L	32.41333^{ijlmno}
FF39	-	mineral	44.77333 ^{de}
FF39	-	BD+L	48.71333 ^{cd}
FF27	-	mineral	34.69333 ^{hijl}
FF27	-	BD+L	28.44667 ^o
FF56	-	mineral	50.98000 ^{bc}
FF56	-	BD+L	53.34667 ^b
FF17	<i>Fusarium decemcellulare</i>	mineral	32.78667^{ijlmn}
FF17		BD+L	43.83333^{ef}
FF45	<i>Fusarium solani</i>	mineral	30.11333^{mno}
FF45		BD+L	31.58000^{ijlmno}
FF25a	-	mineral	39.34667 ^g
FF25a	-	BD+L	38.67333 ^{gh}
FF86	-	mineral	37.80000 ^{gh}
FF86	-	BD+L	58.98000 ^a
FF51	<i>Fusarium solani</i>	mineral	30.15333^{mno}
FF51		BD+L	28.96000^{no}
FF25	-	mineral	37.80000 ^{gh}
C.V%	-	-	7,69

Média seguida pela mesma letra minúscula não difere estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando o desempenho dos fungos testados na produção de compostos tensoativos nos dois diferentes meios, observa-se que os fungos FF17, FF45 e FF33 e FF36 apresentaram maior redução da TS quando cultivados no meio mineral e os fungos FF27 e FF51 quando cultivados em meio BD+L, no entanto, os resultados não diferem estatisticamente entre si conforme apresentado na Tabela 14.

Nos estudos realizados por Souza et al. (2016), avaliaram a produção de biossurfactantes por cinco espécies de leveduras em oito diferentes meios de cultivo, e foram utilizadas fontes como, glicose, glicerol bruto, óleo de soja, águas ruças (efluentes de azeite) e azeite de oliva, acrescidos de sais e fontes de nitrogênio, em diferentes combinações. A levedura *Wickerhamomyces anomalus* (CCMA 0358) apresentou menor valor de tensão superficial, 32,05 mN/m, em meio contendo azeite de oliva e nenhuma das leveduras avaliadas apresentou atividade de emulsão em nenhum dos meios de cultivo. De acordo com Ilori et al. (2005) a maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta.

Segundo Haba et al. (2000), os microrganismos considerados bons produtores de biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial a 40 mN.m⁻¹ ou menos. Na presente pesquisa no teste de tensão superficial o meio de cultivo passou de 61,0 mN/m⁻¹ para 32,8 mN/m⁻¹ no extrato do fungo FF17, e 30,1 mN/m⁻¹ nos extratos fúngicos de FF45 e FF51, configurando os melhores resultados. Para o fungo FF17 a redução da tensão superficial foi de 46,2% e para os fungos FF45 E FF51 de 50,6%, similar aos valores encontrados em trabalhos realizados por Rufino et al. (2013), que verificou valores para a tensão superficial nos meios de cultivo de *Candida lipolytica* em 50 mNm, alcançando como menor valor 25 mNm, durante a fase exponencial após cerca de 16 horas, e permaneceu estável depois desse tempo e por Albuquerque et al. (2015) que observaram a diminuição da tensão superficial para o meio metabólico do fungo Ph IIG de 61,5 para 48,0 mNm⁻¹ (22% de redução) e de 68,4 para 44,0 mNm⁻¹ (36%) do isolado Ph III 23F.

De posse dos resultados do Índice de Emulsificação (E₂₄) e determinação da Tensão Superficial dos caldos de cultivo, foi feita a seleção dos melhores fungos produtores de biossurfactante. Para a continuidade da pesquisa foram selecionados quatro fungos para o estudo da variação de produção de biossurfactantes e cinco para os ensaios antimicrobianos provenientes de galhos e folhas (Tabela 15).

Tabela 15 - Índice de emulsificação (E₂₄) e Tensão Superficial (TS) do meio de cultivo dos fungos endofíticos isolados de *G. cf. hexapétala* e selecionados para as etapas seguintes da pesquisa.

Fungo	E ₂₄	Desvio Padrão	TS (mNm) Mineral	% Redução da TS	Desvio Padrão
FF45	7,47	0,09	30,1	50,7	0,06
FF36	31,97	0,20	30,9	49,3	0,07
FF51	26,70	0,03	30,1	50,7	0,1
FF33	33,99	0,10	31,8	47,9	0,11
FF17	13,58	0,14	32,8	46,2	0,36

TS do meio de cultivo mineral: 61,0

5.3 VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

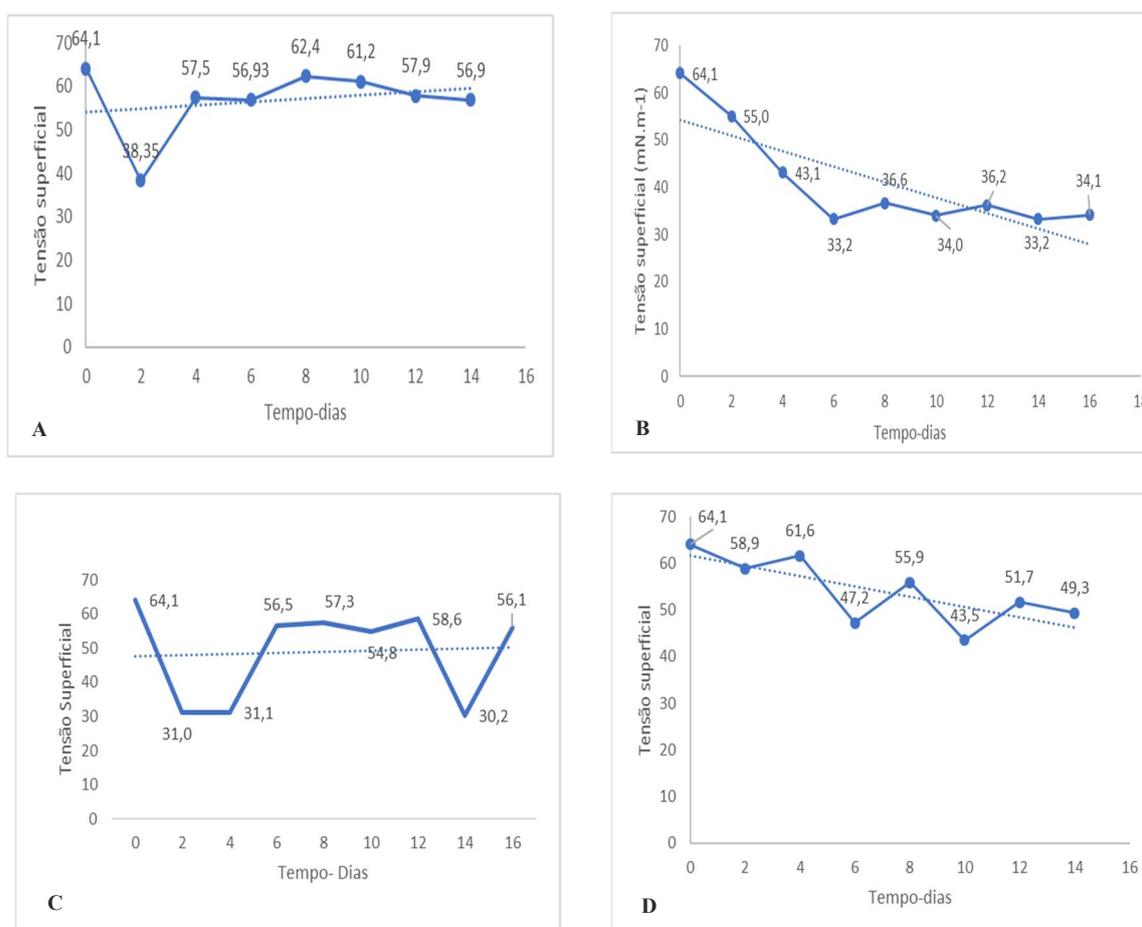
Foram realizados ensaios de variação da produção de biosurfactantes com os fungos endofíticos *Fusarium decemcellulare* (FF17), *Fusarium solani* (FF51), *Diaporthe* sp. (FF36) e *Fusarium solani* (FF45), que se destacaram em relação a diminuição da tensão superficial observada nos experimentos anteriores. Cada isolado originou uma curva de produção do metabólito durante o tempo total de observação (Figura 23).

O isolado *F. decemcellulare* (FF 17), obteve uma diminuição na tensão superficial no segundo dia de cultivo, demonstrando o início de produção de biosurfactantes nesse período. A partir do 4º dia houve um aumento da tensão, que se manteve em valores próximos durante o experimento o que indica ter passado da fase de produção e que o mesmo pode ter sido transformado em outro metabólito ou catabolizado (Figura 23 A). A maioria dos biosurfactantes é produzida e liberada no meio de cultura na fase exponencial de crescimento dos microrganismos. Em certos casos o biosurfactante é produzido durante uma parte do ciclo de crescimento e então, desativado ou incorporado em outro metabólito. Em outros casos pode ser produzido e acumulado no meio como reserva (MAKKAR; ROCKNE, 2003; MAASS et al., 2015).

O isolado *F. solani* (FF51), iniciou a redução da TS no segundo dia, até o quarto dia, quando obteve seu menor índice (33,2). A partir do sexto dia do experimento foi verificado aumento nos valores de TS do meio de cultivo líquido (Figura 23 B). Conforme relatos na literatura, este comportamento pode ser devido à necessidade do fungo em prover

suas exigências nutricionais, à medida que a disponibilidade da fonte principal de carbono se esgota, o microrganismo passa a utilizar a própria molécula tensoativa como fonte de carbono (MAASS et al., 2015; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Figura 23 - Variação da tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo dos isolados A- *Fusarium decemcellulare* (FF17); B - *Fusarium solani* (FF51); C - *Diaporthe* sp. (FF36); D - *Fusarium solani* (FF45).



Em relação ao isolado *Diaporthe* sp. (FF36), houve maior variação nos valores de tensão superficial medidos, com menor valor (30,2) no 14º dia (Figura 23 C). Para o isolado *F. solani* (FF45), os valores oscilaram a cada dia entre 61,6 no 4º dia a 43,5 no 10º dia (Figura 23 D). Não houve redução significativa o que indica pouca atividade na produção de tensoativos no período analisado.

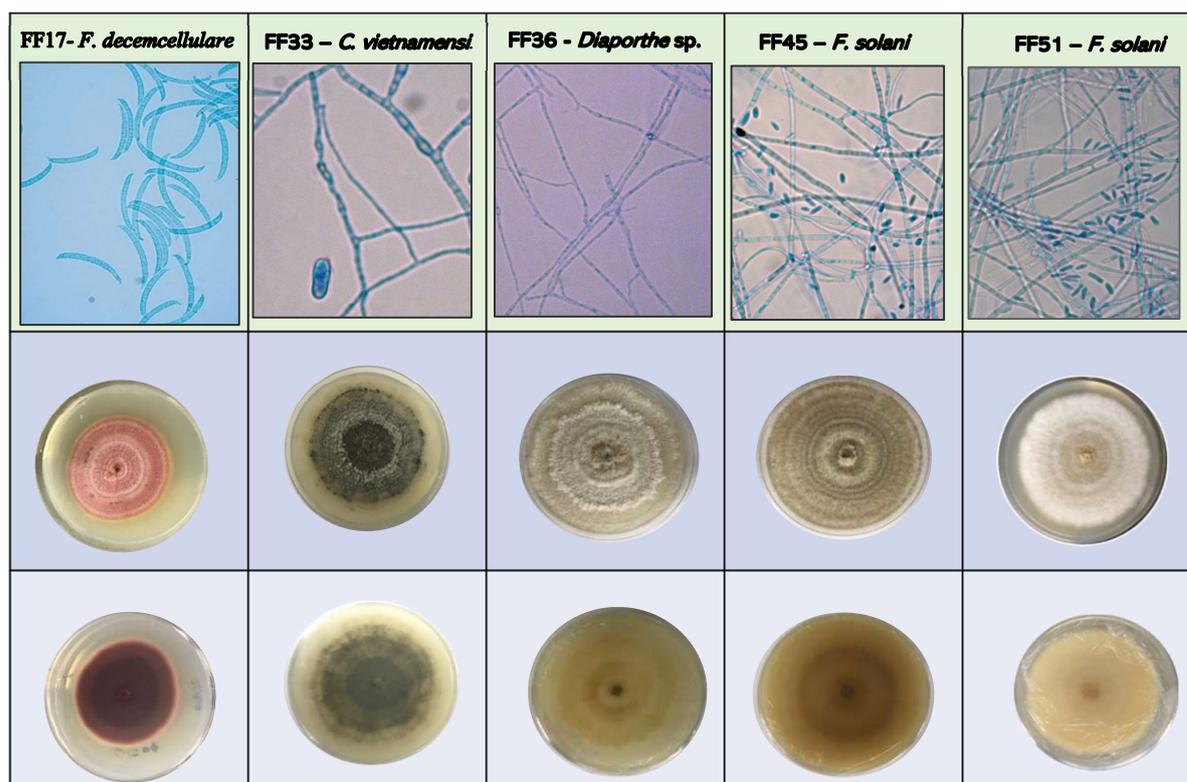
Lima (2016) obteve para o fungo *Phoma* sp. a melhor atividade de produção de biossurfactante no 10º dia de cultivo. Silva (2019) identificou o 8º dia como o melhor tempo de cultivo para produção desta molécula pelos fungos *Talomyces herodensis* e *Trametes*

versicolor. O estudo da variação de biosurfactantes permite conhecer sua produção ao longo do tempo, possibilitando programar esse processo em maior escala para obtenção dessas substâncias e aumento do rendimento de metabólitos de interesse.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DE ENDÓFITOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

A caracterização macro e micromorfológica dos isolados selecionados permitiu realizar a identificação preliminar do gênero *Fusarium* sp. para as três melhores linhagens produtoras de biosurfactantes (Figura 24).

Figura 24: Caracterização macro e micromorfológica dos fungos endofíticos de *G. cf. hexapétala* selecionados.



A identificação foi confirmada pela caracterização molecular, que utilizando a região ribossômica ITS1 a 2 permitiu a identificação dos melhores fungos produtores de biosurfactantes. Entre os gêneros identificados houve predominância do gênero *Fusarium*, com quatro isolados. Este gênero tem sido descrito como potencial produtor de

biossurfactantes em trabalhos como de Qazi et al. (2013), Sena (2014), Bhardwaj, Cameotra e Chopra, (2015), Lima (2016), Reis (2017) e Martinho et al. (2019). (Tabela 16).

Tabela 16: Identificação molecular dos fungos endofíticos de *G. cf. hexapetala*.

Código coleção/isolado	Organismo mais relacionado	Valor E	Identidade	Acesso no Genbank
FF17 - GhxG-3.3.1-TA - galho	<i>Fusarium decemcellulare</i>	0.0	100%	KY776018.1
FF45 - GhxG-3.3.1-TA - galho	<i>F. solani</i>	0.0	99.64%	KU377470.1
FF51 - GhxF2.4.1-TI - folha	<i>F. solani</i>	0.0	99.64%	KU377470.1
FF33 - GhxF-3.4.2-TI - folha	<i>Colletotrichum vietnamensi</i>	0.0	99,44%	MH863700.1
FF36 - GhxG-1.2.1-TA - galho	<i>Diaporthe sp.</i>	0.0	98,56%	MH269710.1
FF01 - GhxF-1.2.1-TA - folha	<i>F. polyphialidicum</i>	0.0	100%	HM992498.1

Em sua pesquisa, Sena (2014) descreve que o gênero *Fusarium* apresentou forte capacidade de emulsificar o tolueno e índice de emulsificação considerado bom ($E_{24} > 40$). A autora destaca a importância de uma maior busca de fungos filamentosos com capacidade emulsificante. Lima (2016) verificou que no teste de emulsificação o fungo filamentoso *Fusarium sp.* (S51) apresentou 0,7 cm ou 38,8% de emulsificação.

