



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

DIEGO LEANDRO REIS DA SILVA FERNANDES

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *CROCOMIA ACULEATA*
(MACAÚBA) JACQ. LOOD EX MART E *SACCHARUM* SPP L. (CANA DE AÇÚCAR)
PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, ANTI *TRYPANOSOMA*
CRUZI E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Vitória de Santo Antão

2016

DIEGO LEANDRO REIS DA SILVA FERNANDES

AVALIAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *CROCOMIA ACULEATA*
(MACAÚBA) JACQ. LOOD EX MART E *SACCHARUM* SPP L. (CANA DE AÇÚCAR)
PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA, ANTI *TRYPANOSOMA*
CRUZI E PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**

Orientador: Idjane Santana Oliveira
Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lígia F. dos Santos, CRB4-2005

F363a Fernandes, Diego Reis Leandro da Silva.
Avaliação biotecnológica de fungos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar para produção de enzimas, atividade antimicrobiana, citotóxica e tripanocida./ Diego Reis Leandro da Silva Fernandes. - Vitória de Santo Antão, 2016.

62 folhas; tab.

Orientadora: Idjane Santana Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2016.
Inclui referências e anexo.

1. Fungos. 2. Antibacterianos. I. Oliveira, Idjane Santana (Orientadora). II. Título.

579.5 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-074/2017

DIEGO LEANDRO REIS DA SILVA FERNANDES

**AVALIAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MACAÚBA E
CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E TRIPANOCIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**

Aprovado em: 30/03/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dra. Idjane Oliveira de Santana (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Rene Duarte Martins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico a todos que participaram dessa conquista...

AGRADECIMENTOS

À **minha família**, por todo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Idjane Oliveira de Santana**, pela oportunidade, ensinamentos, pela disponibilidade em todas as situações, por suas preciosas sugestões e

pela oportunidade, acolhimento, sábios conselhos e contribuição na realização deste estudo.

Meu muito obrigado pelo apoio na concretização deste trabalho.

Meu muito obrigado por toda dedicação. À Profa. **Vitorina Rehn** por sua gentil disponibilidade em várias ocasiões.

Aos meus **amigos** pela força, disponibilidade e valiosas sugestões na realização deste trabalho. Aos **meus colegas** de laboratório, que diretamente e indiretamente me ajudaram a vencer mais este objetivo em minha vida.

À **CAPES** pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Fungos endofíticos são uma fonte ainda pouco explorada de metabólitos biologicamente ativos com as diversas atividades biotecnológica, incluindo atividade terapêutica na saúde e produção de enzimas de importância comercial, como as proteases e lipases. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o potencial biotecnológico de extratos e líquidos metabólitos de fungos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar, testando os mesmos para produção de enzimas, atividade antimicrobiana, bem como atividade citotóxica e anti-*Trypanosoma*. Foram estudados 23 fungos endofíticos de semente de macaúba e gomos de cana de açúcar. Dentre os 23 isolados, dois pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* produziram líquido metabólico com atividade bacteriostática ou bactericida frente a várias bactérias patogênicas ao homem, a saber: *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella flexneri*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*. Os mesmos líquidos metabólicos não apresentaram atividade antifúngica frente as quatro espécies de *Candida* sp. testadas. Além dos líquidos foram testados os extratos metanólicos extraídos dos micélios fúngicos quanto à ação antiproliferativa de *Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade celular de macrófagos da linhagem J774, não apresentando efeito de inibição do crescimento de *T. cruzi*, e apresentando citotoxicidade maior que a droga controle. Quanto a produção de enzimas, os fungos não apresentaram produção significativa de proteases, lipases, amilases e celulases. Desta forma, os resultados mostram a necessidade de ampliar as pesquisas sobre o potencial químico presente no líquido metabólito produzido por esses fungos endofíticos para testar, bem como apresenta potencial atividade antibacteriana dos fungos estudados.

Palavras-Chave: Líquido metabólito. Extrato micelial. Antibacteriano. Antifúngico. Antiprotozoária.

ABSTRACT

Endophytic fungi are an unexplored source of biologically active metabolites with diverse biotechnological activities, including therapeutic activity in health and the production of enzymes of commercial importance, such as proteases and lipases. Thus, the present study had as main objective to evaluate the biotechnological potential of extracts and liquid metabolites of endophytic fungi of macaúba and sugarcane, testing them for the production of enzymes, antimicrobial activity, as well as cytotoxic and anti- *Trypanosoma*. Twenty - three endophytic fungi from macaúba seed and sugar cane buds were studied. Among the 23 isolates, two belonging to the genus *Aspergillus* and *Fusarium* produced metabolic liquid with bacteriostatic or bactericidal activity against bacteria pathogenic to man: *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Shigella flexneri*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus aureus* resistant methicillin, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistant oxacillin, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. The same metabolic liquids do not present antifungal activity as four species of *Candida* sp. Tested. In addition to the fluids extracted from fungal mycelia, the antiproliferative action of *Trypanosoma cruzi* and cellular cytotoxicity of J774 macrophages showed no inhibitory effect on *T. cruzi* growth and showed a higher cytotoxicity than a drug control. As for the production of enzymes, fungi did not present significant production of proteases, lipases, amylases and cellulases. Thus, the results show a need to expand as research on the chemical potential present in the liquid metabolite produced by these endophytic fungi to test, as well as to present antibacterial activity of the fungi studied.

Keywords: Mycelial extract. Metabolite liquid. Antibacteria. Antifungal. Antiprotozoario.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação morfológica dos isolados fúngicos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar 40

Tabela 2 - Determinação da atividade antibacteriana dos líquidos metabólitos frente as bactérias patogênicas ao homem. 40

Tabela 3 - Atividade antiproliferativa para formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* e citotóxica dos extratos metabólitos. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Batata Dextrose Agar
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CL50	Concentração Letal Média
DMSO	Dimetilsulfóxido
HMA	Agar Miller Hilton
IC50	Metade da Concentração Inibitória Máxima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes A Meticilina
MTT	Brometo De Dimetiltiazol-II-Bifenil Tetrazólio
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial De Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólio
YES	Yeast extract sucrose

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1.1 Introdução	11
1.2 Objetivos	12
1.2.1. Objetivo geral	12
1.2.2. Objetivos específicos	12
1.3 Revisão da Literatura	13
CAPÍTULO 2	23
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A - NORMAS DA REVISTA	57

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os microrganismos que, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida coloniza o interior de tecidos vegetais sem causar dano aparente ao seu hospedeiro são denominados endofíticos (AZEVEDO et al., 2000). Nas 300.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta Terra, cada uma hospeda um ou mais fungos endofíticos (STROBEL et al., 2004), revelando uma infinidade de vegetais que albergam fungos em seus tecidos que podem ser explorados. Nos últimos anos os organismos que mais apresentaram atividades na produção de metabólitos bioativos foram os fungos endofíticos (ARAÚJO et al., 2010). Se destacando como uma enorme fonte potencial de novos produtos como medicamentos, enzimas de interesse tecnológico e biocontrole de pragas em grandes lavouras.

Dentre os grupos de compostos produzidos por fungos endofíticos os antibióticos se destacam com a atividade biológica de maior importância para a saúde humana, e foram os primeiros metabólitos fúngicos conhecidos pela humanidade, uma vez que os chineses já utilizavam sapatos mofados para curar ferimentos nos pés, cerca de 3.000 a.C., contudo, apenas em 1928 que o médico escocês Alexander Flemming descobriu a penicilina a partir de culturas de *Penicillium chrysogenum* (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

As infecções (bacterianas e fúngicas) estão entre as principais causas de morte no mundo (OMS, 2008). Em áreas tropicais, onde o Brasil está inserido, além das doenças bacterianas e fúngicas, existem doenças negligenciadas, como a doença de Chagas (trpanossomíase americana), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* esta doença afeta milhões de pessoas de áreas tropicais pelo mundo, resultando em grandes perdas econômicas e impactos sociais nas regiões endêmicas (TDR, 2005).

De acordo com as estimativas com base em dados de 2010, mais de cinco milhões de pessoas foram infectadas com *T. cruzi* em 21 países latino-americanos, dos quais 62,4% eram de países do Sul, sendo, a Argentina, Brasil e México os países com o maior número estimado de pessoas infectadas (WHO, 2015).

Sendo assim a busca por metabólitos que possam ser utilizados tanto na medicina como em bioprocessos que melhore a qualidade de vida das pessoas, promovendo melhoras econômicas, sociais e de morbidade, é que tem impulsionado as pesquisas nas áreas de biotecnologia e saúde humana. Além de produzir antibióticos, seja com atividade contra bactérias ou leveduras que infectam o homem, os fungos endofíticos são produtores de enzimas com potenciais aplicações comerciais.

O presente estudo se propõem em realizar uma seleção de bioatividades *in vitro* sobre isolados de fungos endofíticos preservados de sementes de *C. aculeata* JACQ. Lood. ex. Mart (Macaúba) e gomos de *Saccharum spp* L. (Cana-de-açúcar) para identificar as atividades bioativas nos líquidos e extratos metabólitos quanto a atividade antibacteriana e antifúngica, tripanocida e identificar a produção de enzimas.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Identificar atividades bioativas nos líquidos e extratos metabólitos de fungos endofíticos isolados da semente de macaúba e cana-de-açúcar.

1.2.2. Objetivos específicos

- Cultivar e produzir líquido e extratos metabólitos de fungos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos líquidos metabólitos dos fungos endofíticos frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas e espécies de *Candida* sp.;
- Identificar a produção de enzimas (protease, celulase, lipase e amilase) dos fungos endofíticos;
- Avaliar a atividade tripanocida dos extratos metabólito para *Trypanosoma cruzi*;
- Determinar a citotoxicidade dos extratos metabólitos dos fungos endofíticos;

1.3 Revisão da Literatura

Fungos endofíticos

O termo endófito originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. Já se conhecia os microrganismos endofíticos desde um século atrás, e com base em sua etiologia, o termo endófito deriva do Grego, 'éndon' que significa dentro e 'phytón', planta (JALGAONWALA et al., 2011). A definição de endófito por Bacon e Write amplamente aceita e utilizada, é que endófitos são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro ou efeito negativo (KHARWAR et al., 2011).

No início dos anos setenta, os microrganismos endofíticos eram considerados neutros, sem causar benefícios ou danos a planta. Mas sabe-se que os endofíticos possuem um papel importante na proteção de plantas contra predadores e patógenos (AZEVEDO et al., 2000). Os fungos endofíticos representam um grupo heterogêneo de táxons pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota e subfilo Mucoromycotina (STROBEL; DAISY, 2003; OSES et al., 2008; HYDE; SOYTONG, 2008). Fungos endofíticos habitam o interior de um vegetal (MELO E AZEVEDO, 1998), em pelo menos um período de seu ciclo de vida. Apesar de serem produtores de metabólitos secundários biologicamente ativos (TAN E ZOU, 2001), são pouco explorados. Sendo constantemente descritos na literatura mundial como uma diversidade pouco explorada. Tais estudos, principalmente utilizando-se plantas de clima tropical, poderão resultar em descobertas de interesse acadêmico e aplicado para saúde humana e meio ambiente. É neste momento que surge a importância destes microrganismos, considerando-se os aspectos biotecnológicos que eles possam produzir (AZEVEDO, 1999).

