



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA DE LAGARTO**

RAISSA MARIANE DE SOUZA RIBEIRO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE
EXTRATOS ORGÂNICOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *HUMIRIANTHERA AMPLA***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LAGARTO, SERGIPE

Março, 2018.

RAISSA MARIANE DE SOUZA RIBEIRO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *HUMIRIANTHERA AMPLA***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Farmácia do Campus de Lagarto da
Universidade Federal de Sergipe, como requisito para
obtenção do diploma de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Natália Nogueira Saraiva

LAGARTO, SERGIPE

Março, 2018.

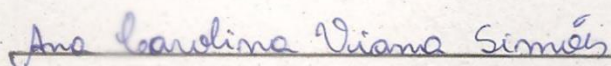
RAISSA MARIANE DE SOUZA RIBEIRO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *HUMIRIANTHERA AMPLA***

Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Universidade Federal de
Sergipe Campus de Lagarto, como requisito parcial para
obtenção do diploma de bacharel em Farmácia.

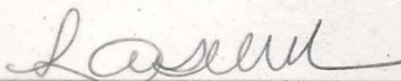
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Natália Nogueira Saraiva

Aprovado em: 01 / 03 /2018



Profa. Ms. Ana Carolina Viana Simões

Universidade Federal de Sergipe
(EXAMINADORA 1)



Profa. Dr^a. Luciana Pereira Lobato

Universidade Federal de Sergipe
(EXAMINADORA 2)

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pelo dom da vida e por me presentear com mais essa conquista.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado, por serem sempre presentes tornando essa jornada mais fácil de ser percorrida durante esses anos.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Natália Nogueira Saraiva, não apenas pela confiança e apoio, mas pelo conhecimento científico/micológico, amizade, respeito e presença constante durante esses dois anos e meio de pesquisa.

Aos professores Dr^a. Luciana Pereira Lobato e Dr. Rafael Ciro Marques pelo apoio e contribuições para a realização desse trabalho.

Aos companheiros do grupo de pesquisa Júlia, Reinan, Vitória, Giovana e em especial ao Lucas por todo o apoio e contribuição para execução desse trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para tornar esse sonho possível meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS ORGÂNICOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *HUMIRIANTHERA AMPLA*

Raissa Mariane de Souza Ribeiro, Lagarto, 2018.

Na procura por novas moléculas para a criação e descoberta de novas drogas, os recursos naturais derivados de fungos, em especial os endofíticos, têm se tornado uma fonte promissora de compostos bioativos. O potencial de extratos e substâncias puras obtidos por fungos endofíticos vem sendo explorado por mais de duas décadas, apresentando, dentre algumas atividades, a antifúngica. Esse atributo terapêutico pode ser explicado pela existência de inúmeras substâncias químicas com diversas estruturas complexas e incomuns obtidas a partir da fermentação fúngica. Desse modo, o presente trabalho realizou bioensaios de atividade antifúngica de extratos orgânicos produzidos a partir de isolados fúngicos de *Humiranthera ampla*, bem como a análise do perfil cromatográfico desses extratos. O fungo B4-1A foi cultivado em diferentes meios de cultura (batata-dextrose - BD, sabouraud dextrose – SBD, extrato de carne e peptona – MEP e o meio sólido de Arroz) durante 22 dias. Os extratos orgânicos foram obtidos por diferentes métodos de extração: maceração, ultrassom, maceração combinado com ultrassom e partição líquido-líquido. Após obtenção dos extratos eles foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e testados frente *Candida albicans* pelo método de difusão em ágar. Após obtenção das massas dos extratos do cultivo da cepa B4-1A, foi possível obter mais massa de extrato no crescimento fúngico no meio líquido SBD e extração a partir do método de maceração combinado com ultrassom. Para o meio de Arroz esse mesmo método foi o que forneceu maior massa de extrato também. Com relação ao meio MEP a cepa B4-1A não foi capaz de se desenvolver neste meio. Os perfis cromatográficos dos extratos dos meios BD, SBD e Arroz apresentaram-se como promissores ao isolamento de metabólitos secundários. Os extratos obtidos da partição líquido-líquido dos meios SBD e BD da cepa B4-1A foram capazes de inibir o crescimento da *Candida albicans*. Para as estirpes fúngicas B4-3L e B4-2N, obtidas pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, foram descobertos três e quatro extratos respectivamente de cada uma das cepas com atividade antifúngica positiva.

Palavras-chave: compostos bioativos; métodos de extração; *Candida albicans*.

ABSTRACT

STUDY OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF ORGANIC EXTRACTS OF ENOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *HUMIRIANTHERA AMPLA*

Raissa Mariane de Souza Ribeiro, Lagarto, 2018.