Reis (2017) ressalta que poucos trabalhos abordam a produção de biossurfactantes por microrganismos do gênero *Fusarium sp.* Descreve o trabalho de Qazi et al.(2013) no qual a cepa *Fusarium sp.* BS-8 produziu um biossurfactante, cuja estrutura não foi identificada e o trabalho de Bhardwaj, Cameotra e Chopra, (2015), em que o *Fusarium proliferatum* produziu um biossurfactante com tensão superficial de 36.6 mN m⁻¹ a partir de farelo de arroz. Realizando testes com a análise da massa seca, índice de emulsificação e tensão superficial verificou que a cepa *Fusarium fujikuroi* UFSM-BAS-01 apresentou potencial para a produção de biossurfactantes. Em seus estudos destaca que *F. fujikuroi* reduziu a tensão na superfície de 72 a 20 mN m⁻¹ sob as condições otimizadas de pH 5,0, 37°C e 7 dias de incubação com agitação de 190 rpm (REIS et al., 2018).

Estudos de Martinho et al. (2019), ao utilizar óleo de motor automotivo para avaliar o potencial emulsificante dos fungos, foi possível verificar os valores de E_{24} de até 62,8% pelos gêneros *Diaporthe sp.* e *Aspergillus awamori*. Ao realizar teste com óleo de soja comercial, obteve resultados expressivos para atividade emulsificante com *Fusarium sp.*

(50,0%) e *Aspergillus niger* (47,8%). Obteve bons resultados com ensaios utilizando o n-hexano, com *Fusarium chlamydosporum* (51,9%). Em análises tensiométricas, os autores destacam novamente o isolado *Fusarium* sp. como um dos que alcançaram a tensão superficial mais proeminente, 36.0 mN/m.

Nos ensaios realizados no meio mineral com os gêneros *Fusarium solani*, *Diaporthe* sp e *Colletotrichum*, essas três linhagens apresentaram resultados positivos na redução da tensão superficial, iniciando em 61,0 mN/m, passando por 30,1 para FF45 e FF51; 30,9 para FF36 e 31,8 mN/m para FF33. Os resultados obtidos mostram redução de tensão superficial, apenas diferindo dos estudos apresentados nesta discussão com relação aos obtidos para o índice de emulsificação (E_{24}) que foram mais baixos que os demais. Porém, esses resultados podem ter relação com o tipo de moléculas produzidas pelas linhagens testadas, onde a capacidade de formação de emulsão ocorre, principalmente, pela produção de bioemulsificantes, enquanto que a redução da TS, ocorre quando são produzidas moléculas de baixo peso, os chamados biossurfactantes. Portanto, é possível inferir que a redução da TS para os valores relatados anteriormente (30,1 mN/m; 30,9 mN/m e 31,8 mN/m) indica que se trata de um biossurfactante eficiente, uma vez que um bom surfactante deve reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m (MULLIGAN, SHARMA e MUDHOO, 2014).

Nos estudos de Silva (2015) o gênero *Colletotrichum* foi isolado a partir da planta *Myrcia guianensis*, sendo identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*. Esse fungo foi descrito como produtor de biossurfactante com redução da tensão superficial de 74 para 65 mN/m., resultado que também, se diferencia do presente estudo.

5.5 EXTRAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

O micélio e o caldo metabólico do cultivo em escala ampliada (4L de caldo) de cada um dos fungos selecionados, foram utilizados para produzir extratos utilizando os solventes acetato de etila e metanol. O fungo FF01, identificado como *Fusarium polyphialidicum* não foi utilizado nessa etapa da pesquisa.

Ao ser adicionado Acetato de Etila + Metanol aos caldos de cultivos, estes apresentaram a formação de emulsão ou espuma sendo coletada e processada separadamente por processos de evaporação e liofilização. Dessa forma, houve a produção de três diferentes extratos e os rendimentos de cada extração estão apresentado na Tabela 17.

Tabela 17: Resultado de rendimento da extração dos extratos líquidos contendo biossurfactantes e dos extratos de micélios, produzidos pelos fungos.

Fungo endofítico	Fração	Massa (g)	Rendimento (g/L)
FF17 - <i>F. decemcellulare</i>	Extrato ACOET	0,5758	0,29
FF33 - <i>C. vietnamensi</i>	Extrato ACOET	2,6507	0,66
	Espuma - ACOET	0,0678	0,02
FF36 - <i>Diaporthe</i> sp	Extrato- ACOET	0,1978	0,05
	Espuma - ACOET	1,1137	0,28
FF45 - <i>F. solani</i>	Extrato ACOET	0,1115	0,056
	Espuma - ACOET	0,238	0,12
	Micélio - MEOH	9,201	4,60
FF51 - <i>F. solani</i>	Extrat - ACOET	0,2291	0,06
	Espuma - ACOET	0,8866	0,22
	Micélio - MEOH	2,458	0,61

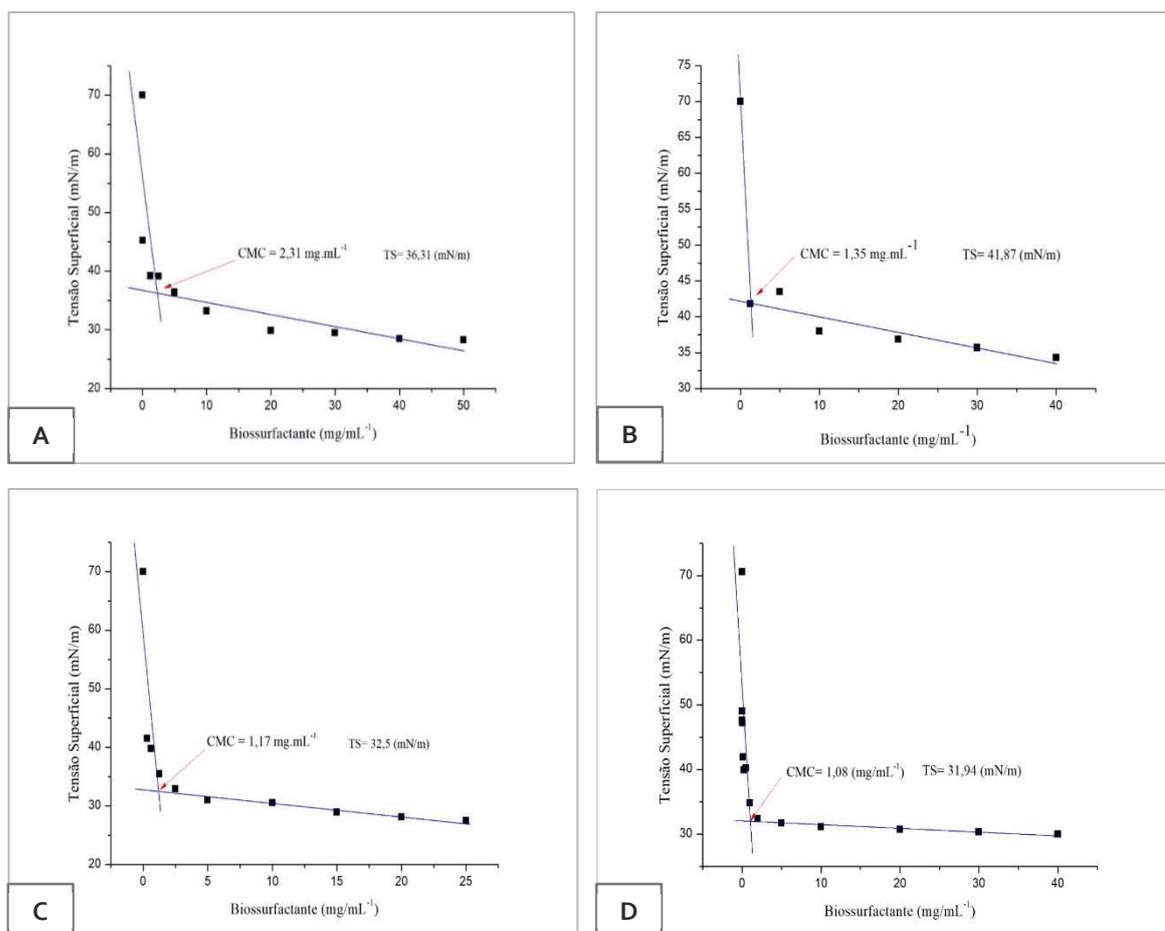
Pereira, Duvoisin Jr. e Albuquerque (2017), utilizando o método de extração com etanol obtiveram 1,80 g/L de moléculas tensoativas para o microrganismo UEA_115 e 0,64 g/L para o UEA_105. Esses autores relatam produção maior em trabalhos como os de Mukherjee et al. (2006), que conseguiram a produção, também utilizando óleo de soja como fonte de carbono no cultivo dos fungos, de 2,98 e 4,31 g/L e Silva (2015) que obteve o rendimento de 4,47 g/L de biossurfactante, utilizando o fungo do gênero *Aspergillus* em óleo de soja. Esses rendimentos se mostram superiores aos encontrados nessa pesquisa, sendo possível otimizar as condições de cultivo e utilizar fontes alternativas de carbono para obter melhor produção. Os extratos brutos obtidos foram utilizados nos testes subsequentes.

A recuperação de biossurfactantes no meio de cultivo depende principalmente de sua carga iônica, solubilidade em água e localização (intracelular, extracelular ou ligado à célula). As técnicas mais amplamente usadas são extrações com clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano, ácido acético, éter, etc (DESAI & BANAT, 1997). Neste sentido, no processo de bioprospecção de fungos com potencial para produção de biossurfactantes, é importante dispor de várias técnicas e diferentes solventes de maneira a otimizar a extração de moléculas tensoativas de interesse.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A Concentração Micelar Crítica dos biossurfactantes dos fungos endofíticos de *G. cf. hexapetala* foi determinada pela medição da TS da água ultrapura (MiliQ®) contendo diferentes concentrações dos biossurfactantes brutos a partir dos extratos dos fungos selecionados: FF 51 (extrato L1.1- espuma), FF17 (extrato L5), FF45 (extrato L.2.1 – espuma), FF 33 (extrato L4). A Figura 25 apresenta os gráficos com a determinação da CMC dos biossurfactantes produzidos durante o cultivo em meio mineral acrescido de óleo de soja como fonte de carbono.

Figura 25: Variação da tensão superficial da água ultrapura em função da concentração dos biossurfactantes nos extratos brutos: **A** extrato bruto (L5) de *F. Decemcellulare* (FF17); **B** - extrato bruto (L.2.1- Espuma) de *F. solani* (FF45); **C** - extrato bruto (L1.1- Espuma) de *F. solani* (FF51); **D** - extrato bruto (L4) de *C. vietnamensi* (FF33) em meio mineral acrescido de óleo de soja, para determinação da CMC.



A CMC é a menor concentração em que ocorre a formação de micelas em um surfactante (REIS, 2017), sendo um importante parâmetro que permite determinar a eficiência de um composto tensoativo como os biossurfactantes (SANTOS 2013; SANTOS et al., 2016). Além disso, a CMC é uma das propriedades físico-químicas mais importantes na busca por novos biossurfactantes (SILVA, et al., 2018). O resultado da CMC do biossurfactante produzido pelo fungo *F. Decemcellular* - FF17, apresentou uma redução da TS da água de 70,6 mN/m para 36,31 mN/m e CMC de 2,31 mg/mL (Figura 25-A). Para o biossurfactante produzido pelo fungo *F. solani* - FF45 a CMC calculada foi de 1,35 mg/mL (Figura 25-B), tendo ocorrido uma redução da TS da água de 70,6 mN/m para 41,87 mN/m. A Figura 25-C indica o resultado da TS da água ultrapura que passou de 70,6 mN/m para 32,5 mN/m quando analisadas as diferentes concentrações do biossurfactante produzido pela cepa de *F. solani* - FF51. Para essa cepa a CMC foi 1,17 mN/m. Para o biossurfactante produzido pelo fungo *C. vietnamensi* - FF33 a CMC foi 1,08 mg/mL (Figura 25-D), destacando-se este como o menor valor dentre os quatro biossurfactantes dos fungos testados. Para essa última cepa citada a TS da água reduziu de 70,6 mN/m para 31,94 mN/m.

Destaca-se nesse estudo, os índices de CMC: 1,17 mg/mL para o fungo *F. Solani* - FF51 (Figura 25-C) e 1,08 mg/mL para o fungo *C. vietnamensi* (Figura 25-D), utilizando extratos brutos. As concentrações de saturação das moléculas de biossurfactantes na superfície do líquido, reduziram a TS da água de 70,6 mN/m para 32,5 mN/m (54,0%) e 31,94 mN/m (54,8%), respectivamente.

Em suas pesquisas, Zhang e Miller (1992), Stampfli e Nersten (1995) e Monteiro (2007) afirmam que a CMC dos biossurfactantes varia entre 1-2000 mg/L (0,001 a 2 mg/mL), para moléculas purificadas. Nesse sentido, os valores de CMC obtidos nos extratos brutos avaliados podem ser considerados significativos pois encontram-se dentro da faixa considerada eficaz para os purificados.

De acordo com Silva (2019), que também analisou extratos brutos de endofíticos de plantas da Amazônia, os biossurfactantes produzidos pelos fungos *T. versicolor* (Ph I.12F) e *T. herodensis* (MgC 3.3.1) utilizando resíduo de óleo de fritura como fonte de carbono apresentaram valores de CMC de 4,55 mg/mL e 4,72 mg/mL reduzindo a tensão superficial da água de 70,4 mN/m para 33,43 mN/m e 35,45 mN/m respectivamente. Em outro estudo a CMC obtida para o biossurfactante produzido pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi de 4,6 mg/mL reduzindo a tensão superficial da água de 74 para 65 mN/m (SILVA, 2015). Silva et al.(2019) apresentam pesquisa realizada com fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* (Piperaceae), da Amazonia, onde obtiveram maior diminuição na tensão superficial

(36%) para o fungo - Ph III 23L - *Aspergillus niger*, que reduziu a TS de 68,0 para 44,0 mN m⁻¹ e a CMC para o mesmo endófito (14,93 mg/ml⁻¹). Esses resultados mostram-se diferentes quando comparado com os obtidos para o fungo do mesmo gênero (*C. vietnamensi*) e para os do gênero *Fusarium* utilizados em nosso estudo, que apresentam a CMC mais baixa e maior redução da TS.

Em estudos realizados com o gênero *Fusarium* destaca-se o trabalho de Bhardwaj, Cameotra e Chopra, (2015) que ao estudar a espécie *F. proliferatum* e obter biossurfactante purificado apresentou para essa molécula a CMC de 0.33 mg/mL⁻¹, com redução da tensão superficial da água destilada de 71,2 para 36,6 mNm⁻¹. O biossurfactante, também foi capaz de emulsionar vários hidrocarbonetos como o óleo de coco, óleo refinado, querosene e n-dodecano. Reis (2017), a partir de solos contaminados com hidrocarbonetos isolou a cepa *F. fujikuroi* UFSM-BAS-01, que apresentou potencial para a produção de biossurfactantes utilizando glicose como substrato e uma CMC no valor de 30 mg/L⁻¹ utilizando extrato purificado.

Para fins de comparação, a CMC do SDS é de 1800 mg / L, reduzindo a água tensão superficial de 72 a 39 mN / m (SINGH et al., 2007). Contudo, os resultados obtidos de CMC e redução da TS para os extratos testados são vantajosos, quando comparados a outros dados da literatura.