Os fungos endofíticos são fontes de novos antibióticos, imunossupressores e substâncias antitumorais (FERRARA, 2006). Alguns autores acreditam que exista a probabilidade que esses microrganismos produzam compostos bioativos com grande

potencial aplicado a saúde e produção agrícola ainda não relatados e nem sequer conhecidos pela ciência (SEBASTIANES et al., 2012; TAN; ZOU, 2001). Além de aumentarem a resistência das plantas às condições de estresse e patógenos (BANERJEE et al., 2014). Desta maneira a utilização desses fungos como produtor de compostos voláteis bioativos, demonstra ser promissora ao combate de uma ampla gama de patógenos fúngicos e bacterianos de plantas e humanos (STROBEL, 2002; WORAPONG et al., 2011).

Nas últimas décadas, diversos metabólitos foram isolados e suas estruturas identificadas. A descoberta destas estruturas juntamente com a elucidação dos mecanismos biológicos, bioquímicos e a ação terapêutica, tem sido uma abordagem importante usada pelos químicos orgânicos e medicinais no desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais são fontes inestimáveis para o desenvolvimento de novas drogas, sendo isolados principalmente de microrganismos e plantas (CLARDY; WALSH, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2007). Estudos do papel desempenhado pelos produtos naturais na ecologia de diferentes tipos de organismos podem levar à descoberta de novos compostos de origens natural com potencial bioatividades (GLOER, 2007).

Os fungos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente para a produção de enzimas e outros metabólitos. Vários são os compostos ativos que se tem hoje e muitas pesquisas para o isolamento de novos metabólitos fúngicos ainda continuam sendo considerados fontes promissoras de novos medicamentos de uso terapêutico, constituindo uma realidade onde diversos medicamentos utilizados nas unidades de saúde são oriundos de metabólitos de fungos (STROBEL; DAISY, 2003; FERRARA, 2006). É importante mencionar que 42% dos mais de vinte mil produtos bioativos, incluindo agentes antiviral, antibacteriano, antifúngico, citotóxicos e imunomoduladores são produzidos a partir de fungos (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011; BARREIRO; FRAGA, 2012).

Dentre as atividades biológicas mais pesquisadas com os metabólitos de fungos endofíticos, sem dúvida, a atividade antimicrobiana é mais estudada. E busca-se cada vez mais compostos fúngicos com atividade contra bactérias resistentes aos antibióticos de rotina clínica.

Resistência bacteriana e a busca de novos antibióticos

A utilização indiscriminada de antimicrobianos assim como a resistência bacteriana entre diversos patógenos causadores de inúmeras infecções é mundialmente reconhecida como um problema de grande relevância (KADOSAKI et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), a resistência bacteriana a antibióticos deveria ser considerada a muito tempo como um problema de saúde pública, principalmente na esfera hospitalar, já que é uma prática não muito recente. Desta forma os países precisam se unir para implantar providências e investir em estudos para melhor compreensão das infecções, concentrando suas ações em medidas de controle e de diagnósticos precisos com a finalidade do uso coerente de antimicrobianos.

Uma das principais preocupações mundiais quanto ao uso de medicamentos está relacionada à utilização de antimicrobianos, pois, nas duas últimas décadas, os microrganismos multirresistentes, têm surgido de maneira rápida e assustadora no mundo todo. O aumento da resistência bacteriana a diferentes agentes antimicrobianos acarreta dificuldades no controle de infecções e contribui para os altos gastos do sistema de saúde público e privado (POLETTTO; REIS, 2005). O uso indiscriminado de antimicrobianos é a prática que mais tem contribuído para o surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes (TRUCCO et al., 2002). Um importante mecanismo de resistência bacteriana é a produção de beta-lactamases de espectro ampliado, potentes enzimas capazes de inativar, por hidrólise, os antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro, levando à ineficácia desses fármacos (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Em contrapartida a taxa de desenvolvimento de novos antibióticos pela indústria farmacêutica diminuiu nos últimos 20 e 30 anos, enquanto que a resistência bacteriana à esses medicamentos aumentou progressivamente (SALMOND, WELCH, 2008). Alguns autores afirmam que doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade no mundo (FAUCI, 2001; SPELLBERG et al., 2004). E entre

esses agentes dá-se destaque as bactérias que contribuem substancialmente com essas taxas (RASKO e SPERANDIO, 2010).

Desale e Bodhankar (2013) utilizaram dezessete fungos endofíticos de diferentes partes de uma planta (*Vitex negundo* L), encontraram um fungo que apresentou um excelente potencial antimicrobiano, frente as bactérias: *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *K.pneumoniae* e *S. aureus*, demonstrando que é comum no meio científico a busca por novas moléculas biologicamente ativas. Fungos patogênicos ao homem como *Candida albicans* e a plantas de interesses comercial, como o *Fusarium oxysporum* também são objeto de pesquisa, quando se trata de novas drogas produzidas por metabólitos secundários de fungos endofíticos, como foi encontrado por Huang et al., (2008).

Candida spp

O gênero *Candida* é composto por um grupo heterogêneo de organismos fúngicos onde todos podem crescer com morfologia de levedura. As colônias de *Candida* crescem em meio de cultura Sabouraud dextrose agar, apresentando uma coloração branco-amarelada. Contudo, diferem entre espécies, com as colônias podendo ser mais cremosa, lisa, pastosa, brilhante ou seca, enrugada e sem brilho (LARONE, 2002; SUDBERY et al., 2004).

As infecções causadas por *Candida spp* podem ser diferenciadas em infecções tópicas superficiais como na pele, unhas, cabelo ou sistêmicas atingindo membranas e mucosas como a cavidade oral e vários órgãos do corpo humano (WILLIAMS et al., 2011). O aumento das infecções fúngicas oportunistas está relacionado com o aumento da expectativa de vida da população, em consequência dos avanços médicos, principalmente o uso de agentes antimicrobianos, terapias médicas e o uso de dispositivos médicos invasivos, como cateteres, próteses e implantes (LASS-FLORL, 2009; WILLIAMS et al., 2011; PFALLER et al., 2002). As espécies variam conforme a idade dos paciente, e a localidade em que habitam. *Candida albicans* é a espécie mais frequente em todas as regiões dos Estados Unidos e Europa, seguindo *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, em quanto na America latina e Espanha a

segunda espécie mais frequente é *C. parapsilosis* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2005; COLOMBO et al., 2003). A espécie *C. albicans* é comumente isolada na cavidade oral causando infecções, embora tenha aumentado a incidência de outras espécies, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*. Aparentemente, o aumento destas espécies de *Candida* é o reflexo do aumento da resistência aos antifúngicos, terapias imunossupressoras e o tabagismo (CANNON et al., 1995; MARTINS et al., 2010; HENRIQUES et al., 2006).

As espécies de *Candida* caracterizadas por serem agentes de fungemia estão sendo as responsáveis pela crescente incidência de infecções fúngicas invasivas nos últimos anos e tem sido causa da mortalidade e morbidade de pacientes imunocomprometidos (SANTOS et al., 2010). Essas infecções tem sido fundamento de diversos estudos em todo mundo, uma vez que esse gênero de microrganismos habita como um comensal a microbiota saudável de animais e humanos, sendo responsáveis por causar doenças fúngicas oportunistas (CLEFF et al., 2005). O gênero *Candida* é cosmopolita podendo estar amplamente distribuído na natureza: no solo, água, vegetais, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares. Estudos vem relatando infecções por espécies de *Candida* ao longo das últimas décadas, principalmente em hospitais. Sua forma oportunista são notavelmente a causa de infecções locais e sistêmicas em indivíduos comprometidos, uma vez que esses microrganismos tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro, como exemplo o comprometimento de barreiras anatômicas, mudanças hormonais ou após procedimentos médicos invasivos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Alternaria sp é um gênero de fungo endofítico onde várias espécies já foram descritas como produtoras de diferentes metabólitos bioativos, com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (FERNANDES et al., 2009; VAZ et al., 2009).

Uma outra consideração é que os fungos endofíticos possuem uma fonte de diferentes moléculas químicas que podem possuir diversas atividades biológicas, principalmente para doenças negligenciadas como a Tripanossomíase Americana (COTA et al., 2008).

Doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta por Carlos Chagas há 107 anos, é uma das 17 doenças negligenciadas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010). Essa doença que é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é transmitida por mais de 15 gêneros de insetos vetores. O vetor defeca depois de realizar o repasto sanguíneo durante a noite e a infecção ocorre quando uma pessoa entra em contato com o as fezes/urina do vetor contaminados com o parasito. Em áreas sem transmissão domiciliar, a infecção é detectada em idades mais avançadas, e é geralmente relacionada a agricultura, a pesca ou atividades de caça proporcionando maior exposição aos vetores silvestres. Outros modos de transmissão incluem a transmissão oral através de alimentos contaminados, transfusão de sangue infectado, a transmissão congênita, transplante de órgãos e acidentes de laboratório. Inicialmente a doença se manifesta em duas fases: aguda de aproximadamente dois meses, com alta parasitemia e a fase crônica que é caracterizada por parasitos que estão quase escassos no sangue e ocultos em tecidos alvos, especialmente o cardíaco e o sistema digestivo. De acordo com as estimativas com base em dados de 2010, mais de cinco milhões de pessoas foram infectadas com *T. cruzi* em 21 países latino-americanos, dos quais 62,4% eram de países do Sul, sendo, a Argentina, Brasil e México os países com o maior número estimado de pessoas infectadas (WHO, 2015). O protozoário *T. cruzi* afeta milhões de pessoas pelo mundo, causando graves doenças em humanos, resultando em grandes percas econômicas e impactos sociais nas regiões endêmicas (TDR, 2005). E mesmo assim não recebem incentivos das indústrias farmacêuticas para a produção de novos medicamentos.

Cota et al., (2008) conclui em seu trabalho que um composto bifênol produzido por fungos do gênero *Alternaria* mostrou atividade inibidora frente à enzima tripanotiona redutase. Esta enzima é um alvo para a validação de drogas em tripanosomatídeos, por ser uma enzima presente em seu metabolismo e está envolvida na redução da tripanotiona dissulfeto em tripanotiona ditiol, etapa essencial para manutenção de um ambiente redutor nesses parasitos e de extrema importância para sobrevivência desses parasitos. Desta forma, abrem-se novos caminhos para o

desenvolvimento de inibidores mais potentes que poderiam mostrar atividade contra *Trypanosoma*, reforçando o potencial de fungos endofíticos como uma útil fonte de diversidade química para os programas que visam a descoberta de medicamentos para doenças negligenciadas.

Além de atividade anti *Trypanosoma cruzi*, os fungos endofíticos são potenciais produtores de enzimas.

Citotoxicidade *in vitro*

O ensaio de citotoxicidade avalia os efeitos tóxicos do agente testado às funções celulares basais, sendo a porta de entrada de testes para avaliar a biocompatibilidade de materiais e substâncias, requisito obrigatório para considerar um produto seguro (ISO, 2009; ROGERO, 2003). Os ensaios de citotoxicidade possibilitam a avaliação do potencial toxicológico *in vitro* do produto quando em contato com a célula, indicando se deve ser rejeitado ou se segue para estudos futuros. Diferentes métodos *in vitro*, são utilizados para avaliar a toxicidade de biomateriais. Esses foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células conhecidas, avaliando as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares são os mais utilizados (ROGERO et al., 2000).