In the search for new molecules for the creation and discovery of new drugs, natural resources derived from fungi, especially the endophytic, have become a promising source of bioactive compounds. The potential of extracts and pure substances obtained by endophytic fungi has been explored for more than two decades, presenting, among some activities, the antifungal. This therapeutic attribute can be explained by the existence of numerous chemical substances with several complex and unusual structures obtained from the fungal fermentation. Thus, the present work carried out bioassays of antifungal activity of organic extracts produced from fungal isolates of *Humirianthera* as well as the analysis of the chromatographic profile of these extracts. B4-1A fungus was cultured in different culture media (potato-dextrose-BD, sabouraud dextrose-SBD, meat extract and peptone-MEP and the solid medium of Rice) for 22 days. The organic extracts were obtained by different methods of extraction: maceration, ultrasound, combined maceration with ultrasound and liquid-liquid partition. After obtaining the extracts they were analyzed by analytical thin layer chromatography (TCL) and tested against *Candida albicans* by the agar diffusion method. After extracting the masses from the culture extracts of strain B4-1A, it was possible to obtain more mass of extract in the fungal growth in the SBD liquid medium and extraction from the combined maceration method with ultrasound. For Rice medium this same method was the one that provided the largest mass of extract as well. Regarding the MEP medium the strain B4-1A was not able to develop in this medium. The chromatographic profiles of the extracts of BD, SBD and Rice media presented as promising the isolation of secondary metabolites. The extracts obtained from the liquid-liquid partition of the SBD and BD media of strain B4-1A were able to inhibit the growth of *Candida albicans*. For the fungal strains B4-3L and B4-2N, obtained by the research group of the Federal University of Sergipe, three and four extracts were respectively found of each of the strains with positive antifungal activity.

Keywords: bioactive compounds; extraction methods; *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Colonização pelo fungo endofítico <i>Trichoderma</i> sp em sementes de ervilha.	14
Figura 2: A: Fungo endofítico <i>Taxomyces andreanea</i> , B: Estrutura química do paclitaxel e C: Medicamento Taxol®	16
Figura 3: Estruturas químicas de metabólitos secundários descobertos por Hewage <i>et al</i> (2014) a partir de alterações no meio de cultivo de fungos endofíticos. calbistrina F (1), calbistrina G (2) e dotideominona A (3).....	17
Figura 4: Estruturas químicas dos metabólitos secundários wortmannilactona I1 (4), I2 (5) e I3 (6).	18
Figura 5: Estruturas químicas dos metabólitos secundários fusarielina J (7), fusarielina K (8) e fusarielina L (9).....	19
Figura 6: A – Candidíase oral, B – Candidíase no palato mole, C – Candidíase axilar.....	22
Figura 7: <i>Candida albicans</i> . Microscopia da colônia. Pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios.	22
Figura 8: Estruturas químicas dos antifúngicos fluconazol (10), anfotericina B (11), caspofungina (12), flucitosina (13), griseofulvina (14)	24
Figura 9: Estruturas químicas dos metabólitos secundários criptocina (15) e jesterona (11)	25
Figura 10: Estruturas químicas dos metabólitos secundários sidonol (17) e metoxisidonol (18)	25
Figura 11: Estruturas químicas dos metabólitos secundários micorrizina A (19), citocina E (20), citocina K (21) e radicinina (22)	26
Figura 12: Estruturas químicas dos metabólitos secundários (+)-1 (23) e (+)-2 (24).	26
Figura 13: Estruturas químicas dos compostos isolados de <i>Humirianthera ampla</i>	27
Figura 14: Representação esquemática da separação do micélio obtido após 22 dias de cultivo.	31
Figura 15: Representação esquemática da preparação dos discos de papel filtro estéreis	33
Figura 16: Representação esquemática da realização do teste de atividade antifúngica pelo método de difusão em ágar.....	34
Figura 17: Cromatogramas dos diferentes extratos. A, B, C e D – Com revelação no UV, E, F, G e H com revelação em vanilina. 1 – batata-dextrose (BD) ultrassom, 2 – sabourad-dextrose (SBD) ultrassom, 3 – Arroz ultrassom, 4 – batata-dextrose (BD) maceração, 5 – sabourad-dextrose (SBD) maceração, 6 – Arroz maceração, 7 – batata-dextrose (BD) maceração mais ultrassom, 8 – sabourad-dextrose (SBD) maceração mais ultrassom, 9 – Arroz maceração mais ultrassom, 10 – batata-dextrose (BD) meio líquido, 11 - sabourad-dextrose (SBD) meio líquido.....	40
Figura 18: Halos de inibição gerados pelos diferentes extratos orgânicos obtidos pela fermentação do B4-1A em diferentes meios de cultura e métodos de extração. 1 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido, 2 – batata-dextrose (BD) meio líquido.....	45
Figura 19: Halos de inibição gerados pelos diferentes extratos orgânicos obtidos pela fermentação do B4-3L em diferentes meios de cultura e métodos de extração. 1 – batata-dextrose (BD) meio líquido 2 – batata-dextrose (BD) maceração mais ultrassom, 3 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido.	48
Figura 20: Halos de inibição gerados pelos diferentes extratos orgânicos obtidos pela fermentação do B4-2N em diferentes meios de cultura e métodos de extração. 1 – Arroz (ultrassom), 2 – Arroz (maceração), 3 – Arroz (maceração mais ultrassom), 4 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Halos de inibição em milímetros da <i>C. albicans</i> pelos extratos orgânicos obtidos pelo crescimento do fungo B4-1A em diferentes meios de cultura e obtidos por diferentes métodos de extração.	43
Tabela 2: Halos de inibição (mm) da <i>C. albicans</i> pelos extratos orgânicos obtidos pelo crescimento do fungo B4-3L em diferentes meios de cultura e obtidos por diferentes métodos de extração.	46
Tabela 3: Média das triplicatas dos halos de inibição em milímetros da <i>C. albicans</i> pelos extratos orgânicos obtidos pelo crescimento do fungo B4-2N em diferentes meios de cultura e obtidos por diferentes métodos de extração.	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Massas de extratos obtidas a partir da partição líquido-líquido dos caldos de crescimento dos meios sabourad-dextrose (SBD) e batata-dextrose (BD).	36
Gráfico 2: Massas dos extratos obtidas a partir dos métodos de extração maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U) a partir dos micélios obtidos a partir do meios sabourad-dextrose (SBD) e batata-dextrose(BD). Letras diferentes representam extratos diferentes ($p < 0,05$).....	37
Gráfico 3: Massas dos extratos levando em consideração apenas os métodos de extração maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U). Letras diferentes representam extratos diferentes ($p < 0,05$).	38
Gráfico 4: Massas de extratos levando em consideração apenas os meios de cultivo sabourad-dextrose (SBD) e batata-dextrose (BD). Letras diferentes representam extratos diferentes ($p < 0,05$)	38
Gráfico 5: Massas obtidas dos métodos de extração maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U) obtidos do meio sólido de Arroz.	39