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

O método de microdiluição em microplaca permitiu a avaliação da atividade antimicrobiana. A triagem realizada com as 12 frações dos extratos serviu para selecionar os que apresentaram algum tipo de ação (bactericida ou bacteriostática) frente aos patógenos testados. Os resultados para as diferentes concentrações avaliadas nos ensaios (1mg/mL, 2mg/mL e 4 mg /mL) estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18: Triagem dos extratos de fungos endofíticos de *Gustavia cf. hexapétala* com atividade antimicrobiana contra patógenos da microbiota oral.

N ord.	Fungo	Extratos Fúngicos	<i>S. mutans</i>			<i>L. casei</i>			<i>C. albicans</i>		
			1 mg	2 mg	4 mg	1 mg	2 mg	4 mg	1 mg	2 mg	4 mg
1	FF51	Extrato L1 (AcoEt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	FF45	Extrato L2 (AcoEt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	FF36	Extrato L3 (AcoEt)	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	FF33	Extrato L4 (AcoEt)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	FF17	Extrato L5 (AcoEt)	+	+	+	-	+	+	-	-	-
5	FF51	Extrato L1.1 (AcoEt) Espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	FF45	Extrato L2.1 (AcoEt) Espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	FF36	Extrato L3.1 (AcoEt) Espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	FF51	Extrato M1 (MeOH)	-	-	-	-	-	+	-	-	+
9	FF45	Extrato M2 (MeOH)	-	-	-	-	-	+	-	-	+
10	FF33	Extrato M4 (MeOH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	FF17	Extrato M5 (MeOH)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os destaques em negrito correspondem aos extratos que apresentaram atividade antimicrobiana
 +: indica atividade antimicrobiana -: indica ausência de atividade antimicrobiana

Dos doze extratos testados, quatro obtiveram resultados positivos para os ensaios antimicrobianos. As cepas bacterianas padrão utilizadas na pesquisa foram *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, e a levedura *Candida albicans*. A fração L5 obtida a partir do extrato do caldo metabólico do fungo *F. decemcellulare* (FF17) apresentou atividade antimicrobiana para os patógenos *S. mutans* e *L. casei*. A fração M1 obtida do micélio do fungo *F. solani* (FF51) e a fração M2 do micélio do fungo *F. solani* (FF45) tiveram ação contra *L. casei* e *C. albicans*. A fração L3 obtida do extrato do caldo metabólico do fungo *Diaporthe sp.* (FF36) apresentou ação apenas para o patógeno *S. mutans*. As demais frações não apresentaram nenhum tipo de ação antimicrobiana frente às bactérias e levedura testadas.

5.7.1 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento celular. A CBM pode ser definida como a menor concentração dos extratos, frações e substâncias capaz de matar o microrganismo. A realização do teste de CBM foi realizado para comprovar a concentração bactericida ou bacteriostática.

Os dados descritos na Tabela 19 mostram que os extratos dos fungos endofíticos de *G. cf. hexapétala* selecionados para essa pesquisa apresentaram atividade antimicrobiana

contra os patógenos testados. O extrato do fungo *Diaporthe* sp. (FF36) apresentou atividade apenas contra o *S. mutans* enquanto o extrato do fungo *F. decemcellulare* (FF17) apresentou atividade contra *S. mutans* e *L. casei*. Os extratos dos micélios de *F. solani* (FF51) e *F. solani* (FF45) apresentaram atividade fungistática contra *C. albicans* além de apresentarem ação bactericida e bacteriostática contra *L. casei*.

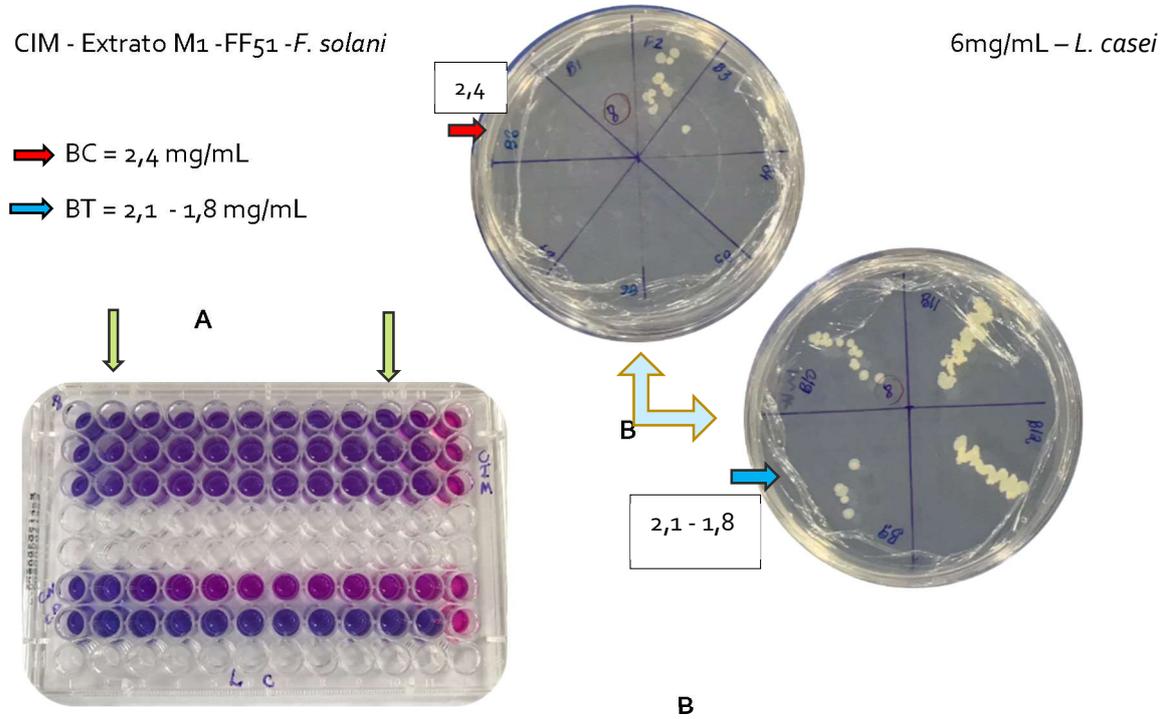
Tabela 19: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de fungos endofíticos de *G. cf. hexapétala* contra patógenos da cavidade oral.

Extratos Fúngicos	<i>S. mutans</i>							
	Concentração do extrato mg/mL							
	1 mg/mL				3 mg/mL			
	CIM	CBM	BC	BT	CIM	CBM	BC	BT
FF36 - <i>Diaporthe</i> sp Extrato L3	*	*	*	*	2,4	3,0	3,0	2,4
FF17- <i>F. decemcellulare</i> Extrato L5	0,4	0,5	0,5	0,4	0,75	0,75	0,75	—
Extratos Fúngicos	<i>L. casei</i>							
	Concentração do extrato mg/mL							
	5 mg/mL				6mg/mL			
	CIM	CBM	BC	BT	CIM	CBM	BC	BT
FF17- <i>F. decemcellulare</i> Extrato L5	1,5	1,75	1,75	1,5	*	*	*	*
FF51 - <i>F. solani</i> Extrato M1	*	*	*	*	1,8	2,4	2,4	1,8
FF45 - <i>F. solani</i> Extrato M2	*	*	*	*	2,1	-	-	2,1 2,7
Extratos Fúngicos	<i>C. albicans</i>							
	Concentração do extrato mg/mL							
	3 mg/mL				6mg/mL			
	CIM	CBM	BC	BT	CIM	CFM	BC	BT
FF51- <i>F. solani</i> Extrato M1	*	*	*	*	3,6	-	-	3,6
FF45- <i>F. solani</i> Extrato M2	*	*	*	*	4,2	-	-	4,2

BC: bactericida **BT:** bacteriostático -:sem ação antimicrobiana *: concentração não testada contra o patógeno antimicrobiana

As Figuras 26 27 e 28 indicam os resultados dos testes de CIM, CBM e CFM realizados em placa de Eliza e em Placa de Petri, com meios de cultura específicos para dada patógeno. Os extratos metanólicos dos micélios de *F. solani* (FF51) e de *F. solani* (FF45) que apresentaram ação antimicrobiana nos testes de triagem foram utilizados nessa etapa da pesquisa contra à bactéria *L. casei* e a levedura *C. albicans*.

Figura 26: **A:** Microplaca de determinação da CIM de extrato do micélio do fungo *F. solani* (FF51). **B:** Placas semeadas com conteúdo dos poços da microplaca de diluição para comprovação da CBM na concentração inicial de 4,8 mg/mL para *L. casei*.



*a cor azul-violeta indica ausência de crescimento microbiano, enquanto variações vermelho-rosa indicam presença de células viáveis. A leitura das cores foi realizada 4 h após a adição de resazurina.

Figura 27: A: Placa de determinação da CIM de extrato M2 do fungo endofítico *F. solani* (FF45) para *L. casei*. B: Placa semeada com conteúdo dos poços de diluição para comprovação da CBM.

Teste de CIM e CBM do extrato M2 do fungo *F. solani* para *L. casei* (6mg/mL).

→ BT = 2,7 mg/mL

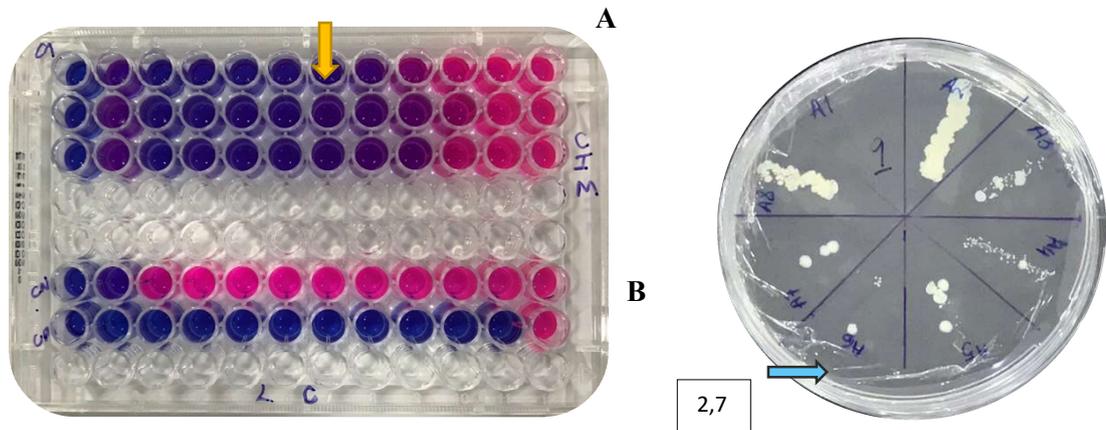
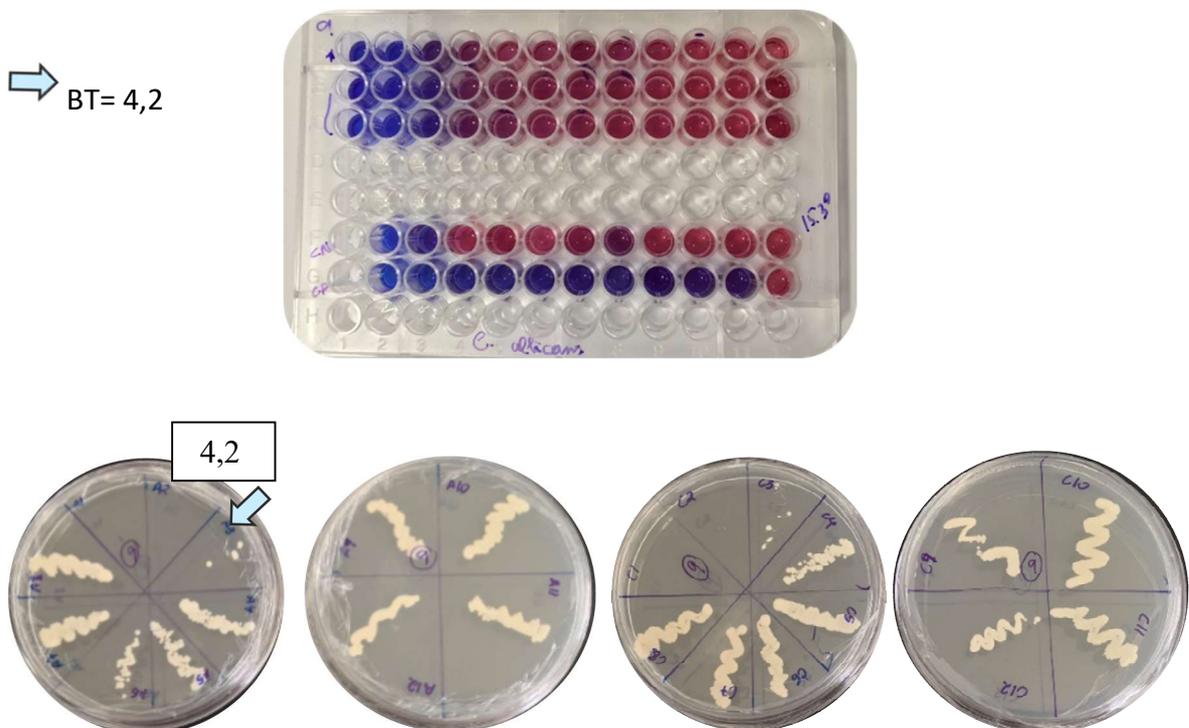


Figura 28: Determinação da CIM de extrato de micélio (M2) do fungo endofítico *F. solani* (FF45) contra *C. albicans*. Placas semeadas com conteúdo dos poços da placa de microdiluição para comprovação da CBM.

→ BT = 4,2



Os teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) realizados nas placas de Eliza nos quais foram adicionados o corante revelador da viabilidade celular do patógeno permitiu avaliar qualitativamente os resultados obtidos após o tempo previsto no ensaio e inferir o valor da CIM da substância teste. Desse modo a CIM do extrato do fungo *F. decemcellulare* (FF17) contra *S. mutans* foi de 0,4 mg/mL e para o *L. casei* a CIM do mesmo extrato foi 1,5 mg/mL. Os metabólitos produzidos por *Diaporthe* sp. (FF36) apresentaram ação apenas contra *S. mutans* com CIM de 2,4 mg/mL. Os extratos dos micélios de *F. solani* (FF51) e *F. solani* (FF 45) apresentaram atividade fungistática contra *C. albicans* e bactericida contra *L. casei*. Esses extratos não apresentaram ação contra a bactéria *S. mutans*. A CIM do extrato M1 de *F. solani* (FF51) para o *L. casei* foi 1,8 mg/mL e a CBM foi de 2,4mg/mL. O mesmo extrato apresentou ação fungistática contra *C. albicans*, tendo CFM de 3,6 mg/mL. A CIM do extrato M2 de *F. solani* (FF45) apresentou ação bacteriostática para *L. casei* e fungistática para *C. albicans* com concentração de 2,7 mg/mL e 4,2 mg/mL, respectivamente (Tabela 20).

Tabela 20: Atividades antimicrobianas dos extratos dos fungos endofíticos de *G. cf. hexapetala* testados contra *S. mutans*, *L. casei* e *C. albicans*.