Enzimas

As enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. A função de um catalisador é aumentar a velocidade de uma reação, tendo uma especificidade seletiva por seus substratos, sendo a velocidade da reação variável, devido a fatores como concentração de enzimas ou substrato, temperatura e pH (LEHNINGER, 2006).

Pandey et al., (1999) considera que depois dos antibióticos, as enzimas são o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. São fundamentais em processos industriais, sobretudo nas áreas de biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos que utilizam as enzimas em várias de suas etapas. Várias são as enzimas comerciais derivadas de fonte vegetal, microbiana ou animal, com destaque as microbianas que produzem amiloglucosidases termoestáveis, as proteases, as amilases e as pectinases, muito empregadas em processos industriais, visando o aumento da produção e da qualidade, melhorando a viscosidade e a coloração dos produtos (SOUZA; SOMMER, 2002).

A produção de enzimas é uma área da Biotecnologia em expansão, que movimenta bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2003). Novas enzimas e usos estão sendo descobertas a partir do trabalho de várias equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. Desta maneira é decrescentes os custos das enzimas industriais; assim, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente (SANT'ANNA, 2001).

Enzimas fúngicas

As aplicações das enzimas no mercado industrial mundial estão ligadas à Biotecnologia visando o uso de novas matérias primas e a melhoria de processos e das características físico-químicas de matérias. A produção de enzimas microbianas é um dos principais setores atual da Biotecnologia Industrial, sendo que as proteases ocupam o primeiro lugar no mercado mundial de enzimas microbianas aplicadas industrialmente, seguidas pelas amilases (MICHELIN, 2005).

Na indústria do segmento têxtil, as enzimas são utilizadas durante o processamento das fibras têxteis, com a vantagem de redução do volume e conteúdo poluente dos efluentes formados e diminuição do consumo de energia (ANDREAUS;

CAVACO-PAULO, 2008). O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las.

Essa potencial capacidade de produção é evidenciada pela grande diversidade biológica, ainda pouco cultivada, que serviria como fonte para a obtenção de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial e pela abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como, a palha de arroz, o bagaço de cana, dentre outros) que constitui uma matéria prima de baixo custo para as fermentações (BON; FERRARA; CORVO, 2008)

São várias as enzimas com importância para a indústria, mas devido à demanda e perspectivas de ampliação da aplicação no setor agroindustrial têm se destacado as amilases e pectinases (UENOJO; PASTORE, 2007; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; MILAGRES; MAGALHAES; FERRAZ, 2005). As amilases são enzimas que degradam moléculas de amido, que é encontrado em maior quantidade em sementes de cereais como milho, trigo, cevada e arroz e em tubérculos como batata e mandioca (BULÉON, 1998). Enzimas amilolíticas são amplamente usadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA et al., 2003).

As enzimas pectinolíticas, por sua vez, são capazes de degradar as substâncias pécticas, componentes da parede celular dos vegetais. A habilidade para sintetizar essas enzimas é muito comum entre os grupos de microrganismos, mas os fungos são os mais cotados em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas em meio de cultura (BLANDINO et al., 2001).

As lipases são outras classes de enzimas que podem catalisar reações, como a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis fornecendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios (COLLA et al., 2010; KUMAR et al. 2012). Sendo aplicáveis em uma variedade de setores industriais, com ênfase, na formulação de detergentes (SAISUBRAMANIAN et al., 2006), no tratamento de resíduos ricos em óleos e

gorduras (LEAL et al., 2002) e na área da saúde, compondo medicamentos, em diagnósticos, cosméticos ou antibióticos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Na indústria de alimentos apresentam aplicações na formulações de emulsificantes (KIM; YOUN; SHIN, 2006), como os mono e diacilgliceróis (KITTIKUN; KAEWTHONG; CHEIRSILP, 2008); na produção de margarinas; no desenvolvimento de aromas (SALAH et al., 2007); e embutidos cárneos, entre outros. Recentemente, têm sido utilizadas na indústria da bioenergia, para a produção de biodiesel (PARK; SATO; KOJIMA, 2006; MADALOZZO et al., 2015). As lipases podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo as duas últimas as mais utilizadas. Dentre as enzimas microbianas, as produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo (CARVALHO et al., 2003).

Acremonium sp., *Alternaria sp.*, *Alternaria chlamydosporus*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, são exemplos de fungos endofíticos que foram encontrados produzindo as enzimas extracelulares amilase, celulase, lipase e protease (MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005)

Considerando a importância do potencial das aplicações dos metabólitos e extratos dos fungos endofíticos e os poucos estudos realizados com a microbiota, especialmente com as plantas da região tropical, justificou-se a realização desse trabalho.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MACAÚBA E CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E TRIPANOCIDA¹

¹ Artigo a ser enviado para o periódico Revista da Academia Brasileira de Ciências – Qualis B2 da Capes para área de Biodiversidade.

**AVALIAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MACAÚBA E
CANA-DE-AÇÚCAR PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E TRIPANOCIDA**

Diego Leandro Reis da Silva Fernandes¹, Sarana Héren Pereira ², Idjane Oliveira Santana³

1. Mestrando do Programa de Pós-Graduação Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Rua Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil.

2. Mestranda do Programa de Pós-Graduação Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Rua Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil.

3. Docente do Programa de Pós-Graduação Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Rua Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, CEP 55608680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: diego-lean@hotmail.com

Resumo

Fungos endofíticos são uma fonte ainda pouco explorada de metabólitos biologicamente ativos, por isso o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de extratos e líquidos metabólicos de fungos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar, testando os mesmos para produção de enzimas, atividade antimicrobiana, bem como atividade citotóxica e anti*Trypanosoma*. Foram estudados 23 fungos endofíticos, dos quais 2 isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* produziram líquido metabólico com atividade bacteriostática ou bactericida frente a várias bactérias patogênicas ao homem, Gram negativas e Gram positivas. Nenhum líquido metabólico apresentou atividade frente as cinco espécies de *Candida sp* utilizadas nos ensaios. Os extratos metanólicos extraídos dos micélios dos fungos não apresentaram ação antiproliferativa de *Trypanosoma cruzi*. Quanto ao ensaio de citotoxicidade celular de macrófagos da linhagem J774, os extratos fúngicos apresentaram citotoxicidade maior que a droga controle utilizada. Quanto a produção de enzimas, os fungos não apresentaram produção significativa de enzimas da classe das proteases, lipases, amilases e celulases. Desta forma, os resultados mostram a necessidade de ampliar as pesquisas sobre o potencial químico presente no líquido metabólito produzido por esses fungos endofíticos para testar, bem como apresenta potencial atividade antibacteriana dos fungos estudados.

Palavras-Chave: líquido metabólito, extrato micelial, antibacteriano, antifúngico, tripanocida

Abstract

Endophytic fungi are a source still little explored of biologically active metabolites, therefore the present study aimed to evaluate the biotechnological potential of extracts and metabolites of endophytic fungi liquids of macauba and sugarcane, testing the same for production of enzymes, antimicrobial activity, as well as cytotoxic activity and *Trypanosoma cruzi*. Were studied 23 endophytic fungi, of which 2 isolates belonging to the genera *Aspergillus* and *Fusarium* produced liquid with bacteriostatic or bactericidal activity metabolic front of several pathogenic bacteria, Gram negative and Gram positive. No metabolic activity presented the liquid five species of *Candida* sp used in the tests. Methanolics extracts extracted from mycelia of fungi did not show results action of *Trypanosoma cruzi*. As for the cellular cytotoxicity test of line J774 macrophages, fungal extracts showed cytotoxicit greater than the drug control. As the production of enzymes, the fungi showed no significant production of enzymes of the class of proteases, lipase, amylase and cellulase. In this way, the results show the need to expand the research on the chemical potential present in the liquid metabolite produced by these endophytic fungi to test, as well as presents potential antibacterial activity of fungi studied.

Keywords: Mycelial extract, metabolite liquid, antibacterial, antifungal, antiprotozoario.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversos produtos naturais foram isolados e suas estruturas químicas identificadas. A descoberta destas estruturas juntamente com a elucidação dos mecanismos biológicos, bioquímicos e a ação terapêutica, tem sido uma abordagem importante usada pelos químicos orgânicos e medicinais no desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais são fontes inestimáveis para o desenvolvimento de novas drogas, sendo isolados principalmente de microrganismos e plantas (Clardy & Walsh, 2004; Newman & Cragg, 2007). Estudos do papel desempenhado pelos produtos naturais na ecologia de diferentes tipos de organismos podem levar à descoberta de novos compostos de origem natural com potencial bioativo (Gloer, 2007).

Os fungos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente para a produção de enzimas e uma grande variedade de metabólitos através de sistemas de cultura ultrasensíveis. Destaque pode ser dado aos fungos endofíticos, que colonizam os tecidos de plantas, porém, sem causar sintomas de doença (Strobel *et al.* 2004; Aly *et al.*, 2011). Os fungos endofíticos produzem metabólitos bioativos, com possíveis aplicabilidades na medicina, indústria alimentícia e agricultura (Verma *et al.*, 2009; Kharwar *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Dentre essa variedade de metabólitos secundários diversas estruturas químicas foram isoladas possuindo atividade antitumoral, antimicrobiana entre outras (Strobel *et al.*, 2004; Zhang, 2006). De acordo com Tan e Zou (2001) os fungos são excelentes produtores de metabólitos com atividade principalmente fungicida e bactericida. Um exemplo é o ácido *colletric*, um agente antimicrobiano ativo, o qual foi isolado a partir de uma cultura líquida do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Zou *et al.*, 2000). Em contrapartida a taxa de desenvolvimento de novos antibacterianos pela indústria farmacêutica diminuiu nos últimos 20 e 30 anos, enquanto que a resistência bacteriana a esses medicamentos aumentou progressivamente (Salmond, Welch, 2008). E dessa mesma forma doenças infecciosas estão entre as principais causas de óbitos no mundo (Fauci, 2001; Spellberg *et al.*, 2004). Em destaque as bactérias que contribuem substancialmente com as taxas de mortalidade (Rasko & Sperandio, 2010).

Além disso os fungos endofíticos tropicais possuem moléculas que podem contêm diversas atividades principalmente para doenças negligenciadas como a

Tripanossomíase Americana (COTA *et al.*, 2008) causada pelo protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi* que afeta milhões de pessoas de áreas tropicais pelo mundo, originando graves doenças em humanos, e resultando em grandes perdas econômicas e impactos sociais nas regiões endêmicas (TDR, 2005). Contudo não recebem incentivos massivos das indústrias farmacêuticas para a produção de novos medicamentos.

Portanto, objetivou-se com o presente trabalho determinar a produção de enzimas e a atividade antibacteriana, antiproliferativa de *T. cruzi* e antifúngica dos fungos endofíticos isolados de *Crocomia aculeata* JACQ. Lood. ex. Mart. (Macaúba) e *Saccharum spp.* L. (Cana-de-açúcar).

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFPE- CAV, no Laboratório NB2 do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e em parceria com o Laboratório de Imunogenética no Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ.