Especies Fúngicas	Extratos Orgânicos	Microorganismo teste	CIM (mg/mL)
<i>F. decemcellulare</i> (FF17)	ACOET	<i>S. mutans</i>	0,4
		<i>L. casei</i>	1,5
<i>F. solani</i> (FF51)	MEOH	<i>L. casei</i>	1,8
		<i>C. albicans</i>	3,6*
<i>F. solani</i> (FF45)	MEOH	<i>L. casei</i>	2,1
		<i>C. albicans</i>	4,2*
<i>Diaporthe</i> sp. (FF36)	ACOET	<i>S. mutans</i>	2,4

*Apresentou ação fungistática (CFM)

Em seus estudos Oliveira et al. (2009) relatam que a CIM determina a menor quantidade do composto bioativo capaz de inibir o crescimento microbiano em condições padronizadas. Na pesquisa desenvolvida por Toda et al. (2011) foi analisado o potencial de oito fungos endofíticos na produção de metabólitos antimicrobianos, obtendo a CIM de 10000µg/mL para os extratos de *Penicillium simplicissimum* e *Aspergillus penicilloide* contra *S. mutans*. Na presente pesquisa, os extratos de *F. decemcellulare* (FF17) e *Diaporthe* sp

(FF36) também apresentaram produção de bioativos com ação antimicrobiana contra *S. mutans* com a CIM de 0,4 mg/mL e 2,4mg/mL respectivamente.

Nos estudos de Toda et al. (2011) nenhuma das espécies fúngicas analisadas produziu metabólitos secundários com atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*. Estudo com o extrato bruto do fungo *Microsphaeropsis olivaceae* realizado por Hormazabal e Piontelli (2009) também não apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, resultados que diferem do presente estudo que apresentou ação fungistática comprovada contra o referido patógeno.

Phongpaichit et al. (2007) avaliaram extratos de fungos endófitos isolados de espécies do gênero *Garcinia* sp. e obtiveram valores entre 32 µg/mL a 512 µg/mL contra *S. aureus*. Nos estudos de Bernardes (2010) os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp ficou entre 62,5 e 125 µg/mL, contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). O extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. apresentou CIM na faixa de 62,5-125 µg/mL e CBM maior que 1000 µg/mL. Fernandes et al. (2009) verificaram que o extrato da fermentação do fungo *Itternaria alternata* apresentou CIM de 50-100 µg/mL, sendo a CBM maior que 800 µg/mL.

Prado (2017) relata em seus estudos que CIM variou de 15,62 a 250 µg/µL, frente aos microrganismos examinados. Nessa análise, *E. coli* e *C. albicans* foram os microrganismos mais resistentes, apenas o extrato etanol de *A. flavo furcatis* DPUA 1451, preservado em água, foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* com CMI equivalente a 15,62 µg/µL.

Ribeiro (2015) avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de 29 fungos endofíticos de *Oryctanthus alveolatus*, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Apenas três extratos, conseguiram inibir o crescimento bacteriano. Os resultados dos testes para o extrato Coa 007 apresentou CIM nos valores de 900 µg.mL⁻¹ para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* e CIM no valor de 1000 µg.mL⁻¹ para a bactéria *S. aureus*. O extrato Coa 009a apresentou CIM no valor de 1000 µg/mL⁻¹ para *S.aureus* e *E.coli* e o extrato Coa 014 apresentou CIM nos valores de 900µg.mL⁻¹ para *E. coli* e 1000 µg.mL⁻¹ para *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Esses resultados corroboram com a presente pesquisa, pois demonstram a importância de estudos com fungos endofíticos na produção de metabólitos de interesse em especial na área da saúde com destaque na produção de antimicrobianos.

Pesquisas realizadas por Gudiña et al. (2010) apresentaram resultados inéditos sobre atividade antimicrobianas e antiaderentes do biossurfactante isolado de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20, contra 18 microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gam-negativas, leveduras e fungos filamentosos. O biossurfactante foi eficaz contra todos os microrganismos testados, mesmo que em graus e concentrações diferentes. Para as cepas não patogênicas de *Lactobacillus* e às espécies de *Streptococcus* associadas à cavidade oral (*S. sanguis*, *S. mutans* e *S. oralis*), observaram inibição completa do crescimento para concentrações do biossurfactante entre 25 e 50 mg/mL, exceto para as cepas cariogênicas *S. mutans* NS e *S. mutans* HG985. Para a levedura *C. albicans* ocorreu uma inibição total do crescimento na concentração de 50 mg/mL. Em relação a atividade antiadesiva para os patógenos associados à cavidade oral, foram obtidas as maiores porcentagens para *S. sanguis* 12 (72,9%), enquanto os mais baixos foram para *S. mutans* HG985 (31,4%).

De acordo com o que é descrito por Jeon et al. (2011) a cárie dentária é a doença infecciosa oral mais prevalente e cara no mundo e os biofilmes virulentos firmemente presos às superfícies dos dentes são os principais fatores biológicos associados a esta doença. Neste contexto, pesquisas que visam a prospecção de moléculas bioativas no controle da microbiota patogênica oral são fundamentais e merecem atenção da comunidade científica.

Moléculas como biossurfactantes com ação antimicrobiana e com atividade sobre biofilmes tem sido relatadas em estudos nesse sentido, principalmente, na área médica. Pesquisas na área da saúde e em particular na área odontológica necessitam de maior investimento.

Rufino et al. (2011) verificaram a inibição de microrganismos envolvidos na formação de biofilme em próteses e dispositivos médicos, incluindo *S. mutans*, *S. mutans* NS e *S. mutans* HG 985 por biossurfactante extraído de *Candida lipolytica*. Os autores relatam inibição de *S. mutans* HG (64,9%); *S. mutans* (58%) e *S. mutans* NS (46%), pelo biossurfactante numa concentração de 0.75 mg/L. Monteiro et al. (2011) mostraram que um biossurfactante do tipo glicolipídico produzido pela levedura *Trichosporon montevidense* CLOA72 não apresentou efeito citotóxico em células de mamíferos e que usando 16 mg/mL reduziu em até 87,4% a formação de biofilme de uma cepa de *C. albicans* isolada do canal apical.

Os produtos de origem natural continuam sendo uma fonte amplamente inexplorada de moléculas eficazes contra biofilmes com toxicidade potencialmente baixa e que podem ser usadas em terapias anticáries alternativas ou adjuvantes (JEON et al., 2011).

Neste sentido, as moléculas de biossurfactantes por suas características multifuncionais tem sido apresentada como alternativas promissoras e dessa forma sendo inseridas nas formulações dos dentríficos e enxaguantes bucais.

Destacam-se, assim, algumas pesquisas na área odontológica no qual foi verificado que o biossurfactante obtido de *Bacillus subtilis* ou *Actinobacteria* pode atuar como um bom ingrediente no lugar do surfactante químico para formulação de pasta de dente, com destaque para a boa capacidade de formação de espuma, boa eficiência de limpeza, remoção de manchas e um pH alcalino necessário para a neutralização do biofilme ácido (Das et al., 2013b). Já Bouassida et al. (2017), realizaram avaliação da atividade antimicrobiana de dentifrício formulado com biossurfactante SPB1 contra oito bactérias. Os resultados demonstraram que o produto formulado exibiu uma atividade antimicrobiana importante, que foi muito eficaz contra *Enterobacter* sp e *Salmonella typhimurium*.

Farias et al. (2019) descrevem pela primeira vez o uso de biossurfactantes associados a um polímero natural e/ou óleo essencial como ingredientes ativos em enxaguatórios bucais para o controle de microrganismos orais cariogênicos. Os biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 (PB), *Bacillus cereus* UCP 1615 (BB) e *Candida bombicola* URM 3718 (CB), foram utilizados nas formulações e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada. Entre os biossurfactantes, o PB foi o mais eficaz na inibição de *S. aureus*, *E. coli* e *S. salivarius* (MIC: 20 µg / mL). PB e CB tiveram efeitos semelhantes em *S. mutans* (MIC: 20 µg / mL). Todos os biossurfactantes tiveram o mesmo efeito em *C. albicans* e *L. acidophilus* (CIM: 40 µg / mL). Os resultados encontrados demonstraram que os enxaguatórios bucais contendo produtos naturais constituem uma alternativa segura, eficaz e natural aos enxaguatórios bucais disponíveis comercialmente para o controle de microrganismos orais.

A partir do resultado dessas pesquisas pode-se concluir que os biossurfactantes podem atuar como um ingrediente na formulação de dentríficos, sendo uma alternativa na substituição para os surfactantes químicos, uma vez que, os estudos indicam que os biossurfactantes são mais eficientes e menos tóxicos quando comparado com os surfactantes sintéticos. Em razão de suas características vantajosas, como por exemplo, a compatibilidade ambiental, no futuro os biossurfactantes podem ser usados em outras formulações cosméticas (DAS et al., 2013b).

Tais pesquisas são importantes pois elucidam e comprovam a eficácia dos biossurfactantes como moléculas antimicrobianas e antiadesivas. Nesse sentido, os biossurfactantes são extremamente relevantes para uso no combate a muitas doenças e

infecções e como agentes terapêuticos podendo vir a ser adequadamente substitutos para os antibióticos convencionais.

Diante dos resultados obtidos observamos que bactérias da microbiota oral formadoras de biofilme acidogênico (*S. mutans* e *L. casei*) foram susceptíveis aos extratos metabólitos (biossurfactantes) dos fungos endofíticos utilizados neste estudo. Dessa forma, Conde (2006) ressalta que o estabelecimento inicial da microbiota rica em *Streptococcus* sp. aparenta ser um antecedente necessário para a subsequente proliferação de outros organismos, sendo importante a ação de um agente antimicrobiano sobre esses colonizadores primários favorecendo a quebra do mecanismo de sucessão microbiana e posterior formação do biofilme.

Os resultados deste trabalho confirmam o potencial de fungos endofíticos como produtores de compostos bioativos com atividade antimicrobiana, já que metabólitos obtidos a partir de isolados endofíticos extraídos com acetato de etila e metanol apresentaram ação antimicrobiana frente aos patógenos orais utilizados nesta pesquisa.

5.8 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Na análise dos extratos de fungos endofíticos de *G. cf hexapetala* por espectrometria de massas, as amostras foram solubilizadas em MeOH na concentração de 1,0 mg/mL⁻¹ (solução-mãe), e dessa solução, 20 µL foram diluídos em 1,0 mL de MeOH (solução de análise). As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas THERMO (ionização por eletrospray – ESI-MS), com scan de 100 a 1.000 m/z e de 1000 a 2000 m/z em modo positivo e modo negativo. A faixa de 100 a 620 m/z foi mais frequente, apresentando os maiores picos de íons.

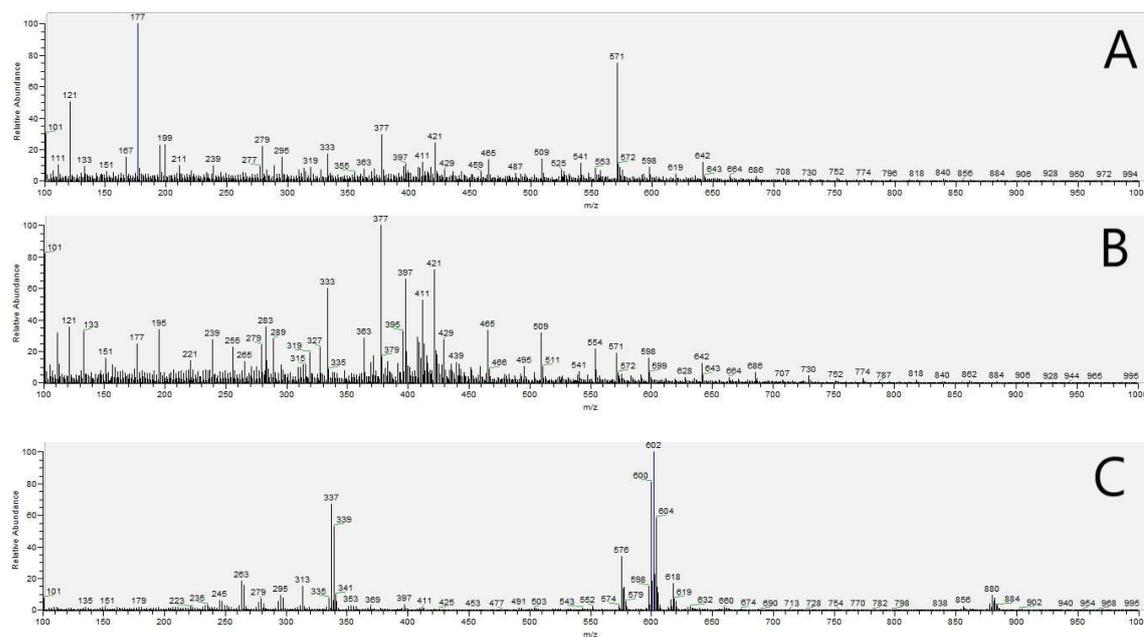
Pesquisas relatadas por Lou, Xing, Deng, 2011; Marcon, 2013; Dominato, (2017), apontam que os metabólitos produzidos pelos fungos ocorrem normalmente no fim do crescimento exponencial ou em substratos com fontes limitadas de nutrientes, sendo produzidos a partir de intermediários metabólicos comuns, porém em vias biossintéticas reguladas por genes específicos.

A Figura 29 apresenta o perfil químico dos extratos oriundos das espécies *F. decencellulare*, *Diaporthe* sp. e *C. vietnamensi*, de modo que os picos majoritários estão evidenciados na Tabela 21.

Tabela 21: Íons majoritários presentes no espectro dos extratos analisados por espectrometria de massas de fungos endofíticos

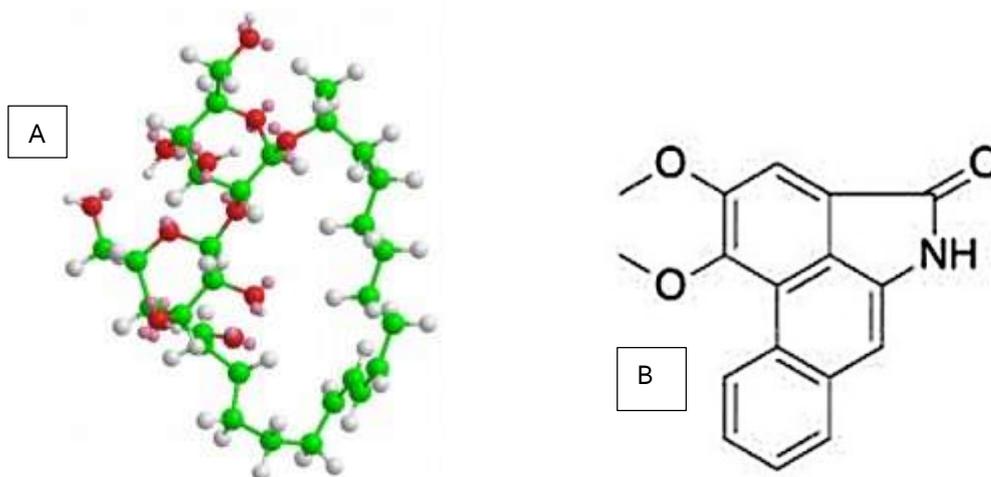
Amostra	Extrato (Fração)	Íons majoritários (modo positivo)
Extrato de <i>F. decencellulare</i>	L5- AcoEt	121, 177, 571
Extrato de <i>Diaporthe</i> sp.	L3.1 - Espuma	377, 397, 421
Extrato de <i>C. vietnamensi</i>	L4 - AcoEt	337, 339, 576, 600, 602, 604

Figura 29: (A) Espectro de massa de *Fusarium decencellulare* (FF17); (B) Espectro de massa de *Diaporthe* sp. (FF-36); (C) Espectro de massa de *Colletotrichum vietnamensi* (FF33).



Alguns dos sinais presentes nos espectros correspondem a metabólitos já isolados e descritos na literatura (Figura 30A e B)). Um destes casos é o biossulfarctante soforolipídio lactônico com cadeia lipídica hexadecenoica (A) e o soforolipídio ácido de cadeia acídica tridecenoica, produzido pelo fungo *Rhodotorula babjevae* – m/z 579 e m/z 553 (SEN, et al., 2017). O flavonoide aristolactama B-II (B) - m/z 279, também já foi isolado, neste caso de espécies de *Anona* spp.

Figura 30: A - Estrutura do sofrorolípido ácido de cadeia acídica tridecenoica. B - flavonoide aristolactama.



É necessário, no entanto, a continuidade nos estudos partindo para a purificação dos compostos bioativos e elucidação das estruturas químicas utilizando métodos já conhecidos e que facilitem o desenvolvimento da pesquisa.

Outras metodologias para extração e purificação dos biossurfactantes, uso de novos substratos, produção e otimização das condições de crescimento, são estratégias interessantes a serem adotadas visando a produção em maior escala das moléculas de interesse. É importante utilizar as linhagens que foram previamente conhecidas e que já mostraram potencial promissor. Destaca-se nesse aspecto a importância que representa a pesquisa básica na prospecção por microrganismos com potencial para produção de metabólitos de interesse industrial e que fazem parte da biodiversidade Amazônica.

6 CONCLUSÃO

O estudo com a planta *Gustavia cf. hexapétala* permitiu investigar amostra da biodiversidade endofítica, com o isolamento de fungos, possibilitando a realização de estudos sobre o seu potencial biotecnológico;

Por análise morfológica foi possível classificar os fungos em 20 morfogrupos e identificar pelo menos 8 gêneros diferentes. A maioria, no entanto, não foi possível identificar;

Foram obtidos resultados positivos nos testes para a atividade emulsificante e de tensão superficial permitindo a seleção de linhagens com potencial para a produção de biossurfactantes;

Os métodos utilizados para avaliar a produção de biossurfactantes pelos fungos endofíticos de *G. cf. hexapétal*, foram eficientes no processo de seleção dos endófitos;

Foram identificadas as seguintes espécies por meio de técnicas moleculares *Fusarium solani*, *Fusarium decemcellulari*, *Colletotrichum vietnamensi*, *Diaporthe sp.*, e *Fusarium polyphialidicum*;

Extratos brutos obtidos após cultivo dos fungos em condições para indução de produção de biossurfactantes, utilizando óleo de soja, apresentaram atividades antimicrobianas contra patógenos da cavidade oral: *S. mutans*, *L. casei* e *C. albicans*;

A pesquisa possibilitou a descoberta de fungos endofíticos produtores de biossurfactantes, sendo necessários novos ensaios para a completa otimização na produção e posterior isolamento destas moléculas e caracterização da estrutura química, de forma a abrir perspectivas para sua aplicação em escala industrial;

Os fungos endofíticos utilizados na pesquisa, apresentaram potencial na produção de bioativos antimicrobianos contra patógenos da cavidade oral, com novas possibilidades de uso no campo odontológico, utilizando-se moléculas naturais em substituição às moléculas sintéticas no controle das doenças bucais.

REFERENCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, Washington, DC, v. 17, n. 5 p. 1367-1371, 2001.
- ACIOLY, L. M. L.; SILVEIRA, A. A. B.; ANJOS, M. N.; SILVA, G. K. B.; LEITE, M. V. OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel, vegetable oil and corn steep liquor as substrate. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges**, p. 344-347, 2012.
- ADDY M.; PRAYITNO S.; TAYLOR L.; CADOGAN, S. An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. **J Periodontal Res.**14(5):403-10. 1979.
- ADNAN, M.; ALSHAMMARI, E.; ASHRAF, S. A.; PATEL, K.; LAD, K.; & PATEL, M. Physiological and Molecular Characterization of Biosurfactant Producing Endophytic Fungi *Xylaria regalis* from the Cones of *Thuja plicata* as a Potent Plant Growth Promoter with Its Potential Application. **BioMed Research International**, 1–11, 2018.
- AGARWAL, P.; NAGESH, L. Comparative evaluation of efficacy of 0.2% Chlorhexidine, Listerine and Tulsi extract mouth rinses on salivary *Streptococcus mutans* count of high school children - RCT. **Contemp. Clin. Trials**, v.32, n.6, p. 802- 8, nov, 2011.
- AHIMOU, F.; JACQUES P.; DELEU, M. Surfactin and iturin a effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme Microb. Tech.** 27, 749-54. 2001;
- AHN S. J.; WEN Z. T.; BRADY L. J.; BURNE R. A. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. **Infect Immun** 76:4259–4268, 2008.
- ALBUQUERQUE P.M.; SILVA M.E.T.DA.; OLIVEIRA R.L.; DUVOISIN JR. S. Estudo da produção de biossurfactantes por fungos endofíticos de *Piper hispidum*. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos XI simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2015.
- ALBUQUERQUE, A.C.L.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIR, J.V.; PEREIRA, L.F.; SILVA, D.F.; MACEDO-COSTA, M.R.; HIGINO, J.S. Efeito antiaderente do extrato da *Matricaria recutita* Linn. Sobre microorganismos do biofilme dental. **Rev Odontol UNESP**, 39(1): 21-25 © 2009 - ISSN 1807-2577, Araraquara. jan./fev., 2010;
- ALMEIDA, D.G.; SOARES DA SILVA, R.C.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1718. 2016.

ALMEIDA, M.F. O. **Estudos Químicos e Biológicos de Fungos endofíticos de *Gustavia* sp. Tese (Doutorado em Química)** – Universidade Federal do Amazonas. 195f.: il. color; 29,7, 2014.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, 1, p. 1-16, 2010.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829- 1845, 2011.

ANDRADE SILVA, N. R.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO, L. O.; SILVA, G. K. B.; DE SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a *Promising Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **Int. J. Mol. Sci.** 15, 15377-15395, 2014.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, Suppl. S1, p. 5-16, 2001.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* ssp. on biodegradation of crude oil. In: **International Conference on Environmental Science and Technology**, 2, Singapore: CBEES, IEEE, v.6, p.71-75, 2011.

ARAÚJO L. V.; FREIRE D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 6, 848-858, 2013.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 111p. 1996.

AZEVEDO, J. L. Endophytic Fungi from Brazilian 2 Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications .R. N. Kharwar et al. (eds.), **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. DOI 10.1007/978-81-322-1801-2_2, © Springer India, 2014

AZEVEDO, J. L. e COSTA S. O. P. **Exercícios Práticos de Genética**; São Paulo– S.P.; 288p. 1973.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA,. p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI BN, DESHMUKH SK, editors. **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: **Anamaya Publishers**, 189-207p, 2007.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO W. L.; & PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: L. A. SERAFINI, N. M. BARROS & J. L. AZEVEDO (Ed.): *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*: 269-294. **Editora da Universidade de Caxias do Sul**, Caxias do Sul, 2002.

BANAT, I. M.; DE RIENZO, M. A. D.; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 98 9915–9929, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6169-6>, 2014.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444. 2010.

BANDEIRA, M.F.C.L. **Estudo comparativo da compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio, em diferentes níveis de pesquisa: farmacológico, microbiológico e tecido conjuntivo subcutâneo de rato**. 1998. 226f. Universidade Estadual Paulista (Júlio de Mesquita Filho), Araraquara. 1998.

BANHOS, E. F. D.; SOUZA, A. Q. L. D.; ANDRADE, J. C. D.; SOUZA, A. D. L. D.; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(1), 153-162, 2014.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, M. G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, 30:01–14. doi: 10.1590/ S0100-40422007000200031. 2007.

BASTOS, D. Z. L.; PIMENTEL, I. C.; JESUS, D. A.; OLIVEIRA, B. H. Biotransformation of betulinic and betulonic acids by fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 834-839, 2007.

BATISTA, I. H. **Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia**. Tese de Doutorado (Biotechnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 184p., 2009.

BATISTA, I. H.; ALBUQUERQUE, C. C.; FERREIRA, F. S.; VEIGA, V. F.; PEREIRA, J. O. Potencial para produção de biossurfactantes em bactérias isoladas de macrófita aquática na Amazônia. **Marupiara - Revista Científica do Centro de Estudos Superiores de Parintins**, v. 1, p. 1-16, 2017.

BATRAKOV, S. G.; KONOVA, I. V.; SHEICHENKO, V. I.; GALANINA, L. A. Glycolipids of the filamentous fungus *Absidia corymbifera* F-295. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.123, n.2, p.157-164, 2003.

BERNARDES, Maria Tereza Carneiro Paschoal. **Fungos endófitos do cacau: seleção e avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa do extrato da fermentação de *microspheeropsis* sp.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos - Universidade Federal de Alfenas, 2010.

BESSION F.; PEYPOUX F.; MICHEL G et al. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. **J Antibiot** (Tokyo), 29: 1043–9. 1976.

BEZERRA, L.M. D.; FERREIRA, G.L.S.; SILVA, I. C. G.; CASTRO, R.D. Atividade Antibacteriana In Vitro de Fitoconstituintes Sobre Micorganismos do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. ISSN 1415-2177. DOI:10.4034/RBCS.2013.17.01.10. Volume 17 Número 1 Páginas 79-84, 2013.

BHARDWAJ G, CAMEOTRA SS, CHOPRA HK . Biosurfactants from Fungi: A Review. **J Pet Environ Biotechnol** 4: 160. doi:10.4172/2157- 7463.1000160, 2013.

BHARDWAJ, G., CAMEOTRA, S.S., CHOPRA, H.K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. **RSC Adv**. v.5, 54783–54792, 2015.

BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos**: 1998.

BORUAH, B., & GOGOI, M. Plant based natural surfactants. **Asian Journal of Home Science**, 8(2), 759---762, 2013.

BOUASSIDA, M.; FOURATI, N.; KRICHEN, F.; ZOUARI, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI S.; GHRIBI, D. Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptides in toothpaste, **J Adv Res** 8 (2017) 425-433. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2010.12.007>, 2017.

BOUASSIDA, M.; GHAZALA, I.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Improved Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SPB1 mutant obtained by random mutagenesis and its application in enhanced oil recovery in a sand system. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.28, n.1, p.95-104, 2018. DOI: 10.4014/jmb.1701.01033

BRAGA, M.O.; SPESSOTO, A. M. Produção de antimicrobianos por bactérias endofíticas isoladas de *Cordia verbenácea* (erva-baleeira). **Revista de Biologia e Farmácia**. ISSN 1983-4209, Vol. 03, Número 02., 2008.

BRUMANO, L.P.; SOLER, M.F.; DA SILVA, S.S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**. v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.

BUSSCHER H. J.; VAN DE BELT-GRITTER B.; WESTERHOF M. et al. Microbial interference in the colonization of silicone rubber implant surfaces in the oropharynx: *Streptococcus thermophilus* against a mixed fungal/bacterial biofilm. In: Rosenberg E, ed. *Microbial Ecology and Infectious Disease*. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 1999; 66–74.

BUSSCHER H.J.; VAN HOOGMOED C.G; GEERTSEMA-DOORNBUSCH G.I; et al. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. **Appl Environ Microbiol** 1997; 63: 3810–7.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. **Future prospects. Sci. Total Environ**, 407, 3634–3640. 2009.

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

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**. Volume 7, Issue 3, June Pages 2, 2004.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 672, p. 261-280, 2010.62-266. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 1097–1108. 2013.

CASTELLANI A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J Trop Med Hyg.**;24:270-6, 1939.

CASTIGLIONI, G. L. et al. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292–295, 2009.

CASTRO, R.D.; FREIRES, I. A.; FERREIRA, D. A. H.; JOVITO, V.C.; PAULO, M.Q. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos naturais sobre o *Lactobacillus casei*. **Int J Dent**, Recife, 9(2): 74-77, abr./jun, 2010.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, n. 1, p. 63-

71. 2011.

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

CHEN, W.C.; JUANG, R.S.; WEI, Y.H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. v.103, p.158–169, 2015.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; & SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, 59, 16-40, 2014.

CHIEWPATTANAKUL, P.; PHONNOK, S.; DURAND, A.; MARIE, E.; & THANOMSUB, B. W. Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. **J. Microbiol. Biotechnol**, 20(12), 1664-1671, 2010.

CHRISTOVA, N.; TULEVA, B.; KRIL, A.; GEORGIEVA, M.; KONSTANTINOV, S.; TERZIYSKI, I.; NIKOLOVA, B. and STOINEVA, I. Chemical Structure and In Vitro Antitumor Activity of Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. **Appl. Biochem. Biotechnol.**; 170, 676-89, 2013

CIANCIO S.G. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. **Periodontol** 2000. 8:75-86. 1995.

CIBULSKI, S.P. **Saponinas de *Quillaja brasiliensis*: potencial imunoadjuvante e mecanismos celulares e moleculares de ação**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 23, 2015.

COCHIS, A.; FRACCHIA, L.; MARTINOTTI, M. G.; RIMONDINI, L. Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 113, n. 6, p. 755-761, 2012.

COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. L. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2012.

CONDE, N. C. O. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da Amazônia sobre bactérias do biofilme dental**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Da Paraíba. Programa Integrado De Pós-Graduação Em Odontologia, João Pessoa, 2006.

COOPER, D. G.; & GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, 53(2), 224-229, 1987.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Colaboração de Leonan de A. Penna. Rio de Janeiro, IBDF, 6v., 1984.

CORRÊA, M.S.N.P. Odontopediatria na primeira infância. São Paulo: Ed. Santos, 1998. 679p.

COSTERTON, J. W., P. S. STEWART, AND E. P. GREENBERG. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.

COTA, A. L.; SILVA, V.; & DA SILVA, S. M. Virulence of *Streptococcus mutans*: An intrafamilial cohort study on transmission of genotypes. **Journal of clinical and experimental dentistry**, 12(1), e59–e64. <https://doi.org/10.4317/medoral.56038>, 2020.

CURTIS M. A.; ZENOBIA C.; DARVEAU R.P. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. **Cell Host Microbe** 10:302–306. doi:10.1016/j.chom.2011.09.008, 2011.

DALTIN, D. Introdução e primeiros conceitos. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. São Paulo: **Blucher**, Cap. 1, p. 1-44, 2011.

DAS, A., PAUL, T., HALDER, S. K., MAITY, C., MOHAPATRA, P. K. D., PATI, B. R., & MONDAL, K. C. Study on regulation of growth and biosynthesis of cellulolytic enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* ABK9. **Polish Journal of Microbiology**, 62(1), 31-43. (2013a).

DAS, I., S. ROY, S. CHANDNI, L. KARTHIK, G. KUMAR, K.V.B. RAO, Biosurfactant from marine actinobacteria and its application in cosmetic formulation of toothpaste, **Der Pharmacia Lettre**, 5 , 1-6. (2013b)

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R.; **J. Appl. Microbiol.**, 104, 1675. 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid producing yeast *Candida bombicola*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 720-728. 2011.

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

DINGUESLESKI, A.H.; THOMAS, G.V.; MELLO, A.M.D.; MELLO, F.A.S. Associação de agentes fitoterápicos em dentifrícios. **Revista Gestão e Saúde**, v. 13, p. 11-16, 2015.

DOMINATO, A.A.G. **Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*: caracterização química e atividade anticoagulante.** 122f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, São José do Rio Preto. 2017.

DOSHI, B.; SILLANPÄÄ, M.; KALLIOLA, S. A review of bio-based materials for oil spill treatment. **Water research**, v. 135, p. 262-277, 2018.

DUSANE D.H.; NANCHARAI AH Y.V.; ZINJARDE S.S.; VENUGOPALAN V.P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. **Colloids Surf Biointerfaces** 81:242–248, 2010.