Isolados fúngicos

Foram selecionados 23 isolados fúngicos preservados no laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFPE-CAV, 13 isolados de semente de Macaúba e 10 de cana-de-açúcar. Os fungos preservados em óleo mineral com meio Batata Dextrose Agar (BDA) foram reativados para tubos de ensaio com caldo glicosado e após crescimento do micélio, replicados para placas de Petri com meio Agar Sabouraud, sempre mantidos em triplicata e replicados semanalmente, a fim de manter culturas jovens durante todo experimento.

Produção do líquido metabólico e extrato metabólico dos fungos

A metodologia utilizada foi a produção do líquido metabólico, também conhecido como método do filtrado ou para detecção de antibióticos (Kawamoto & Lorbeer, 1976). Fragmentos de partes dos micélios foram retiradas e semeadas em erlenmeyer com meio YES (sacarose extrato de levedura) estéril, e armazenados em temperatura ambiente durante 20 dias. Consecutivamente utilizando papel filtro Whatman foi separada a massa micelial do líquido metabólito, sendo armazenados em tubos falcon estéreis de 50 mL a temperatura de 4 °C para

posteriores testes biológicos. A massa micelial foi utilizada para obtenção do extrato a partir da maceração do micélio em metanol sob agitação por 24h e posterior filtração e secagem em rotaevaporador. Após esse procedimento, o extrato foi ressuspendido em metanol.

Identificação Morfológica dos fungos

A identificação dos gêneros e espécies fúngicas foi feita pela observação macroscópica de colônias, seguida de análise microscópica das estruturas de cada isolado, usando meios de cultura e referências da literatura. A identificação morfológica foi realizada na Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE.

Microrganismos utilizados nos ensaios *in vitro*

Foram utilizadas cepas bacterianas e fúngicas, sendo as cepas bacterianas as seguintes: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente – cepa clínica isolada de ferida, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*. As leveduras usadas nos testes foram: *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* isolados clínicos. Além de bactérias e fungos foi utilizada ainda a cepa de *T. cruzi* (cepa DM28c), forma epimastigotas crescidos em culturas axênicas e tripomastigotas oriundas das infecção *in vitro* da linhagem de células LLC-MK2.

Preparação das suspensões bacterianas e fúngicas

As suspensões bacterianas foram preparadas e padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em HMA, em seguida coleta de 1µL de células bacterianas e diluição em solução salina 0,9% até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹) Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:100, em salinas 0,9%, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹, a qual foi utilizada nos ensaios.

A suspensão fúngica foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas, em Agar Sabouraud, posteriormente coletando 1µL de células fúngicas e diluindo em salinas 0,9% até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland, sendo essa suspensão usada nos ensaios.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) Bacteriana

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo usando microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O resultado da CIM foi avaliado ao observar ausência de turbidez nos poços, e revelando com o corante vital TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio a 2%). Como controle positivo foi usado Cloranfenicol. Os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano coram em vermelho (Duarte *et al.*, 2005). O resultado é dado pela maior diluição do líquido metabólico que apresentou atividade.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a adição do corante TTC na microplaca de 96 poços, foi realizada a confirmação da CIM com o auxílio de alças estéreis de 1µL semeando os poços visualmente positivos para atividade antibacteriana, em placas de petri com meio Agar Mueller Hilton, por 24h em estufa a 37 ± 2 °C confirmando a ausência ou presença de crescimento bacteriano.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) Fúngica

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo Sabouraud usando microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma técnica M7A6 do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O resultado da CIM foi avaliado ao observar ausência de turbidez nos poços, e revelando com o corante vital TTC.

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a coloração com o corante TTC na microplaca de 96 poços, foi realizada a confirmação com o auxílio de alças estéreis de 1µL semeando em placas de petri com meio Agar Sabouraud os poços visualmente positivos, por 24h em estufa a 37 ± 2 °C confirmando a ausência ou presença de crescimento fúngico.

Determinação da citotoxicidade dos extratos metanólicos fúngicos

Foi preparado uma suspensão celular de macrófagos (10^5 cel/mL) da linhagem J774 e distribuída em placas de cultura de 96 poços (198 µL em cada poço). Posteriormente incubadas em atmosfera úmida com 5 % de CO₂ a 37 °C durante 24 horas. As amostras dos extratos

metanoicos e clorofórmicos foram incubadas a (22 µL) em diferentes concentrações (100; 50; 25 até 0,19 µg/mL), sob as mesmas condições, durante 72 horas. Os poços controle receberam o veículo. Foi adicionado 25 µL de MTT em todos os poços [(brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5bifenil tetrazólio)] em Tampão Fosfato-Salino (PBS), (5 mg/mL, p/v) levando a incubação a 37 °C durante 2 horas em seguida foi aspirado o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT e adicionado 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO), para dissolução dos cristais de formazan (MOSMANN, 1983). Levando em seguida ao leitor de densidade óptica de placas a 595 nm comparando a média da densidade óptica (OD) dos poços testes com a média da OD do grupo controle, para a determinação da IC50.

Avaliação da atividade tripanocida para *Trypanosoma cruzi*, formas epimastigota e tripomastigota

Para determinar o efeito tripanocida para *T. cruzi*, formas epimastigotas (10⁶/ml), na fase log de crescimento, foram colocadas em placas de 96 poços o volume de 100µl, sob condições de cultura adequadas (26°C). Usou-se nos testes o benzonidazol (50 mg/ml) como droga controle positivo e culturas de parasitos sem tratamento como controle negativo. Os extratos metabólicos foram avaliados quanto a concentração inibidora de 50% do crescimento dos parasitas (IC_{50%}) onde formas epimastigotas e tripomastigotas da cepa Y. de *T. cruzi* que estiveram cultivadas durante 5 dias e 24 horas, respectivamente, na presença de diferentes concentrações dos extratos metabólitos, procedendo-se em seguida a contagem de parasitos viáveis. O cálculo da IC_{50%} se deu através de um regressão linear simples utilizando o software Prisma 5.0 Graphpad.

Atividade enzimática

O experimento foi feito por meio de crescimento nos meios enzimáticos específicos para detecção da produção de amilase, protease, celulase e lipase, onde foram inoculados discos de 3 mm de diâmetro contendo o crescimento micelial, e as placas foram incubadas a temperatura ambiente. Os experimentos foram realizados em triplicata, em eventos isolados. Os resultados foram obtidos através da medição dos halos em mm.

A atividade enzimática foi realizada conforme descrito pelo Protocolo de Hankin e Anagnostakis (1975) para a enzima amilase e lipase. Para os testes de celulose e protease utilizou-se a metodologia descrita por Dingle *et al.*, (1953).

RESULTADOS

Os 23 isolados de fungos endofíticos foram catalogadas com códigos (fungo), E (extrato) e L (líquido) seguida de numeração sequencial. Foram testados 23 líquidos metabólitos, sendo 10 deles provenientes de fungos endofíticos isolados de cana-de-açúcar e 13 de semente de macaúba.

Todos os isolados fúngicos foram testados para a produção de enzimas, mas não obtiveram resultados positivos quanto a produção das mesmas, com valores de halos médios em mm desprezíveis, variando entre 0 e 4 mm.

Dentre as espécies mais prevalente *Aspergillus parasiticus* se destacou, na semente de macaúba. Na semente de macaúba foram identificadas as seguintes espécies de fungos e suas frequências: *Aspergillus parasiticus* (41,7%), *Aspergillus* seção *Flavi* (8,3%), *Penicillium citreonigrum* (8,3%), *Talaromyces purpurogenus* (8,3%), *Aspergillus* seção *Niger* (16,7%), *Aspergillus oryzae* (8,3%), *Fusarium solani* (8,3%). Nos colmos de cana-de-açúcar foram identificados os seguintes gêneros/espécies de fungos endofíticos: *Aspergillus sp.* (18,2%), *Trichoderma harzianum* (18,2%), *Aspergillus sydowii* (9,1%), *Aspergillus* seção *Flavi* (18,2%), *Aspergillus* seção *Niger* (9,1%), *Trichoderma sp.* (9,1%) e dois fungos (18,2%) que não foi possível a identificação pela taxonomia convencional por não apresentarem estruturas de reprodução.

O líquido metabólico de três isolados endofíticos apresentaram atividade antibacteriana, dentre os 23 testados, a saber são as espécies: *Aspergillus sydowii* (Bain. & Start) Thom & Church (F18) isolado de gomos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp* L.), *A. parasiticus* Speare (F02) *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (F12) estes últimos isolados de semente de macaúba (*Acrocomia aculeata* JACQ. Lood. ex. Mart.) (Tabela 1).

A amostra F12 apresentou melhor atividade contra bactéria *Kocuria rhizophila* com atividade do líquido metabólico até diluição de 1/16. A amostra F02 apresentou uma melhor atividade frente as bactérias *E. coli* e *S. flexneri* na maior diluição de 1/8. E o líquido metabólito F18 que apresentou atividade contra as bactérias *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* nas maiores diluições de 1/8. Ambos (F02 e F18) com atividade tanto para bactérias Gram negativas como para Gram positivas (Ver Tabela 2)

Nenhum líquido metabólico apresentou atividade anti fúngica, frente as 4 espécies de *Candida* testadas.

Foi possível testar apenas 16 extratos metanólicos e nenhum possuiu uma significativa atividade tripanocida em nenhuma das concentrações testadas (100-0,19 µg), além de possuírem uma atividade citotóxica acima da droga padrão para o tratamento de *T. cruzi*, nas formas testadas (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A produção de líquido metabólito por fungos é uma das técnicas de produção de metabólitos secundários, onde os metabólitos ficam retidos no meio de cultura utilizado para o próprio crescimento fúngico, e a partir dele é possível o isolamento dos complexos químicos biologicamente ativos. Esse líquido metabólico pode ser utilizado para testar diferentes atividades biológicas, tais como: antibacteriano, anti-*Trypanosoma*, antifúngica e citotoxicidade (Wulansari *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007; Wiyakrutta *et al.*, 2003).

Bérdy (2005) refere que os *Penicillium* e *Aspergillus* são fungos que possuem uma produção estimada de 1000 tipos de antibióticos, tornando-os gêneros de fundamental importância para pesquisa de novos metabólitos potencialmente ativos. Esses mesmos gêneros foram encontrados entre os 23 isolados de macaúba e cana, dentre os quais com atividade antibacteriana (F 02 e 18), reforçando o resultado cujos líquidos apresentaram uma excelente atividade bactericida contra bactérias Gram negativas. (Tabela 2)

Os líquidos metabólicos dos 3 isolados que apresentaram atividade antibacteriana, também apresentou ação bactericida sobre cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA), o que é um resultado importante porque o *S. aureus* é tido como um dos principais patógenos humanos com capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos (Gelatti *et al.*, 2009). Além de ser um patógeno que, ao infectar pacientes hospitalizados aumenta em até cinco vezes a chance de morte (Ferreira *et al.*, 2009). Levando em consideração que colonizações por MRSA deixaram de ser exclusivas de ambiente hospitalar para se tornarem também parte da comunidade (Gelatti *et al.*, 2009), sendo encontrada até em universitários sadios e principalmente que cursavam algum área de saúde (Ribeiro *et al.*, 2015), se faz necessário a busca de novas drogas bactericidas eficientes.

O líquido metabólico F12 obteve uma ação bacteriostática para as três diferentes cepas de *S. aureus*, e alcançou uma excelente atividade frente a cepa de *Kocuria rhizophila*, na diluição 1/16, bactéria que em pacientes imunocomprometidos pode causar infecções importantes como descrito por Moissenet *et al.*, (2012) em relato de caso clínico.

A ação bacteriostática ou bactericida de uma determinada droga está associada a capacidade de atuação sobre uma enzima, ou sítio de ligação específico na via de biossíntese e metabolismo de várias bactérias patogênicas (Guimaraes *et al.*, 2010), o que reforça os nossos resultados no qual o mesmo líquido metabólito em concentrações distintas ou iguais possuiu atividade bactericida e bacteriostática para diferentes bactérias. Dentre os três líquidos metabólitos testados o F18 apresentou-se como mais interessante por apresentar atividade em amplo espectro para todas as bactérias testadas, tanto em Gram positivas quanto em Gram negativas, em diferentes diluições. Resultado semelhante também encontrado por Arumugam *et al.*, (2014) que isolou um pigmento vermelho do fungo *Nigrospora* sp e realizou o ensaio antibacteriano, revelando possuir esse pigmento uma ação bactericida e bacteriostática sobre as bactérias Gram positivas e Gram negativas com concentrações variáveis.

Além da atividade antibacteriana, foi testada a atividade antifúngica. Gellen *et al.*, (2014) encontrou metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp. com atividade antifúngica para diferentes espécies de *Candida* patogênicas ao homem, contrário aos nossos resultados nos quais não se obteve atividade antifúngica. Contudo o *Trichoderma* sp. possui um potencial antifúngico por se tratar de uma espécie que realiza micoparasitismo e biocontrole (Filho *et al.*, 2008), o que lhe confere uma maior expressão de metabólitos antifúngicos favorecendo seu crescimento.

Para a atividade enzimática determinada pela difusão radial em meio sólido, há fatores que são determinantes, dentre eles, a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos microrganismos. Lealem & Gashe (1994) recomendam o valor do índice de atividade enzimática $\geq 2,0$ para mostrar a capacidade de degradação do substrato em meio sólido. Dos 23 fungos testados para os diferentes tipos de enzimas nenhum obteve valor igual ou superior a 2,0, apresentando valores bem inferiores. Resultado semelhante foram encontrados por Stamford (1998) quando trabalhou com os endofíticos *Pithomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Staphylococcus* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp., nos quais não apresentaram atividade enzimática satisfatória.

Estudos anteriores mostraram que os isolados de fungos dos ecossistemas brasileiros são capazes de produzir metabolitos secundários bioativos contra microrganismos patogênicos (Rosa *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2003), contra *Trypanosoma cruzi*, e células de tumor humano (Cota *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2006). Resultado que não foi alcançado com as nossas cepas fúngicas, porém, abre uma possibilidade para estudos frente a células tumorais, que não foi possível ser realizado em nosso trabalho.

Desta forma, o presente trabalho apresentou uma seleção rápida para principais atividades biológicas, nas quais os líquidos metabólicos e extratos de fungos endofíticos podem ser empregados.

AGRADECIMENTOS

D. L. R. S. Fernandes agradece a agência CAPES pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- Aly, A.H. Debbab, A. Kjer, J. Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive nature products. *Fungal Divers.*, 41: 1-16.
- Archer, D. B. Connerton, I. F. Mackenzie, D. A. 2008. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 111: 99-147.
- Arumugam, G.K. Srinivasan, S.K. Joshi, G. Gopal, D. Ramalingam, K. 2014. Production and characterization of bioactive metabolites from piezotolerant deep sea fungus *Nigrospora* sp. in submerged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 118: 99-111.
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.*; 58: 1-26.
- Clardy, J. Walsh, C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature*. 432: 829-837,

- CLSI. 2008. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, *CLSI document M27A3*, Wayne, PA.
- Cota, B. B., Rosa, L. H., Caligiorne, R. B., Rabello, A. L. T., Alves, T. M. A., Rosa, C. A., & Zani, C. L. 2008. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters*, 285(2), 177-182.
- Cota, B.B.; Rosa, L.H.; Souza-Fagundes, E.M.; Martins-Filho, O.A.; Oliveira, R.C.; Romanha, A.J.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2008a. A potent trypanocidal component from the fungus *Lentinus strigosus* inhibits trypanothione reductase and modulates PBMC proliferation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103, 263-270.
- Daffre, S. Miranda, A. Miranda, M.T.M. Bulet, P. Jr, P.I.S. Machado, A. Fogaça, A.C. Lorenzine, D.M. Pereira, L.S. Fázio, M.A. Esteves, E. Burgierman, M.R. 2001. Peptídeos antibióticos produzidos por aracnídeos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 23: 48-55.
- Dingle, J.; Teid, W.W.; Solomons, G.L. 1953. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 4: 149-155.
- Duarte, M.C.T. Figueira, G.M. Sartoratto, A. Rehder, V.L.G. Delarmelina, C. 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 305-311.
- Ferrara, M. A., 2006. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. In: *Revista Fitos*. Rio de Janeiro 73-79.
- Ferreira WA, Vasconcelos WS, Ferreira CM, Silva MFP, Gomes JS, Alecrim MGC. 2009. Prevalência de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. *Rev Patol Trop.*;38(2):83-92.
- Filho, M.R.C.; Mello, S.C.M.; Santos, R.P.; Menêzes, J.E. 2008. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento /Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). Brasília.

- Frisvad, J.C. Smedsgaard, J. Larsen, T.O. Samson, R.A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies Mycol.* 49: 201-41.
- Frisvad, J.C. Thrane, U. Filtenborg, O. In: Frisvad, J.C. Bridge. P.D. Arora, D.K. 1998. Chemical Fungal Taxonomy, New York. *Marcel Dekker*, 289.
- Gabrielson, J. Hart, M. Jarelöv, A. Kuhn, I. Mckenzie, D. Möllby, R. 2002. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods.* 50: 63-73.
- Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, Azevedo PA. 2009. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *An Bras Dermatol.*;84(5):501-6.
- Gelatti, L. C. Bonamigo, R. R. Becker, A. P.A.A. Pedro, A. 2009. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *An. Bras. Dermatol.* [online].84: 501-506.
- Gellen, L. F. A., Silva, D. P. D., Souza, S. R., Junior, A. C. F., Scheidt, G. N., & Nascimento, I. R. D. 2014. Potencial farmacoiustrial de trichoderma harzianum para fins farmacoterapêuticos. *Biota Amazônia*, 4: 91-97.
- Gloer, J. B. 2007. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (eds.) *The Mycota IV. Environmental and microbial relationship.* 2 ed. Nova Iorque: Springer-Verlag. 15: 257-286.
- Gloer, J.B. 1995 The chemistry of fungal antagonism and defense. *Can J Bot* 73: 1265–1274.
- Guimaraes, D. O. Momesso, L.S.P. Mônica, T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova* [online]. 33: 667-679.
- Hankin, L. & Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607.
- Kawamoto, S.O. Lorbeer, J.W. 1976. Protection of Onion Seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae by Seed and Soil Infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis.*, 60: 189–191.

- Kharwar, R.N. Mishra, A. Gond, S.K. Stierle, A. Stierle, D. 2011. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod.* 28: 12081228.
- Kitouni. M. Boudemagh, A. Oulmi, L. Reghioua, S. Boughachiche, F. Zerizer, H. Hamdiken, H. Couble, A. Mouniee, D. Boulahrouf, A. Boiron, P.2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Med Mycol.* 15: 45-51.
- Lealem, F., Gashe, B. A. 1994. Amylase production by a grampositive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology* 77:348-352.
- Moissenet, D. Becker, K. Mérens, A. Ferroni, A. Dubern, B. Vu-Thien, H. 2012. Persistent Bloodstream Infection with *Kocuria rhizophila* Related to a Damaged Central Catheter. *Journal of Clinical Microbiology.* 95:1495-1498.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. 2007. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products.* 70: 461-477.
- Prashar, A. Hili, P. Veness, R. G. Evans, C. S. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry.* 63: 569–575.
- Ribeiro, I. F., Silva, S. F. R., Ribeiro, T. R., Rocha, M. M. N. P., & Stolp, Â. M V. 2015. Identificação de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em estudantes universitários. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35(2), 301304.
- Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A., & Zani, C. L. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 967-974.
- Rosa, L.H.; Cota, B.B.; Machado, K.M.G.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2005. Antifungal compound produced by *Oudemansiella canarii* (Basidiomycota). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 983987
- Rosa, L.H.; Souza-Fagundes, E.M.; Machado, K.M.G.; Alves, T.M.A.; Martins-Filho, A.O.; Romanha, A.J.; Oliveira, R.C.; Rosa, C.A.; Zani, C.L. 2006. Cytotoxic, immunosuppressive

and trypanocidal activities of agrocybin, a polyacetylene produced by *Agrocybe perfecta* (Basidiomycota). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 539-545.

Samson, R.A. Pitt, J.I. 2000. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Singapore, *Harwood Academic Publishers*.

Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18: 382-385.

Strobel, G. Daisy, B. Castillo, U. Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 67: 257-268.

Strobel, G.; Daisy, B. 2003. "Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 491-502.

Sun, R.; Gao, Y. X.; Shen, K.Z.; Xu, Y. B.; Wang, C. R.; Liu, H. Y.; Dong, J. Y. 2010. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. *Phytochemistry Letters*, doi: 10.1016/j.phytol.2010.12.001.

Tan, R.X. Zhou, W.X. 2001. Endophytes: A rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 448-459.

Verma, V.C. Kharmar, R.N. Strobel, G.A. 2009. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Nat. Prod. Commun.*, 4: 1511-1532.

Wang, F.W. Jiao, R.H. Cheng, A.B. Tan, S.H. Song, Y.C. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:79-83.

Zhang, H.W. Song, Y.C. Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* 23: 753-771.

Zhao, J. Shan, T. Mou, Y. Zhou, L. 2011. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 11: 159-168

Zhou, L.H. Sun, Q.S. Qiao, L.C. Liu, J. 2000. Preliminary Studies on the Chemical Constituents in the Active Section of the Leaves of *Quercus variabilis* Blume. *J Shenyang Pharm Univ* 17:179-181.

Anexos 1

Tabela 1 - Identificação morfológica dos isolados fúngicos endofíticos de macaúba e cana-de-açúcar

Código do fungo	Nome do fungo	ORIGEM
DLR 01	<i>Aspergillus</i> sp	
DLR 02	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
DLR 03	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
DLR 04	<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	
DLR 05	<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx	Macaúba
DLR 06	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	
DLR 07	<i>Aspergillus</i> seção <i>Niger</i>	
DLR 08	<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn	
DLR 09	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
DLR 10	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
DLR 11	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
DLR 12	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	
DLR 13	<i>Aspergillus</i> sp	
DLR 14	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	
DLR 15	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	
DLR 16	Só micélio, sem esporulação	Cana-de-açúcar
DLR 17	Só micélio, sem esporulação	
DLR 18	<i>Aspergillus sydowii</i> (Bain. & Start) Thom & Church	
DLR 19	<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	
DLR 20	<i>Aspergillus</i> seção <i>Niger</i>	
DLR 21	<i>Trichoderma</i> sp	
DLR 22	<i>Aspergillus</i> seção <i>Flavi</i>	
DLR 23	<i>Aspergillus</i>	

Tabela 2 - Determinação da atividade antibacteriana dos líquidos metabólitos frente as bactérias patogênicas ao homem.