DUSANE, D.H., DAM, S., NANCHARAI AH, Y.V. et al. Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. **Aquat. Biosyst.** 8, 17 (2012). <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-17>

ELSHIKH, M. MARCHANT, R. BANAT, I.M. Biosurfactants: Promising bioactive molecules for oral-related health applications. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 363, Issue 18, September 2016, fnw213, <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw213>. Access published September 11, 2016.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia, 2ª ed. **EDUCS**: Caxias do Sul, 2010

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

FALSETTA, M. L.; KLEIN, M. I.; COLONNE, P. M.; SCOTT-ANNE, K.; GREGOIRE, S.; PAI, C. H.; GONZALEZ-BEGNE, M.; WATSON, G.; KRYSAN, D. J.; BOWEN, W. H.; KOO, H. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infect Immun.** Vol 82 number 5/ may 2014.

FARIAS, J. M.; STAMFORD; T. C. M.; RESENDE, A. H. M.; AGUIAR, J. S., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SARUBBO, L. A. Mouthwash containing a biosurfactant and chitosan: An eco-sustainable option for the control of cariogenic microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules** 129 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.090> .2019b.

FARIAS, J.M. **Formulação de produtos de higiene oral à base de biossurfactante e quitosana fúngica.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 141p. 2019a.

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

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cárie dentária - a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos, 352p. 2005.

FELIPE, L. O; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Quím. nova esc.** – São Paulo-SP, BR. Vol. 39, Nº 3, p. 228-236, agosto. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>, 2017.

FERNANDES, M. R. V.; COSTA E SILVA, T.A.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; HEINRICH, T.A.; ALENCAR, S. M.; LIMA, M.A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science** v.45, 2009.

FLÖTRA L, GJERMO P, RÖLLA G, WAERHAUG J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **Scand J Dent Res.**79(2):119-25.1971

FREITAS, F.; ALVES V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 549-556, 2009.

GALVÃO, R. M. S. **Variabilidade Genética, Detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil., 1998.

GAUTAM G.; MISHRA V.; VERMA P.; PANDEY A.K.; NEGI S. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 06, 2014. doi: 10.4172/2155-9821.1000177. 2014.

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

GERARD J, LLOYD R, BARSBY T et al. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. **J Nat Prod**; 60: 223–9. 1997.

GILMAR, J. C. A. Manual of Soil Fungi, 2^a ed. Iowa: U.S.A., 432 p. 1959.

GIRARDOT, M.; & IMBERT, C. Natural Sources as Innovative Solutions Against Fungal Biofilms. Adv Exp Med Biol - Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health. Springer **International Publishing Switzerland**, 2016.

GOMAA, E. Z. Atividade antimicrobiana de um biosurfactante produzido por uma cepa de *Bacillus licheniformis* M104 crescida em Soro. **Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia International Journal**. ISSN 1516-8913. Vol.56, n.2: pp. 259-268, março-abril, 2013.

GOMES-FIGUEIREDO, J. Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp. / **Published**, 2006.

GRANGEMARD I.; WALLACH J.; MAGET-DANA R. et al. Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. **Appl Biochem Biotechnol** 2001; 90: 199–210. 2001.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane - Créole, Palikur, Wayãpi, I'Orstom*: Paris, 1987.

GROSS, H.; LOPER, J. E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. **Nat. Prod. Rep.** 2009; 26, 1408-46.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; & RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. paracaseiA20. **Letters in Applied Microbiology**, 50(4), 419–424. doi:10.1111/j.1472-765x.2010.02818.x. 2010.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. Da. Glossário Ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia. 2ed. **Ed. Universidade/UFRGS**, Porto Alegre, 117 p. 2003.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **J Nat Prod**, v.69, n.3, p.509-26, 2006.

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

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

HAUSMANN, R.; SYDALTK, C. Types and Classification of Microbial Surfactants. Cap 1. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F.V. Biosurfactants: Production and utilization – process, technologies, and economics. **CRC Press**: Boca Raton. 389p., 2015.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and white manifestations in the oral cavity. **Head Neck Pathol.** 13, 25–32, 2019.

HEWALD, S., JOSEPHS, K., & BOLKER, M. (2005). Genetic Analysis of Biosurfactant Production in *Ustilago maydis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 71(6), 3033–3040. doi:10.1128/aem.71.6.3033-3040.2005.

HÖFLING, J. F.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; MOREIRA, D. Association between *Streptococcus mutans*/*Streptococcus sobrinus* in students of different social levels and their relationship with the cariogenic activity in these populations. **Rev Odontol Univ São Paulo** vol.13 n.2 São Paulo Apr./June 1999.

HORMAZABAL, E., & PIONTELLI, E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. **World**

Journal of Microbiology and Biotechnology, 25(5), 813–819. doi:10.1007/s11274-008-9953-6. , 2009.

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

ISODA, H.; KITAMOTO, D.; SHINMOTO, H. et al. Microbial extracelular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukaemia cell line HL60. **Biosci Biotechnol Biochem**; 61: 609–14. 1997.

ISODA, H.; SHINMOTO, H.; MATSUMURA, M. et al. The neurite-initiating effect of microbial extracellular glycolipids in PC12 cells. **Cytotechnology**; 31: 163–70. 1999.

ITOKAWA, H.; MIYASHITA, T.; MORITA, H. et al. Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis*. **Chem Pharmacol Bull** (Tokyo) 1994; 42: 604–7.

JACKISCH-MATSUURA, A. B.; SANTOS, L. S.; EBERLIN, M. N.; FARIA, A. F.; GROSSMAN, M. J.; DURRANT, L. R. Production and characterization of surface-active compounds from *Gordonia amicalis*. **Brazilian Archive Biology Technology**, 57, 138-144, 2014.

JACOBUCCI, D. F. C. **Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

JAIN, I.; JAIN, P.; BISHT, D.; SHARMA, A.; SRIVASTAVA, B.; & GUPTA, N. Use of Traditional Indian Plants in the Inhibition of Caries-Causing Bacteria - *Streptococcus mutans*. **Braz. Dent. J.** vol.26 no.2 Ribeirão Preto Mar./Apr. 2015.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B.V.; MAHAJAN, R.T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

JENNY, K.; KAPPELI, O.; and FIETCHER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: Structural analysis and characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36, 5-13, 1991.

JEON J. G.; ROSALEN, P. L.; FALSETTA, M. L.; and KOOC, H. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. **Caries Res.** 2011 Jul; **45(3)**: 243–263. doi: 10.1159/000327250 . Published online, 2011.

JL, H.F.; LI, X.J.; ZHANG, H.Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Rep**, v. 10, n.3, p.194–200, 2009.

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

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

KAPADIA SANKET, G.; YAGNIK, B. N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian J Exp Biol Sci** 4(1):1–8, 2013.

KARPINSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A.K. Microbiology of dental caries. **J Biol Earth Sci**. 3:M21–4, 2013.

KATEMAI, W.; MANEERAT, S.; KAWAI, F.; KANZAKI, H.; NITODA, T.; H-KITTIKUN, A. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.54, n.1, p.79-82, 2008.

KHAN, S.T., KHAN, M., AHMAD, J. et al. Thymol and carvacrol induce autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by *Streptococcus mutans* . **AMB Expr** 7, 49 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0344-y>. 2017.

KIFFER, E; MORELET, M. The Deuteromycetes – Mitosporic fungi – Classification and Generic Keys, **Science Publishers, USA**, 1999, 273 p.

KIM, J. S.; PARK, N. H.; KIM, C. G. Biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans*. Korea, February, 4, 2014.

KIM, K.; JUNG, S.Y.; LEE, D.K.; JUNG, J.K.; PARK, J.K.; KIM, D.K. and LEE, C.H. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. **Biochem. Pharmacol.** 55, 975-85. 1998.

KIRAN, G. S.; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R.; JOSEPH SELVIN; ANTO THOMAS, T.; RAJEETHA RAVJI, T.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the spongeassociated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250–6, 15 out. 2009.

KIRAN, G.S.; SABARATHNAM, B.; SELVIN, J. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*, **FEMS Immunol, Med. Microbiol.** 59 (2010) 432–438.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; SHINBO, T.; NAKANE, T.; KAMISAWA, C. and NAKAHARA, T . Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Appl. Microbiol. Biot.** 29, 91-6. 1993.

KLUK, E.; REINHOLD, F.C.B.C.; PEREIRA, N.; MELLO, A. M. D. de; SFIER MELLO F. A. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. **Revista Gestão & Saúde**, v. 14, n. 1, p. 07 – 13, 2016.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Curr Opin Plant Biol**, v. 9, n.4, p. 358-63, 2006.

KOOLEN, H. H. F. **Metabolismo secundário de fungos Endofíticos associados às plantas *strychnos cf. toxifera* (loganiaceae) e *mauritia flexuosa* (arecaceae)**. 2011. 246 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.

KUMAR, A., PATIL, D., RAJAMOCHANAN, P. R., & AHMAD, A. (2013). Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. **PLoS ONE**, 8(9), e71805, 2013.

KUMAR, A.; SAINI, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; PRAKASH, A. and JOHRI, B.N. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A(5) F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. **J. Basic. Microbiol.** 52, 670-8, 2012.

KUSARI, S.; JÁN, K.; ČELLÁROVÁ E.; SPITELLER M. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. **Fungal Ecol**, v. 4, p.219–23, 2011.

KUSARI, S., M. LAMSHÖFT, S. ZÜHLKE & M. SPITELLER. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products** 71(2): 159-162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/np070669k>, 2008.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol**; 51: 22–32, 1999.

ŁAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2013, 97, 2327–2339.

LAWRENCE, J.R.; ZHU B.; SWERHONE, G. D. W.; TOPP, E.; ROY J.; WASSENAAR, L. I.; REMA, T.; KORBER, D. R. Community-Level Assessment of the Effects of the Broad-Spectrum Antimicrobial Chlorhexidine on the Outcome of River Microbial Biofilm Development. **Applied and Environmental Microbiology**, May 2008, 74(11): 3541–3550, 2008.

Lecythidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23441>. Acesso em: 16 jan. 2020.

LIMA, B. M. **Produção de biosurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais**

como substrato, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 75 f, 2012.

LIMA, J. M. S. **Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do Rio Negro contaminados por petróleo.** 2016. 119 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

LIMA, J. M. S.; PEREIRA, J. O.; BATISTA, I. H.; JUNIOR, R. C. P.; BARROSO, H. S.; COSTA NETO, P. Q.; JACKISCH MATSUURA, A. B.; FRANÇA, S. C.; AZEVEDO, J. L. Biosurfactants produced by *Microbacterium* sp., isolated from aquatic macrophytes in hydrocarbon-contaminated area in the Rio Negro, Manaus, Amazonas. **ACTA SCIENTIARUM. BIOLOGICAL SCIENCES (ONLINE)**, v. 39, p. 13-20, 2017.

LIMA, J.M.S.; PEREIRA, J. O.; BATISTA, I. H.; COSTA NETO, P. Q.; SANTOS, J. C.; ARAUJO, S. P.; PANTOJA, M. C.; MOTA, A.J.; AZEVEDO, J. L. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes on the Negro river in Manaus, Amazonas.. **African Journal of Biotechnology**, v. 15(24), p. 1217-1223, 2016.

LIN, S.; CARSWELL, K.; SHARMA M. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl Microbiol Biotechnol**, 41: 281–5. 1994;

LOESCHE W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev.** 1986; 50:353–80

LOU, D.; XING, J.; DENG, H. Two new compounds from na endophytic fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. **J Asian Nat Prod Res**, v.13, n.12, p.1069-73, 2011.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALBUQUERQUE, C. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS_TAKAKI, G. M. Economic optimized medium for tensio- active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **Int J of MolSci** 12: 2463- 2476, 2011.

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

MAASS, D.; MOYA RAMÍREZ, I.; GARCÍA ROMÁN, M.; JURADO ALAMEDA, E.; ULSON DE SOUZA, A. A.; BORGES VALLE, J. A.; ALTMAJER VAZ, D. Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 7, p. 1990-1997, 2015.

MAGALHÃES, A.C.; MORON, B.M.; COMAR, L.P. et al. Uso racional dos dentifrícios. RGO: **Revista Gaúcha de Odontologia**: 2011; 59(4).

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

MARCHANT, R.; BANAT I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnol Lett** 34:1597–1605.DOI 10.1007/s10529-012-0956-x, 2012.

MARCON, E.L. **Fungos endofíticos de *Pothomorphe peltata* e *Peperomia pellucida*: caracterização, metabólitos secundários e atividades biológicas**. 2013. 96f. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MARSH, P. D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **Journal of Dental Research**, v.71, p.1431-1438, 1992.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**, Quarta Edição, Livraria e Editora Santos, 192 p, 2005.

MARSH, P.D. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. **J. Dent.**, v.38, n.1, p.11-15, doi: 10.1016/S0300- 5712(10)70005-1, 2010.

MARTINHO, V.; DOS SANTOS LIMA, L.M.; BARROS, C.A. et al. Enzymatic potential and biosurfactant production by endophytic fungi from mangrove forest in Southeastern Brazil. **AMB Expr** 9, 130.. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0850-1>. 2019,

MARTINS, R.S.; MACÊDO, J.B.; MUSTAFA, W.F. et al. Composição, princípios ativos e indicações clínicas dos dentifícios: uma revisão da literatura entre 1989 e **J Health Sci Inst**. Fortaleza, 2012; 30(3).

MATHUR, C.; PRAKASH, R.; ALI, A.; KAUR, J.; CAMEOTRA, S. S; and PRAKASH N. T. Emulsification and hydrolysis of oil by *Syncephalastrum racemosum*. **Defence Science Journal**, v. 60, n. 3, p. 251–254, 2010.

MEYER A.C.A.; TERA, T.M.; ITO C.Y.K.; KERBAUY W.D.; JARDINI, M.A.N. Clinical and microbiological evaluation of the use of a toothpaste containing chlorhexidine 1%. **Rev Odontol UNESP**. 36(3)255-260. 2007.

MILÉRIO, Patricia Sâmea Lêdo Lima. **Emulsão de *Copaifera Multijuga* Hayne para limpeza de preparo Cavitário: controle de qualidade físico-químico e avaliação da atividade antibacteriana**. 2015. 94 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia)- Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

MITTENBUHLER, K.; LOLEIT, M.; BAIER, W. et al. Drug specific antibodies: T-cell epitope-lipo peptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. **Int J Immunopharmacol**; 19: 277–87. 1997.

MNIF, I., & GHRIBI, D. Glycolipid biosurfactants: Main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(2). 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7759>, 2016.

MNIF, I., & GHRIBI, D. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides** 71 (2015) 100–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides>. 2015.07.006 0196-9781/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved, 2015.

MONTEIRO, A. S.; DOMINGUES, V. S.; SOUZA, M. V. D.; LULA, I.; GONÇALVES, D. B.; SIQUEIRA, E. P.; SANTOS, V. L. Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 29-41, 2012.

MONTEIRO, A.S.; MIRANDA, T.T.; LULA, I.; DENADAIC, A.M.L.; SINISTERRA, R.D.; SANTOR, M.M.; SANTOS, V.L. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfacesv by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 84:467– 476, 2011.

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

MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J. A.; ARAUJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13. 2007.

MORI, S. A. A família da castanha-do-Pará: símbolo do Rio Negro. in A. A. de Oliveira & D. Daly (eds), **Florestas do Rio Negro**. Companhia das Letras, Universidade Paulista and The New York Botanical Garden, São Paulo and New York, 2001.

MORI, S. A., BECKER., P. & KINCAID, D. Lecythidaceae of a central Amazonian lowland forest. Implications for conservation. Pages 54-67. In: R. O. Bierregaard, Jr., C. Gascon, T. E. Lovejoy & R. C. G. Mesquita, editors. *Lessons from Amazonia. The ecology and conservation of a fragmented forest*. **Yale University Press**. New Haven & London. 2001.