Líquido metabólito	Bactéria	CIM	CMB
L 02	<i>E. coli</i>	1/8	1/8
	<i>A. baumannii</i>	1/4	1/4

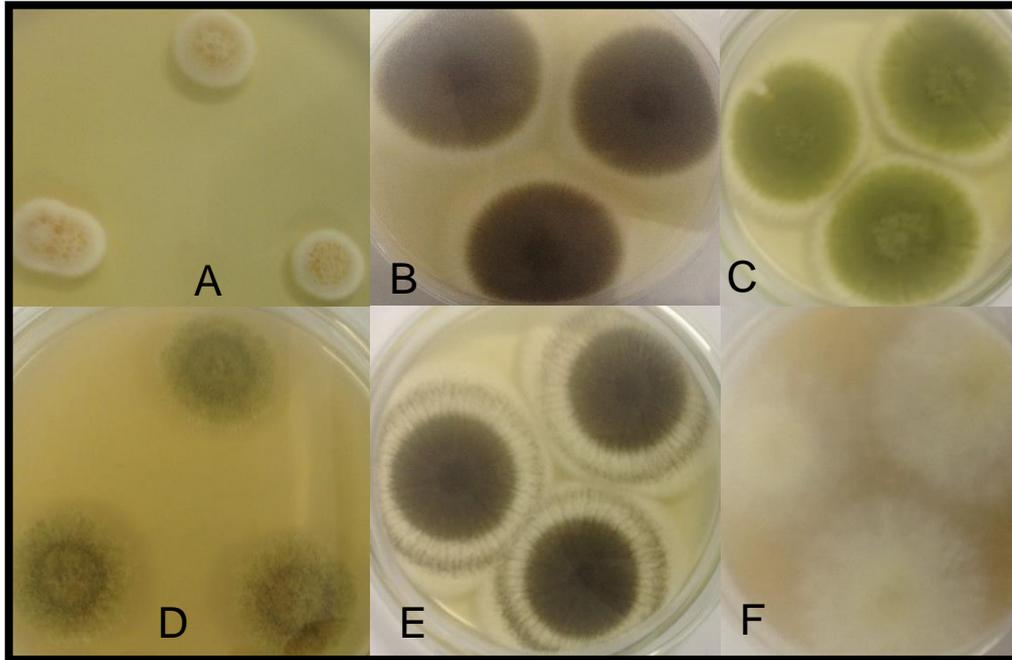
	<i>S. flexneri</i>	1/8	1/8	Legenda:
	<i>K. rhizophila</i>	1/4	1/4	CIM – concentração inibitória mínima.
	<i>S. aureus</i> metilicina resistente	-	-	CMB – concentração mínima bactericida.
	<i>S. aureus</i>	1/2	-	(-) Não houve inibição do crescimento bacteriano.
	<i>S. aureus</i> oxacilina resistente	1/2	1/2	
	<i>K. pneumoniae</i>	1/8	1/4	
	<i>P. aeruginosa</i>	1/8	1/2	
	<i>S. epidermidis</i>	-	-	L – Líquido metabólito
L 12	<i>E. coli</i>	-	-	
	<i>A. baumannii</i>	1/2	1/2	
	<i>S. flexneri</i>	1/2	-	
	<i>K. rhizophila</i>	1/16	1/16	Tabela 3 - Atividade antiproliferativa para formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotóxica dos extratos metabólitos.
	<i>S. aureus</i> metilicina resistente	1/2	-	
	<i>S. aureus</i>	1/8	-	
	<i>S. aureus</i> oxacilina resistente	1/8	-	
	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	
	<i>S. epidermidis</i>	-	-	
L 18	<i>E. coli</i>	1/8	1/8	
	<i>A. baumannii</i>	1/16	1/8	
	<i>S. flexneri</i>	1/8	1/2	
	<i>K. rhizophila</i>	1/4	1/4	
	<i>S. aureus</i> metilicina resistente	1/4	-	
	<i>S. aureus</i>	1/4	1/4	
	<i>S. aureus</i> oxacilina resistente	1/4	1/2	
	<i>K. pneumoniae</i>	1/8	1/8	
	<i>P. aeruginosa</i>	1/16	1/2	
	<i>S. epidermidis</i>	1/2	-	
CÓDIGO	Citotoxicidade	IC50	IC50	

	$\mu\text{g/ml}$ CL _{50%}	epimastigotas tripomastigotas	
		- $\mu\text{g/ml}$ (cepa DM28c)	- $\mu\text{g/ml}$ (Cepa Y)
E 01	17,46	N/D	N/D
E 02	14,53	N/D	N/D
E 03	18,83	N/D	N/D
E 04	14,73	N/D	N/D
E 05	20,64	N/D	-
E 06	6,513	N/D	-
E 07	13,85	N/D	-
E 08	20,59	N/D	-
E 09	39,37	N/D	-
E 10	32,46	N/D	-
E 11	33,08	N/D	-
E 12	31,52	N/D	-
E 13	38,68	N/D	-
E 14	23,80	N/D	-
E 15	27,71	N/D	-
E 16	37,51	N/D	-

N/D = Não determinado. O composto foi testado variando na concentração de 100-0,19 μg , mas não foi capaz de inibir o crescimento parasitário.

E = Extrato metabólico

Figura 1 - Fotos dos fungos endofíticos isolados de macaúba e cana-de-açúcar



A: *Talaromyces purpurogenus*. **B:** *Aspergillus parasiticus* Speare. **C:** *Aspergillus sydowii* (Bain. & Start) Thom & Church. **D:** *Aspergillus seção Flavi*. **E:** *Aspergillus seção Niger*. **F:** Fungo não identificado, apenas micélio.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* possuem uma produção estimada de 1000 tipos de antibióticos, tornando-os de fundamental importância para pesquisa de novos metabólitos potencialmente ativos (BÉRDY, 2005). O gênero *Fusarium* também tem a sua importância sendo considerado uma fonte rica de compostos, com interesse biotecnológico pela produção de novos metabólitos secundários com atividades biológicas diversas (SCHULZ; BOYLE, 2005). O que reforça em nosso experimento a importância desses dois gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* que obtiveram uma excelente atividade bactericida em Gram negativas e Gram positivas, comprovando sua ação antibacteriana.

Os fungos do gênero *Aspergillus* habitam uma variedade de ambientes (PITT; HOCKING, 2009). Partes de vegetais de diferentes espécies de plantas, são habitats onde são comumente encontrados (RODRIGUES; MENEZES, 2002; SOUZA et al., 2004; SOUSA et al., 2013). *A. sydowii* é um endofítico que já foi isolado de *Tinospora cordifolia* (MISHRA et al., 2012), uma planta medicinal comumente utilizada na Índia, sendo comprovada sua ação imunomoduladora, antidiabético, antioxidante, antimicrobiana e anticâncer (SAHA; GHOSH, 2012). Além de ser encontrado também em solo de compostagem (MATKAR et al., 2013). Cactos do Brasil (BEZERRA et al., 2013). E em musgos produzindo derivados de xantonas com atividade imunossupressora (SONG et al., 2013). Chung et al., (2013), com o uso de ferramentas epigenéticas sobre o DNA de *A. sydowii* produziram sesquiterpenóides com atividade antidiabética e anti-inflamatória, sendo responsáveis pelo primeiro isolamento de um metabólito secundário, produzido por microrganismos com essas duas atividades.

O *A. sydowii* é considerado um excelente produtor de xilanases, com tudo, em estudo não foi identificada nenhuma enzima celulolítica (GHOSH et al., 1993). O que reforça nossos achados.

Fusarium spp. foi classificado como endófitos de várias plantas com atividade biológica diversa (DENG et al., 2009; KOUR et al., 1971). Isto sugere a sua ubiquidade como endófitos dentro do reino vegetal e fornece uma oportunidade de descobrir

novos metabolitos bioativos. *Fusarium solani* é um fungo endofítico que é encontrado em diversos tipos de ambientes, principalmente em plantas (SHWETA et al., 2009) podendo a depender da cepa, ser ou não, um fitopatógeno (ARIF et al., 2015). Sendo também um importante patógeno humano (SHORT et al., 2013), e um fitopatógeno de diferentes culturas, como exemplo: batatas (WANG et al., 2015), maracujá (BUENO et al., 2014), soja (COSTA et al., 2016), pimento (SUNDARAMOORTHY et al., 2012), tomate (MOINE et al., 2014), entre outros.

Algumas espécies pertencentes aos gêneros *Fusarium* têm sido amplamente reconhecida como produtores de lipase. *F. solani* é entre os produtores de lipase um dos mais conhecidos. Estudos sobre condições de fermentação para a produção de lipase extracelular de *F. solani* apresentaram variações entre diferentes cepas do fungo (CHANDER; KLOSTERMEYER, 1983). Em estudo realizado por Maia e colaboradores (2001) onde diferentes fontes de carbono foram testadas, para potencializar a produção de lipases, o óleo de gergelim foi o que obteve melhores resultados, frente a: azeite de oliva, óleo de palma de babaçu, óleo de milho e óleo de coco. O que pode ser uma possível explicação ao fato da cepa utilizada no nosso estudo não ser capaz de produzir quantidades significativas de lipases tendo como substrato o Twenn 20, como preconiza o Protocolo de Hankin e Anagnostakis (1975).

As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas nas culturas de importância econômica, principalmente aquelas que ocorrem durante a pós-colheita. Os fungos são os principais causadores de doenças pós-colheita em frutas. *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, contaminam alimentos em climas quentes onde podem produzir aflatoxinas em diferentes momentos, como pré-colheita, processamento, transporte ou armazenamento (SARDIÑAS et al., 2011). *A. parasiticus* é considerado um fungo que causa deterioração em diferentes culturas, de alimentos, como cereais e amêndoas de cajueiro (FREIRE, 2014). Com tudo, o *A. parasiticus* pode ser encontrado associado a plantas, como um endofítico, a exemplo de um estudo realizado por Bezerra e colaboradores (2013), em cactos da Caatinga brasileira. Desta maneira não se tratando apenas de um fungo que lesa o tecido de plantas hospedeiras, mas que ele pode estar associado intimamente com diferentes partes da planta, como em sementes de frutos, sem causar dano aparente.

Além do que, alguns autores sugerem que um fungo endofítico é uma relação resultante de um processo evolutivo, onde planta-patógeno convivem em harmonia, até que de alguma maneira esse equilíbrio planta-fungo se rompe para em benefício ou malefício de uma das partes, resultando no desenvolvimento de doenças na planta (SCHULZ et al., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; BORGES et al., 2009).

De forma geral, os resultados contribuíram para evidenciar importância destes microrganismos como produtores de compostos bioativos com potencial antimicrobiano. Trabalhos futuros devem ser realizados com a finalidade de aperfeiçoar as condições de cultivo para a produção de moléculas bioativas, bem como, realizar a caracterização química dos mesmos e empregá-los diretamente ou como base para a síntese de novos agentes com atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T. ; MARCON, J. ; LIMA, A.O.S. ; SOBRAL, J.K. ; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microorganismos endofíticos**. 2. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2010.167 p.

ARCHER, D. B.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 111: 99-147, 2008.

ARIF, M., ZAIDI, N. W., HAQ, Q. M. R., SINGH, Y. P., TAJ, G., KAR, C. S., & SINGH, U. S.

(2015). Morphological and comparative genomic analyses of pathogenic and non-pathogenic *Fusarium solani* isolated from *Dalbergia sissoo*. **Molecular biology reports**, 42(6), 11071122.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr.; W., PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.3, p. 1 – 36, 2000.

BÉRDY J. 2005. Bioactive microbial metabolites. **J Antibiot.**; 58: 1-26.

BEZERRA, J. D., SANTOS, M. G., BARBOSA, R. N., SVEDESE, V. M., LIMA, D. M., FERNANDES, M. J. S., ... & SOUZA-MOTTA, C. M. (2013). Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis*, 60(2), 53-63.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB. Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains .

Process Biochemistry. 37(5), n. 20, p. 497-503, 2001.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, 506p.

BORGES, W. D. S., BORGES, K. B., BONATO, P. S., SAID, S., & PUPO, M. T.

(2009). Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, 13(12), 1137-1163.

BUENO, C. J., FISCHER, I. H., ROSA, D. D., FIRMINO, A. C., HARAKAVA, R., OLIVEIRA, C. M. G., & FURTADO, E. L. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. **Plant pathology**, 63(2), 382-389.

BULÉON, A. Starch granules: structure and biosynthesis. **Internacional journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 85-112, 1998.

CANNON, R.D.;HOLMES, A.R.;MASON, A.B. AND MONK, B.C. (1995). Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res** 74, 1152-1161

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2003

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v432, p.829-837, 2004.

CLEFF, M. B., LIMA, A. P. D., FARIA, R. O. D., MEINERZ, A. R. M., ANTUNES, T. D. Á., ARAÚJO, F. B. D., ... & MEIRELES, M. C. A. (2005). Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, 36(2), 201-204.

COLLA, L. M., RIZZARDI, J., PINTO, M. H., REINEHR, C. O., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solidstate bioprocess. **Bioresource Technology**, 101, 8308-8314

COLOMBO AL, PERFECT J, DINUBILE M, BARTIZAL K, MOTIL M, HICKS P, et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from na international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2003;22:470-4.

COLOMBO, A. L. & GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, 36: 599-607. 2003.

COSTA, S. S., MATOS, K. S., TESSMANN, D. J., SEIXAS, C. D., & PFENNING, L. H. (2016). *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal biology**, 120(1), 51-60.

COTA, B. B. ; ROSA, L. H. ; CALIGIORNE, R. B. ; RABELLO, A. L. T. ; ROSA, C. A. ; ZANI, CARLOS, L. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, p. 177-182, 2008.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Review**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CUENCA-ESTRELLA M, RODRÍGUEZ D, ALMIRANTE B, MORGAN J, PLANES AM,

ALMEDA M. In vitro susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species to six antifungal agents: results from a population-based active surveillance programme, Barcelona, Spain:

2002-2003. **J Antimicrob Chemother.** 2005;55:194-9.

DESALE, MONALI G.; BODHANKAR, M. G. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Vitex negundo* Linn. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 2, n. 12, p. 389-395, 2013.

DENG BW, LIU KH, CHEN WQ, DING XW, XIE XC, *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol producing fungus from *Taxus chinensis*. **W J Microbiol Biotech.** 2009; 25: 139- 143.

ESPINDOLA, J. W. P.; SILVA, L. O.; SILVA, D. R. C.; COSTA, V. H. N. S.; ALMEIDA, A. F.; MELO, C. M. L.; SOARES, E. C. L.; ARAUJO, J. M.; PEREIRA, V. R. A.; BRONDANI, D. J.

Evaluation of antimicrobial activity and cytotoxicity of aryl-semicarbazones derivatives. **Rev.**

Bras. Farm. 92(3): 171-175, 2011.

FARMER P, FRENK J, KNAUL FM, SHULMAN LN, ALLEYNE G, ARMSTRONG L, ATUN R, BLAYNEY D, CHEN L, FEACHEM R, GOSPODAROWICZ M, GRALOW J, GUPTA S, LANGER A, LOB-LEVYT J, NEAL C, MBEWU A, MIREDD D, PIOT P, REDDY KS, SACHS JD, SARHAN M, SEFFRIN JR 2010.

Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action.

Lancet 376: 1186-1193.

FAUCI, A. S. Infectious Diseases: Considerations for the 21st Century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 675-85, 2001.

FERNANDES, M.R.V.; SILVA, T.A.C.; PFENNING, L.H.; NETO, C.M.C.; 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 of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 677- 686 , 2009.

FERRARA, M. A., Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas.

In: **Revista Fitos**. Rio de Janeiro 73-79, 2006.

FREIRE, F. D. C. O. (2015). DETERIORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMÊNDOAS DE CAJUEIRO: UM PROBLEMA DE DIFÍCIL SOLUÇÃO. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, **15(2)**.

GHOSH, M., DAS, A., MISHRA, A. K., & NANDA, G. (1993). *Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. **Enzyme and microbial technology**, **15(8)**, 703-709.

GLOER, J. B. **Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products**. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (eds.) *The Mycota IV. Environmental and microbial relationship*. 2 ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 2007. Cap. 15, p. 257-286.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** 67:597-607. 1975

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006

H-KITTIKUN, A., KAEWTHONG, W. AND CHEIRSILP, B. (2008) Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized Lipase PS. **Biochem. Eng. J.** 40: 116-120.

HUANG, Z., CAI, X., SHAO, C., SHE, Z., XIA, X., CHEN, Y., ... & LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*, v. 69, n. 7, p. 1604-1608, 2008.

HYDE, K. D., & SOYTONG, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. **Fungal Divers**, 33(163173), 2.

JALGAONWALA, R. E. et al. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.40, p. 2931-2944, 2005

KIM, F.; YOUN, S; SHIN, C. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol-fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of biotechnology**, Elsevier, v. 123, n. 2, p. 174-184, 2006.

KOUR A, SHAWL AS, REHMAN S, SULTAN P, QAZI PH, SUDEN P, KHAJURIA RK, VERMA V, Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **W J Microbiol Biotech**. 2008; 24: 1115-1121.

KUMAR, D., KUMAR, L., NAGAR, S., RAINA, C., PARSHAD, R., GUPTA, V. K. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Archives of Applied Science Research**, 4, 1763-1770.

LARONE, D. (2002) Medically Important Fungi; **A Guide to Identification** Washington, ASM Press.

LASS-FLORL, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. **Mycoses** 52, 197-205.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. and SANT'ANNA JR., G.L.. **Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters**. *Braz. J. Chem. Eng.* [online]. 2002, vol.19, n.2, pp. 175-180.

MADALOZZO, A. D., MARTINI, V. P., KUNIYOSHI, K. K., DE SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., GLOGAUER, A., & KRIEGER, N. (2015). Immobilization of LipC12, a new lipase obtained by metagenomics, and its application in the synthesis of biodiesel esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 116, 45-51.

MARIA, G.L., SRIDHAR, K.R. AND RAVIRAJA, N.S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural Technology** (1) : 67-80. 2005.

MARTINS, M.;HENRIQUES, M.;RIBEIRO, A.P.;FERNANDES, R.;GONCALVES, V.;SEABRA,

A., et al. (2010). Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal.

Rev Iberoam Micol 27, 119-124.

MATKAR, K., CHAPLA, D., DIVECHA, J., NIGHOJKAR, A., & MADAMWAR, D. (2013).

Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 78, 24-33.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; **Ecologia microbiana**, Embrapa-CNPMA: Jaguariúna, 1998, p. 448

MILAGRES, A. M. F.; MAGALHAES, P.O.; FERRAZ, A. Purification and properties of a xylanase from *Ceriporiopsis subvermispora* cultivated on *Pinus taeda*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 253, n.2, p. 267-272, 2005

MISHRA, A., GOND, S. K., KUMAR, A., SHARMA, V. K., VERMA, S. K., KHARWAR, R. N., &

SIEBER, T. N. (2012). Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. **Microbial ecology**, 64(2), 388-398.

MOINE, L. M., LABBÉ, C., LOUIS-SEIZE, G., SEIFERT, K. A., & BÉLANGER, R. R. (2014). Identification and Detection of *Fusarium striatum* as a New Record of Pathogen to Greenhouse Tomato in Northeastern America. **Plant Disease**, 98(3), 292-298.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

OMS adverte sobre doenças resistentes a medicamentos (2010). Disponível em: <http://unicrio.org.br/oms-advertesobre-doencas-resistentes-a-medicamentos/> Acesso em 04 de Janeiro, 2016.

OSÉS, R., VALENZUELA, S., FREER, J., SANFUENTES, E., & RODRIGUEZ, J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. **Fungal Divers**, 33(7).

PARK, ENOCH Y.; SATO, MASAYASU; KOJIMA, SEIJI. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, n. 4, p. 889-896, 2006.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. AND GROUP,

S.P. (2002). Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. **Journal of clinical microbiology** 40, 852-856.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum β lactamase producing Enterobacteriaceae: An emerging publichealth concern. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, p. 159-166, 2008.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and spoliage**. 2 ed. London: Blackie academic and Professional, 2009. 593p

POLETTTO, K. Q.; REIS, C. Suscetibilidade antimicrobiana de uropatógenos em pacientes ambulatoriais na Cidade de Goiânia, GO. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 416-420, 2005.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 9, p. 117-128, 2010.

RODRIGUES, ANTONIA A. C. and MENEZES, MARIA. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. **Fitopatol. bras.** [online]. 2002, vol.27, n.5, pp. 532-537

ROGERO, S. O., HIGA, O. Z., SAIKI, M., CORREA, O. V., & COSTA, I. (2000). Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, 14(6), 497-504.

ROGERO, SIZUE OTA; LUGAO, ADEMAR BENÉVOLO; IKEDA, TAMIKO ICHIKAWA AND CRUZ, ÁUREA SILVEIRA. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** [online]. 2003, vol.6, n.3, pp. 317-320. SAHA, S., & GHOSH, S. (2012). *Tinospora cordifolia*: One plant, many roles. **Ancient Science of Life**, 31(4), 151–159. <http://doi.org/10.4103/0257-7941.107344>

SALAH, R. B., GHAMGHUI, H., MILED, N., MEJDOUB, H., & GARGOURI, Y. (2007). Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, 103(4), 368-372.

SALMOND, G. P.; WELCH, M. Antibiotic resistance: adaptive evolution. **Lancet**, v. 372, p. S97-S103, 2008.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: **Edgard Blücher**, 2001. p. 351-362

SANTOS, M.S.; SOUZA, E.S.; JUNIOR, S.T. & SOUZA, J.V.B. Identification of fungemia agents using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, 43: 712-716. 2010.

SARDIÑAS, N., VÁZQUEZ, C., GIL-SERNA, J., GONZÁLEZ-JAÉN, M. T., & PATIÑO, B.

(2011). Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. **International journal of food microbiology**, 145(1), 121-125.