MORI, S.A.; TSOU, C.C.; WU, C.C.; CRONHOLM, B. & ANDERBERG, A. Evolution of Lecythidaceae with an emphasis on the circumscription of neotropical genera: information from combined ndhF and trnL-F sequence data. **American Journal of Botany** 94: 289–301. 2007

MORTON, C. M., MORI, S. A., PRANCE G. T. & CHASE M. W.. Phylogenetic relationships of Lecythidaceae: a cladistic analysis using rbcL sequence and morphological data. **American Journal of Botany** 84: 530–540. 1997.

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

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. (Eds). **Biosurfactants: research trends and applications**. Florida: CRC Press, 2014.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A.; MAKHIJANI, K. Green chemistry and biosurfactant research. In: MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. (ed.). **Taylor & Francis Group. Biosurfactants: Research Trends and Applications**. Ch. 1, p. 1-30, 2014.

MURIEL, J. M. et al. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 235–240, 1996.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Curr. Sci. India.**; 94, 736-74. 2008.

MYERS, D. Surfactant Science and Technology. 3^o ed. New Jersey: **Wiley-Interscience**. 2006.

NARUSE, N.; TENMYO, O.; KOBARU, S.; KAMEI, H.; MIYAKI, T.; KONISHI M.; OKI, T. *Pumilacidin*, a complex of new antiviral antibiotics: Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. **J. Antibiot.**; 43, 267-80. 1990.

NERURKAR, A. S. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity. **Adv. Exp. Med. Biol.**; 672, 304-15. 2010.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; CHI, A. C. Patologia oral e maxilofacial. 4. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 912 p., 2016.

NITSCHKE, M., & COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, 18(5), 252---259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>, 2007.

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

O'BRIEN J, WILSON I, ORTON T, POGNAN F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem** 267:5421–5426, 2000.

ODDS, F.C. **Candida and candidosis**. 2nd ed. Philadelphia: **Baillière Tindall**; 1988

OKANO, M.; NOMURA, M.; HATA, S.; OKADA, N.; SATO, K.; KITANO, Y. et al. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. **Arch Dermatol.**;125(1):50-2.1989

OLIVEIRA, T. F., J. S. FERREIRA, P. M. F. BOA SORTE, V. M. REIS, J. I. BALDANI & S. SCHWAB. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. **Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento** 49: 1-16., 2009.

OLIVEIRA, R. L. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Piper hispidum***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2010.

ONDEYKA, J. G. et al. Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, n. 38, p. 8809- 8816, 1997.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PLAZA, G.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-54, 2011.

PADILHA, C. M. L.; PICCIANI, B. L. S.; SANTOS, B. M. D.; SILVA JÚNIOR, A.; DIAS, E. P. Comparative analysis of Gram's method and PAS for the identification of *Candida* spp. samples from the oral mucosa. **J Bras Patol Med Lab**, vol. 0, n.5, p. 352-358. ISSN 1676-2444. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20140039>, 2014.

PAES LEME, A. F. KOO, H.; BELLATO, M.C.; BEDI, G.; CURY, J.A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. **J. Dent. Res.**, Whashington, v. 85, no. 10, p. 878-887, Oct. 2006.

PALOMINO, J.COS; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Copyright © 2002 **American Society for Microbiology. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aug. 2002, p. 2720–2722 Vol. 46, No. 80066-4804/02/\$04.00. 2002.

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

PEGORARO, J.; SILVESTRI, L.; CARA, G.; STEFENON, L.; MOZZINI C. B. Efeitos adversos do Gluconato de Clorexidina à 0,12%. **J. Oral Invest**, 3(1): 33-37, 2014. ISSN 2238-510X. DOI: 10.18256/2238-510X/j.oralinvestigations.v3n1p33-37. 2014.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciênc Desenv**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PELCZAR, M. J. JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*, vol. 2, 2 edição, São Paulo, **MAKRON Books**, p. 517, 1997.

PELE, M.A.; MONTERO-RODRIGUEZ, D.; RIBEAUX, D.R.; SOUZA, A.F.; LUNA, M.A.C.; SANTIAGO, M.F.; ANDRADE, R.F.S.; SILVA, T.A.L.; SANTIAGO, A.L.C.M.A.; CAMPOS-TAKAK, G.M. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. **African Journal of Biotechnology**, v.17, n.6, p.150-157, 2018. DOI: 10.5897/AJB2017.16230, 2018.

PEREIRA J.O., de SOUZA A.Q.L., de SOUZA A.D.L., de CASTRO FRANÇA S., de OLIVEIRA L.A. (2017) Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_5, 2017.

PEREIRA, D. D. F.; DUVOISIN JR, S.; ALBUQUERQUE, P. M. O estudo da produção de biossurfactantes por Fungos amazônicos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences - JCEC**, Vol. 03 N. 04 0688-0695. ISSN: 2446-9416., 2017.

PEREIRA, J. O. ; SOUZA, A. Q. L. ; HANADA, R. E. . Diversidade de Microrganismos Endofíticos de Plantas da Amazônia Brasileira. In: In: CoataMaia, L; Malosso, E.; Yano-melo, A . M.. (Org.), ed. Recife. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. 01 ed. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia,v. 01, p. 141-148, 2007.

PEREIRA, J.O. **Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais**. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p., 1993.

PERFUMO, A.; SMYTH, T.J.P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, p. 1501-1512, 2009.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: **Spring Verlag**. p. 179-197.1991

PHONGPAICHIT, S.; NIKOM, J.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROJ, J.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; RUKACHAISIRIKUL, V. KIRTIKARA, K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants . **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 517-525, 2007.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Curitiba, Paraná, 2006. 141f. Tese de Doutorado– Universidade Federal do Paraná, 2006.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1 % dirhamnolipid ointment. **J Cutan Med Surg** 12:142–146. 2008.

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

PRADO, Fabiano Brito; ROCHA, Waldireny Caldas; MARTIM, Salomão Rocha; ALECRIM, Mircella Marialva; SILVA, Larissa de Paiva; SILVA, Larissa Svetlana Cavalcante; SILVA, Taciana de Amorim e TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Produção de compostos bioativos por *Aspergillus* mantidos sob duas condições de preservação. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 12, n. 1, p. 37-47, jan.-abr. 2017

PRANCE, G. T. & S. A. MORI. Lecythidaceae - Part I. The actinomorphic-flowered New World *Lecythidaceae* (*Asteranthos*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* and *Cariniana*). **Flora Neotropica Monographs** 21: 1-270. 1979

PRANCE, G. T.; MORI, S. A.; *Lecythidaceae*- Parte I: The actinomorphic-flowered New World *Lecythidaceae* (*Asteranthos*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* & *Cariniana*). *Flora Neotropica Monograph* 21, **New York Bot. Gard**: New York, 1979, p. 270.

PRATT-TERPSTRA IH, WEERKAMP AH, BUSSCHER HJ. Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. **J Colloid Interface Sci**, 129: 568–74. 1989;

QAZI, M. A. et al. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. In: DOMACH, M. M. (Ed.). **Biotechnology Progress**. p. 1065–1075. 2014.

QAZI, M.A.; SUBHAN, M.; FATIMA, N.; ALI, M.I.; AHMED, S. Role of biosurfactant produced by *Fusarium* sp. BS-8 in enhanced oil recovery (EOR) through sand pack column. **Int J Biosci Biochem Bioinform** 3:598–604. 2013.

RAJESH, M.; SAMUNDEESWARI, M.; ARCHANA, B. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Garbage Soil. **Journal Applied & Environmental Microbiology**, v.5, n.2, p. 74-78, 2017. DOI: 10.12691/jaem-5-2-3. 2017.

REDER-CHRIST, K.; SCHMIDT, Y.; DORR, M.; SAHL, H.G.; JOSTEN, M.; RAAIJMAKERS, J.M.; GROSS, H.; BENDAS, G. Model membrane studies for characterization of different antibiotic activities of lipopeptides from. **Biochim. Biophys. Acta**; 1818, 566-73. 2012.

REID, G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. **Int Dairy J**, 10: 415–9. 2000.

REID, G.; ZALAI, C.; GARDINER, G. Urogenital *Lactobacilli* probiotics, reliability, and regulatory issues. **J Dairy Sci**, 84: 164–9. 1984.

REIS, C. B. L.; MORANDINI, L. M. B.; BEVILACQUA, C. B.; BUBLITZ, F.; UGALDE, G.; MAZUTTI, M. A.; JACQUES, R. J. S. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, supl.1, p. 185-192, 2018.

REIS, C.B.L. **Produção de quitinases e biossurfactantes fúngicos por processos fermentativos**. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. Santa Maria, 2017.

REIS, R.S.; PACHECO, G.J., PEREIRA, A.G. e FREIRE, D.M.G. (JUNE 14TH). Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation, Rolando Chamy and Francisca Rosenkranz, **Intech Open**, DOI: 10.5772/56144. Available from: <https://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biosurfactants-production-and-applications>, 2013.

REPORTS AND DATA. Anionic Surfactants Market is expected to grow USD 23.71 Billion by 2026 Reports And Data Anionic Surfactants Market Size – USD 16.82 billion in 2018, Market Growth - CAGR of 4.3%, Anionic Surfactants Industry Trends – extensive research and constant innovation are some of the factors driving the anionic surfactants market. <https://www.globenewswire.com/news-release/2019/10/28/1936517/0/en/Anionic-Surfactants-Market-is-expected-to-grow-USD-23-71-Billion-by-2026-Reports-And-Data.html>

REVILLA, J. Plantas da Bacia Amazônica. Manaus: **INPA**,v.1, 2002.

RIBEIRO, S. F. L. **BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt**. Dissertação -Programa de Pós- Graduação em Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos. Universidade Federal do Amazonas. 2015.

RODRIGUES L.; BANAT I.M.; TEIXEIRA J.; OLIVEIRA R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 57, 609–618 doi:10.1093/jac/dkl024. Advance Access publication 9 February, 2006.

RODRIGUES, E. F.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Produção de Compostos com Propriedades Emulsificantes por *Aspergillus flavus* Utilizando Resíduos Agroindustriais. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.16, nº1, Jan/Jun, p.75-93, 2014.

RODRIGUES, I. S. C. **Análise de diversidade bacteriana associada ao biofilme dentário por polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Campinas, 2011.

RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesq. Agropec. Bras**, 31(12): 905-909, 1996.

RODRIGUES, L. BANAT I.M.; TEIXEIRA J, OLIVEIRA R Strategies for the prevention of microbial biofilm formation on silicone rubber voice prostheses. **J Biomed Mater Res** 81B(2): 358–370, 2007.

RODRIGUES, L.R.; VAN DER MEI, H.C.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. FEMS. **Immunol. Med. Microbiol.**; 46, 107-12. 2006

RODRIGUES, L.R.; VAN DER MEI, H.C.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. **Appl. Environ. Microbiol.**; 70, 4408-10. 2004.

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

RON, E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>, 2001.

ROSA, C.F.C.; FREIRE, D.M.G.; and FERRAZ, H.C. Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil. **J. Environm. Chem. Eng.**, 3:89–94. 2015 doi: 10.1016/j.jece.2014.12.008., 2015.

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

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; MARINHO, P.H.C.; FARIAS, C. B. B.; FERREIRA, S. R. M. ; SARUBBO, L. A. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **J. of Petr. Sci. & Engin.** v. 109, p. 117-122, 2013.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5. 2011.

SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K e SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**. 2011. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.259&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 25 Mar. 2018., 2011.

SAIMMAI, A.; RIANSA-NGAWONG, W.; MANEERAT, S. and DIKIT, P. Application of Biosurfactants in the Medical Field. **Walailak J Sci & Tech.**, 17(2): 154-166. 2020.

SAKAUE, Y., TAKENAKA, S., OHSUMI, T. et al. The effect of chlorhexidine on dental calculus formation: an in vitro study. **BMC Oral Health** 18, 52 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0517-3>

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia férrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.289-294, 2009.

SANCHES, M. A. **Utilização de resíduos vegetais para a produção de biossurfactantes por fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, 2016.

SANCHES, M.A., SANTOS, R.A., CORTEZ, A.C. A., MARINER, R., & SOUZA, J.V.B. (2018). Produção de Biossurfactante por *Fusarium oxysporum* LM 5634 Utilizando Cascas de Frutos de *Bactris gasipaes* (Kunth) como Substrato. **Biotechnology Journal International** , 21 (1), 1-9. <https://doi.org/10.9734/BJI/2018/39405>, 2018.

SANO, H.; SHIBASAKI, K.; MATSUKUBO, T.; TAKAESU, Y. Effect of chitosan rinsing on reduction of dental plaque formation. **The Bulletin of Tokyo Dental College**, v. 44, p. 9-16, 2003.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO L. A.. **Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century**. **Int. J. Mol. Sci.** 2016, 17, 401; doi:10.3390/ijms17030401, 2016.

SANTOS, D. K. **Utilização de gordura animal e resíduo agroindustrial como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactante com potencial de aplicação na área ambiental**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais), Universidade Católica de Pernambuco, Recife. 2013.

SANTOS, DKF; RUFINO, RD; LUNA, JM; SANTOS, VA; SALGUEIRO, AA; SARUBBO, LA Síntese e avaliação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* usando gordura animal e licor de maceração de milho. **J. Pet. Sci. Eng.**, 105 , 43–50. 2013.

SARUBBO, L.A., ROCHA JR., R.B., LUNA, J.M., RUFINO, R.D., SANTOS, V. A. AND BANAT, I.M. (2015) Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chem. Ecol.**, 31:707–723. doi: 10.1080/02757540.2015.1095293, 2015.

SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.4, p.400-406, 2006. DOI: 10.4067/S0717-34582006000400.

SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon

source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.95, n.1, p.59-67, 2001. DOI: 10.1385/ABAB:95:1:59

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G.; CHOPADE, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms **Biotechnology Advances**. Volume 28, Issue 4, July–August 2010, Pages 436-45 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.006>, 2010.

SCHNEIDER, T.; GRIES, K.; JOSTEN, M.; WIEDEMANN, I.; PELZER, S.; LABISCHINSKI, H.; and SAHL, H.G. The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53, 1610-8. 2009.

SEKHON-RANDHAWA, K. K. “Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: challenges and opportunities,” in **Biosurfactants**, eds N. Kosaric and F. V. Sukan (Boca Raton, FL: CRC Press), 49–67. 2014.

SEN, S.; BORAH, S. N.; BORA, A.; & DEKA, S. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. **Microb Cell Fact** 16, 95 <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0711-z>, 2017.

SENA, H. H. **Produção de biossurfactantes por fungos isolados do solo amazônico**. Dissertação de Mestrado. 67 f.: il.; 30 cm. Universidade Federal do Amazonas. 2014.

SENA, H. H., SANCHES, M. A., ROCHA, D. F. S., SEGUNDO, W. O. P. F., DE SOUZA, É. S., & DE SOUZA, J. V. B. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. **International Journal of Microbiology**, 1–8. doi:10.1155/2018/5684261, 2018.

SHANI S., FRIEDMAN M., STEIBERG, D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. **Caries Res**, n.34, v. 3, p.260-267, 2000.

SHARMA, D., SAHARAN, B. S., and KAPIL, S. (eds.). “Biosurfactants of lactic acid bacteria,” in **Springer Briefs in Microbiology** (New York, NY: Springer), 87, 2016.

SHEN, S.; SAMARANAYAKE, L. P.; YIP, H. K. In vitro growth, acidogenicity and cariogenicity of predominant human root caries flora. **J Dent**, v. 32, n. 8, p. 667-78, Nov 2004.

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

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; MOHANA, K. P.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaeae) produce camptothecin, 10-

hydroxycamtothecin and 9-methoxycamtothecin. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 117-122, 2010.