SCHULZ B E BOYLE C. 2005. The endophytic continuum. **Mycological research**, 109(6): 661-686

SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., RÖMMERT, A. K., & KROHN, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, 106(09), 996-1004.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, n. 65, p. 622–632, 2012.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHORT, D. P., O'DONNELL, K., THRANE, U., NIELSEN, K. F., ZHANG, N., JUBA, J. H., & GEISER, D. M. (2013). Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. **Fungal Genetics and Biology**, 53, 59-70.

SHWETA, S., ZUEHLKE, S., RAMESHA, B. T., PRITI, V., KUMAR, P. M., RAVIKANTH, G., ... & SHAANKER, R. U. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, 71(1), 117-122.

SONG, X. Q., ZHANG, X., HAN, Q. J., LI, X. B., LI, G., LI, R. J., ... & LOU, H. X. (2013). Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the

liverwort *Scapania ciliata* S. Lac and their immunosuppressive activities. **Phytochemistry Letters**, 6(3), 318-321.

SOUSA, K. Â. O., DE ORLANDA, J. F. F., DE ANDRADE BEZERRA, G., & DE SOUSA, T. P. (2013). Estudo do potencial de fungos endofíticos no controle do agente causal da fusariose em tomateiro. **Revista Agroecossistemas**, 5(1), 50-55.

SOUZA, ANTONIA QUEIROZ LIMA de et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.** [online]. 2004, vol.34, n.2, pp. 185-195

SPELLBERG, B.; POWERS, J. H.; BRASS, E. P.; MILLER, L. G.; EDWARDS, J. E. Jr. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1279-86, 2004.

STIERLE A., STROBEL G., STIERLE D., GROTHAUS P., BIGNAMI G. (1995). The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the *Pacific yew*, *Taxus brevifolia*. **J. Nat. Prod.** 58, 1315–1324. doi:10.1021

STROBEL, G.; DAISY, B. “Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products”. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67 (4), 491-502, 2003.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytic and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, p.315-333, 2002.

SUDBERY, P.; GOW, N. AND BERMAN, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends Microbiol** 12, 317-324

SUN, R.; GAO, Y. X.; SHEN, K.Z.; XU, Y. B.; WANG, C. R.; LIU, H. Y.; DONG, J. Y. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry Letters**, doi: 10.1016/j.phytol.2010.12.001, 2010.

SUNDARAMOORTHY, S., RAGUCHANDER, T., RAGUPATHI, N., & SAMIYAPPAN, R.

(2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. **Biological Control**, 60(1), 59-67.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, n. 18, p. 448-459, 2001.

TDR (WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases). (2005) Making Health Research Work for Poor People. Progress 2003–2004. Tropical Disease Research. TDR/GEN/05.1. **World Health Organization**, Geneva.

TRUCCO, A. O.; PRADO, V. J.; DURÁN, C. T. M. Rede de Vigilância de Resistencia Antimicrobiana Pronares. Informe Primer Semestre 2001. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 19, n. 2, p. 140-148, 2002.

TURNER W. B, Fungal metabolite. **Academic Press**, London and New York. 1971

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007. Brakhage, Axel A., and Volker Schroeckh. "Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters." **Fungal Genetics and Biology** 48.1 (2011): 15-22.

VAZ, A.B.M.; MOTA, R.C.; BOMFIM, M.R.Q.; VIEIRA, M.L.A.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.;

ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 1381–1391, 2009.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157167, mar. 2003.

WANG, R. Y., GAO, B., LI, X. H., MA, J., & CHEN, S. L. (2015). First report of *Fusarium solani* causing *Fusarium* root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in China. **Plant Disease**, 99(8), 1180-1180.

WHO. First report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2010.

WILLIAMS, D.W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S. AND LEWIS, M.A. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontol** 2000 55, 250-265.

WORAPONG, J; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; LI, J. Y.; BAIRD, G; HESS, W. M. *Muscodor albus* anam. nov. na endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, v.79, p.67-79, 2011.

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA

Instruções aos Autores

Revisadas em dezembro de 2007

A revista ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS encoraja fortemente as submissões online. Uma vez o artigo preparado de acordo com as instruções abaixo, visite o site de submissão online (<http://aabc.abc.org.br/>).

As instruções devem ser lidas cuidadosamente e seguidas integralmente. Desta forma, a avaliação e publicação de seu artigo poderão ser feitas com mais eficiência e rapidez. Os editores reservam-se o direito de devolver artigos que não estejam de acordo com estas instruções. Os artigos devem ser escritos em inglês claro e conciso.

Objetivo e Política Editorial

Todos os artigos submetidos devem conter pesquisa original e ainda não publicada ou submetida para publicação. O primeiro critério para aceitação é a qualidade científica. O uso excessivo de abreviaturas ou jargões deve ser evitado, e os artigos devem ser compreensíveis para uma audiência tão vasta quanto possível. Atenção especial deve ser dada ao Abstract, Introdução e Discussão, que devem nitidamente chamar a atenção para a novidade e importância dos dados relatados. A não observância desta recomendação poderá resultar em demora na publicação ou na recusa do artigo.

Os textos podem ser publicados como uma revisão, um artigo ou como uma breve comunicação. A revista é trimestral, sendo publicada nos meses de março, junho, setembro e dezembro.

Tipos de Artigos

Revisões: Revisões são publicadas somente a convite. Entretanto, uma revisão pode ser submetida na forma de breve carta ao Editor a qualquer tempo. A carta deve informar os xii

tópicos e autores da revisão proposta e declarar a razão do interesse particular do assunto para a área.

Artigos: Sempre que possível, os artigos devem ser subdivididos nas seguintes partes: 1. Página de rosto; 2. Abstract (escrito em página separada, 200 palavras ou menos, sem

abreviações); 3. Introdução; 4. Materiais e Métodos; 5. Resultados; 6. Discussão; 7. Agradecimentos quando necessário; 8. Resumo e palavras-chave (em português - os autores estrangeiros receberão assistência); 9. Referências. Artigos de algumas áreas, como Ciências Matemáticas, devem observar seu formato usual. Em certos casos pode ser aconselhável omitir a parte (4) e reunir as partes (5) e (6). Onde se aplicar, a parte de Materiais e Métodos deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em humanos ou as normas seguidas para a manutenção e os tratamentos experimentais em animais.

Breves Comunicações: Breves comunicações devem ser enviadas em espaço duplo. Depois da aprovação não serão permitidas alterações no artigo, a fim de que somente correções de erros tipográficos sejam feitas nas provas.

Os autores devem enviar seus artigos somente em versão eletrônica.

Preparo dos Artigos

Os artigos devem ser preparados em espaço duplo. Depois de aceitos nenhuma modificação será realizada, para que nas provas haja somente correção de erros tipográficos.

Tamanho dos artigos: Embora os artigos possam ter o tamanho necessário para a apresentação concisa e discussão dos dados, artigos sucintos e cuidadosamente preparados têm preferência tanto em termos de impacto quando na sua facilidade de leitura.

Tabelas e ilustrações: Somente ilustrações de alta qualidade serão aceitas. Todas as ilustrações serão consideradas como figuras, inclusive desenhos, gráficos, mapas, fotografias e tabelas com mais de 12 colunas ou mais de 24 linhas (máximo de figuras gratuitas: cinco figuras). A localização provável das figuras no artigo deve ser indicada.

Figuras digitalizadas: As figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: 1. Desenhos e ilustrações devem ser em formato .PS/.EPS ou .CDR (Postscript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; 2. Imagens ou figuras em meio tom devem ser no formato .TIF e nunca inseridas no texto; 3. Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; 4. Em princípio, as figuras devem ser submetidas no tamanho em que devem aparecer na revista, i.e., largura de 8 cm (uma coluna) ou 12,6 cm (duas colunas) e com altura máxima para cada figura menor ou igual a 22 cm. As legendas das figuras devem ser enviadas em espaço duplo e em folha separada. Cada dimensão linear das menores letras e símbolos não deve ser menor que 2 mm depois da redução. Somente figuras em preto e

branco serão aceitas. 5. Artigos de Matemática, Física ou Química podem ser digitados em Tex, AMS-Tex ou Latex; 6. Artigos sem fórmulas matemáticas podem ser enviados em .RTF ou em WORD para Windows.

Página de rosto: A página de rosto deve conter os seguintes itens: 1. Título do artigo (o título deve ser curto, específico e informativo); 2. Nome (s) completo (s) do (s) autor (es); 3. Endereço profissional de cada autor; 4. Palavras-chave (4 a 6 palavras, em ordem alfabética); 5. Título abreviado (até 50 letras); 6. Seção da Academia na qual se enquadra o artigo; 7. Indicação do nome, endereço, números de fax, telefone e endereço eletrônico do autor a quem deve ser endereçada toda correspondência e prova do artigo.

Agradecimentos: Devem ser inseridos no final do texto. Agradecimentos pessoais devem preceder os agradecimentos a instituições ou agências. Notas de rodapé devem ser evitadas; quando necessário, devem ser numeradas. Agradecimentos a auxílios ou bolsas, assim como agradecimentos à colaboração de colegas, bem como menção à origem de um artigo (e.g. teses) devem ser indicados nesta seção.

Abreviaturas: As abreviaturas devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto no caso de abreviaturas padrão e oficial. Unidades e seus símbolos devem estar de acordo com os aprovados pela ABNT ou pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Referências: Os autores são responsáveis pela exatidão das referências. Artigos publicados e aceitos para publicação (no prelo) podem ser incluídos. Comunicações pessoais devem ser autorizadas por escrito pelas pessoas envolvidas. Referências a teses, abstracts de reuniões, simpósios (não publicados em revistas indexadas) e artigos em preparo ou submetidos mas ainda não aceitos, podem ser citados no texto como (Smith et al. unpublished data) e não devem ser incluídos na lista de referências.

As referências devem ser citadas no texto como, por exemplo, (Smith 2004), (Smith and Wesson 2005) ou, para três ou mais autores, (Smith et al. 2006). Dois ou mais artigos do mesmo autor no mesmo ano devem ser distinguidos por letras, e.g. (Smith 2004a), (Smith 2004b) etc. Artigos com três ou mais autores com o mesmo primeiro autor e ano de publicação também devem ser distinguidos por letras.

As referências devem ser listadas em ordem alfabética do primeiro autor sempre na ordem do sobrenome XY no qual X e Y são as iniciais. Se houver mais de 10 autores, use o primeiro seguido de et al. As referências devem ter o nome do artigo. Os nomes das revistas devem

ser abreviados. Para as abreviações corretas, consultar a listagem de base de dados na qual a revista é indexada ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviatura para os Anais da Academia Brasileira de Ciências é An Acad Bras Cienc. Os seguintes exemplos são considerados como guia geral para as referências.

Artigos

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A . 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R and Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Livros e capítulos de livro

Davies M. 1947. An outline of the development of Science, Athinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT . 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: National Cancer Conference , 5., Philadelphia Proceedings, Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W and Burke EAJ . 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2 nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody RW . 1974. Studies of theoretical circular dichroism of Polipeptides: contributions of B-turns. In: Blouts ER et al . (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

Outras publicações

International Kimberlite Conference , 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings ... Rio de Janeiro: CPRM, 1994., 495 p.

Siatycki J . 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 19985, 55 p. Preprint n. 600.