SILVA, A. C. S.; SANTOS, P. N.; LIMA E SILVA, T. A.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-12, 2018.

SILVA, E. J.; SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SILVA, R. O.; SARUBBO, L. A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloid Surface B: Biointerfaces**, v. 117, p. 6-41. 2014.

SILVA, G.K.B.; NEGREIROS, J.M.; SILVA, N.R.A.; SILVA, T.A.L.E.; BARBOSA, R.N.; OLIVEIRA, N.T.; OKADA, K.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Characterization of *Aspergillus niger* isolated from Caatinga soil with potential of biosurfactant production. In: MÉNDEZ VILAS, A. (Org.). **Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms Current Status and Trends**. Madrid: eBookstore, 2015. p.65-69. DOI: 10.3390/ijms150915377

SILVA, J. D. F.; SILVA, Y. P.; PIATNICKI, C. M. S.; BÖCKEL, W. j.; MEDONÇA, C. R. B. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SILVA, M. E. T. **Bioprospeção de moléculas tensoativas em fungos endofíticos de *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*** (Dissertação) em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2015.

SILVA, M.E.T. **Estudo da produção de biossurfactantes por fungos endofíticos utilizando resíduos como substrato. Tese de Doutorado, 114 f.** Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte – UEA. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2019.

SILVA, M.E.T.; DUVOISIN JR.; S. R.L. OLIVEIRA.; BANHOS, E.F.; SOUZA, A.Q.L. And ALBUQUERQUE, P.M. Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. **Journal of Applied Microbiology** ISSN 13645072. SPECIAL ISSUE ARTICLE. 2019. doi:10.1111/jam.14398. Acesso. 20.11. 2019.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects. Biotechnol. Adv.**, v.25, p. 99-121, 2007.

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

SMYTH, T. J. P., PERFUMO, A., MARCHANT, R., AND BANAT, I. M. "Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids," in Handbook of Hydrocarbon and

Lipid Microbiology, ed K. N. Timmis (Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag), 3706–3723. doi: 10.1007/978-3-540-77587-4_291, 2010.

SOARES, D. A.; ROSA, L. H.; SILVA, J. F. M. DA.; PIMENTA, R. S. A review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 12, n. 3, p. 331-352, 2017.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a general overview. In: Soberón-Chávez G (ed) **Biosurfactants: from genes to applications**. Springer, Berlin, pp 1–11, 2011.

SOURAV DE, SUSANTA MALIK, ANIRUDDHA GHOSH, RUMPA SAHAB AND BIDYUT SAHA. A Review on natural surfactants. **This journal is © The Royal Society of Chemistry**. RSC Adv., 2015, 5, 65757–65767 | 65767, 2015.

SOUZA A. D. L. de; **Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros Eutypa, Trichoderma e Pestalotiopsis isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Strychnos cogens*, *Pinus taeda* e *Gustavia cf. elliptica***; Tese (Doutorado); São Carlos – UFSCar; 302 p., 2005.

SOUZA A. Q. L. de; **Fungos Endofíticos de Plantas Tóxicas da Amazônia, *Palicourea Longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham**; (Dissertação de Mestrado); UFSCar – SP; 102p. 2001;

SOUZA, A. Q. L. DE. **Potencial Genético e Químico dos endofíticos de *Murraya paniculata* L (Jack)**. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológica, Universidade Federal de São Carlos. 2006.

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

SOUZA, A.F.; RODRIGUEZ, D.M.; RIBEAUX, D.R.; LUNA, M.A.; LIMA E SILVA, T.; ANDRADE, R.F.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International Journal of Molecular Science**, v.17, n.10, p.1608-1626, 2016.

SOUZA, K. S. T.; GUDIÑA E.; RODRIGUES, L.; SCHWAN, R. F.; DIAS D. R.; TEIXEIRA, J. A. Avaliação da produção de biossurfactantes por espécies de leveduras. I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental (CBMAAA). **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v.8. 2016. Número especial (ISSN2178-436).

SOUZA, P.M.; SILVA, T.A.L.; FREITAS-SILVA, M.C.; ANDRADE, R.F.S.; LIMA, M.A.B.; SILVA, P.H.; FONSECA, T.C.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Factorial Design based Medium Optimization for the Improved Production of Biosurfactant by *Mucor polymorphosphorus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied**, v.5, n.11, p.898-905, 2016. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.511.103

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica - Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345- 351, 2014.

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

STANBURY, P.; WHITAKER, A.; HALL, S. Copyright. In: **Principles of Fermentation Technology**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2017.

STEPHENSON, S. L. The kingdom fungi. Portland Oregon USA: **Timber Press**, 2010.

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

STROBEL, G.; DAISY B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Prod**, v.67, p.257-68, 2004.

STRUZYCKA, I. The oral microbiome in dental caries. **Polish Journal of Microbiology** Vol. 63, No 2, , 127–135. 2014.

TANAKA Y, TAKASHI T, KAZUHIK UET al. Method of producing iturin A and antifungal agent for profound mycosis. **Biotechnol Adv**; 15: 234–5. 1997.

TAO, D. et al. In vitro and clinical evaluation of optical tooth whitening toothpastes. **Journal of dentistry**, v. 67, p. S25-S28, 2017.

TAZDAÏT, D.; SALAH, R.; GRIB, H.; ABDI, N.; & MAMERI, N. Kinetic study on biodegradation of glyphosate with unacclimated activated sludge. **International Journal of Environmental Health Research**, 28(4), 448–459. 2018.

THIMON, L. PEYPOUX, F. WALLACH, J. et al. (1995) Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiol Lett** 1995; 128: 101–6. 1995.

TINANOFF, N.; REISINE, S. Update on early childhood caries since the surgeon general's report. **Acad. Pediatr**, v. 9, n. 6, p. 396 - 403, 2009.

TODA, C. **Potencial Antimicrobiano de fungos endofíticos com ação antagônica a microrganismos de interesse odontológico.** 79p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 2010.

TODA, C.; MIKI, J. M. M.; SILVA JUNIOR, H. C.; SANTOS FILHO, V. D. S.; COELHO, C. N.; SANTOS, V. D. B.; MARREIRO, R.; LIMA, L. F.; BANDEIRA, M. F. C.. Fungos Endofíticos como fonte de moléculas bioativas para uso em odontologia. In: Maria Francisca Simas Teixeira; Taciana de Amorim Silva; Rosana Antunes Palheta; Ana Lúcia Basílio Carneiro; Hérlon Mota Atayde. (Org.). **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada.** 1 ed. Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas, v. 1, p. 104-125, 2011.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A.A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Brazilian Dental Science**, v. 3, n. 2, 2000. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos, v.3, n.2, jul./dez., 2000. Disponível em <https://bds.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/87/51>, 2000.

UCHIDA, Y.; MISAVA, S.; NAKAHARA, T. et al. Factors affecting the formation of succinoyltrehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes. **Agric Biol Chem.**; 53: 765–9. 1989.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J. and TABUCHI, T . Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agric. Biol. Chem.**; 53, 757-63, 1989.

UZEDA M. Microbiologia Oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. Rio de Janeiro: ed. **MEDSI**; 2002.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J. & RAHMAN, P.K.S.M (2015) Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Front. Microbiol.**6:245. doi: 10.3389/fmicb. 00245, 2015.

VAN HOOGMOED, C.G.; VAN DER KUIJL-BOOIJ, M.; VAN DER MEI H.C. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strain. **Appl Environ Microbiol.**, 66: 659–63, 2000.

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

VECINO, X.; CRUZ, J.; M.; MOLDES, A.B. & RODRIGUES, L.R. Biosurfactants in cosmetic formulations: Trends and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, 37, 2017.

VELIOGLU, Z.; UREK, R.O. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 526–31, nov. 2015b.

VELIOGLU, Z.; UREK, R.O. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 160–166, març. 2015a.

VELRAEDS M, VAN DER MEI HC, REID G et al. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. **Appl Environ Microbiol.**, p. 1958–1963, 1996.

VELRAEDS M, VAN DER MEI HC, REID G et al. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 8: 51–61, 1996.

VELRAEDS, M.; VAN DER MEI, H.C.; REID, G. and BUSSCHER, H.J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* to solid substrata by an adsorbed biosurfactant layer from *Lactobacillus acidophilus*. **Urology.** 49, 790-4, 1997.

VIJAYAKUMAR, S. and SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Res. J. Microbiol.**, 10:181–192, 2015.

VILA, T.; SULTAN, A.S.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; JABRA-RIZK, M.A. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. **J. Fungi**, 6, 15, 2020.

VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M. and PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**; 25, 289-97, 1997b

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M. and VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.**; 63, 44-49, 1997a

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **J Endod** 38: 1376–1379. doi: 10.1016/j.joen. 2012.06.035 PMID: 22980181, 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, p. 315-322, 1990.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **J. Oral Microbiol.**, 3, 2011.

WINTERBURN, J. B.; MARTIN, P. J. Foam mitigation and exploitation in biosurfactant production. **Biotechnology Letters**, v.34, n. 2, p. 187-195, 2012.

YAKIMOV, M.; TIMMIS, K.; WRAY, V. et al. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Appl Environ Microbiol.**; 61: 1706–13, 1995.

YU, H., ZHANG, L.; LI, L. ZHENG, C. & GUO, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research** 2010. 165(6): 437-449. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.009>.

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

ZANATTA F.B., ANTONIAZZI R.P., RÖSING C.K. The effect of 0.12% chlorhexidine rinsing in previously plaque-free and plaquecovered surfaces. A randomized controlled clinical trial. **J Periodontol.** 78(11):2127-2134. 2007.

ZANATTA FB, RÖSING CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A**, 1(2):35-43, 2007.

ZARAGOZA A.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; TERUEL, J. A.; MARQUES, A.; MANRESA, A. and ORTIZ, A. Hemolytic Activity of a Bacterial Trehalose Lipid Biosurfactant Produced by *Rhodococcus* sp.: Evidence for a Colloid-Osmotic Mechanism. **Langmuir** 26, 8567-72. 2010.

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

ZHANG, B.; SALITURO, G.; SZALKOWSKI, D.; LI, Z.; ZHANG, Y. ROYO, I.; VILELLA, D.; DÍEZ, M. T.; PELAEZ, F.; RUBY, C.; KENDALL, R. L.; MAO, X.; GRIFFIN, P.; CALAYCAY, J.; ZIERATH, J. R.; HECK, J. V.; SMITH, R. G.; MOLLER, D. E. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 284, n. 5416, p. 974-977, 1999.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Report**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHANG, Y., WANG, X., LI, H., NI, C., DU, Z. ET AL. YAN, F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomed Pharmacother**, 99, 883-893, 2018.

ZHAO X, GELTINGER C, KISHIKAWA S et al. Treatment of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis. **Cytotechnology**, 33: 123-30, 2000.

ZHAO, X.; WAKAMATSU, Y.; SHIBAHARA, M. et al. Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. **Cancer Res** 1999; 59: 482-6.

APÊNDICE A

- Preparo de Soluções antissépticas, Antibióticos e Meios de Cultura.

Para os procedimentos de isolamento dos microrganismos foram previamente preparados três diferentes meios de cultura com três diferentes combinações de antibióticos e duas soluções para antissepsia do material botânico. Esse material foi utilizado nas etapas que se seguiram durante a metodologia proposta para a pesquisa.

a) Soluções antissépticas

Para o processo de antissepsia foram preparadas soluções de hipoclorito de sódio a 3% e de etanol a 70%. Foi utilizada ainda água destilada autoclavada, no preparo destes e na fase final da antissepsia (SOUZA et al., 2004).

b) Preparo de Antibióticos

Após a autoclavagem dos meios de cultura, adicionou-se três diferentes tipos de antibióticos (antibacterianos e antifúngico) antes de serem vertidos nas placas de Petri, conforme preparo descrito a seguir:

1. Solução de Itraconazol: um comprimido de 100 mg solubilizado em água estéril, para uma concentração final de 50 mg/mL⁻¹;
2. Solução de Ampicilina: uma cápsula (500 mg) solubilizada em água estéril, para uma concentração final de 50 mg/mL⁻¹;
3. Solução de Tetraciclina: uma cápsula (500 mg) solubilizada em álcool 70 % e água estéril (1:1), para uma concentração final de 50 mg/mL⁻¹.

c) Preparo dos meios de cultura

Para o preparo dos diferentes meios de cultura utilizados no isolamento dos microrganismos endofíticos, utilizou-se os reagentes e substratos descritos abaixo nas seguintes concentrações (SOUZA et al., 2004):

- 1- Meio de cultura ISP2: 4,0 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose, 10 g de amido, 10 g de extrato de malte e 1 L de água destilada;
- 2- Meio de cultura de aveia: 10 g de Aveia, 10 g de extrato de malte, 4 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose e 1 L de água destilada;
- 3- Meio de cultura Batata, Dextrose e extrato de Levedura (BDA+ L): 200 g de batata, 20 g de dextrose, 2 g de extrato de levedura, 15 g de ágar e 1 L de água destilada.

Os meios de culturas foram previamente preparados e autoclavados por 15 minutos a 120 °C. Após autoclavagem e já resfriados (45 °C) foram acrescidos aos meios o fungicida e os dois bactericidas nas combinações e concentrações propostas.

Para cada 200 mL dos meios de cultura AVEIA, ISP2 e BDA + L, adicionou-se 400 µL de cada uma das soluções combinadas dos antibióticos: 1) Tetraciclina (T) com Ampicilina (A); 2) Tetraciclina (T) com Itraconazol, obtendo-se no final seis combinações diferentes de meios de cultura. Em condições estéreis, no interior de cabine de segurança biológica (A2 da Fiterflux®), foi transferido um volume de 25 mL de cada meio de cultura para placas de Petri (90 x 15mm) descartáveis estéreis (Figura 1). Após o resfriamento e solidificação dos meios de cultura, as placas foram vedadas individualmente com filme plástico, embaladas em sacos plásticos e conservadas sob refrigeração a 4°C.

ANEXO A

- Protocolo de Extração de DNA

Protocol

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the **Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer** to a final dilution of 0.5%(v/v) *i.e.*, 500 µl per 100 ml.

¹This equates to approximately 10⁸ bacterial cells, 10⁶ yeast cells or 10⁷ mammalian cells.

²Cap tube tightly to prevent leakage.

1. Add 50 – 100 mg (wet weight) fungal or bacterial cells¹ that have been resuspended in up to 200 µl of water or isotonic buffer (e.g., PBS) or up to 200 mg of tissue to a **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 mm & 0.5 mm)**. Add 750 µl **Lysis Solution** to the tube².
2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process at maximum speed for ≥ 5 minutes.

Note: Required processing time will vary depending on the device and application and therefore should be evaluated on a case by case basis.

For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TerraLyzer™ Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Disruptor Genie™, or standard benchtop vortexes). See manufacturer's literature for operating information.

3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube in a microcentrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
4. Transfer up to 400 µl supernatant to a **Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top)** in a **Collection Tube** and centrifuge at 7,000 x g for 1 minute.

Note: Snap off the base of the Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top) prior to use.

5. Add 1,200 µl of **Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer** to the filtrate in the **Collection Tube** from Step 4.
6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a **Zymo-Spin™ IIC Column³** in a **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
7. Discard the flow through from the **Collection Tube** and repeat Step 6.
8. Add 200 µl **DNA Pre-Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IIC Column** in a new **Collection Tube** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
9. Add 500 µl **Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer** to the **Zymo-Spin™ IIC Column** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.
10. Transfer the **Zymo-Spin™ IIC Column** to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 µl (35 µl minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the column matrix. Centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments.

³The Zymo-Spin™ IIC Column has a maximum capacity of 800 µl.

ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com