LISTA DE SIGLAS

AcOEt – Acetato de Etila

BD – Meio de Cultura Batata-Dextrose-Caldo

BDA – Meio de Cultura Batata-Dextrose-Ágar

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

M – Maceração

M + U – Maceração combinado com ultrassom

MEP – Extrato de Carne e Peptona – Caldo

MeOH – Metanol

OSMAC – One Strain, Many Compounds (uma cepa, muitos compostos)

SBD – Meio de Cultura Sabourad-Dextrose-Caldo

SBDA – Meio de Cultura Sabourad-Dextrose-Ágar

U – Ultrassom

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS	14
2.2 DIVERSIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	16
2.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	20
2.4 O GÊNERO <i>CANDIDA</i>	21
2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS DISPONÍVEIS.....	23
2.6 COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	25
2.7 <i>HUMIRIANTHERA AMPLA</i>	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS	29
4.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	29
4.3 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	30
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS	30
4.4.1 MACERAÇÃO	31
4.4.2 ULTRASSOM.....	31
4.4.3 MACERAÇÃO COMBINADO COM ULTRASSOM	31
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	32
4.5.1 PREPARAÇÃO DOS DISCOS	32
4.5.2 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	33
4.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PLANAR.....	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MASSAS DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-1A.....	35
5.2 ANÁLISE EM CCDA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS DO FUNGO B4-1A.....	40
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	43
5.3.1 EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-1A	43

5.3.2 EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-3L.....	46
5.3.3 EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-2N	49
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A natureza, por séculos tem sido uma imensa fonte de produtos naturais que possuem a capacidade de mudar e conservar a vida. O Brasil, por ser o detentor de uma imensa diversidade de espécies vegetais, animais e de microrganismos, torna-se um campo promissor para a descoberta de metabólitos secundários essenciais para o desenvolvimento de novas drogas (GUO, 2016; SEABROOKS & HU, 2017).

Os fungos, por apresentarem uma vasta biodiversidade, se tornam um grupo significativamente favorável para o descobrimento e criação de novos fármacos. Por seus metabólitos serem diversos em termos de estruturas e funções, esses microrganismos são capazes de produzir uma ampla gama de compostos naturais bioativos (SYNYTSYA *et al.*, 2016).

Dentre os fungos, os endofíticos ganham destaque por serem microrganismos que habitam os tecidos internos ou partes superficiais das plantas sem lhes causarem efeitos nocivos. Essa relação endossimbiótica é benéfica para ambas as partes. Enquanto o fungo recebe proteção e nutrição, a planta se torna tolerante ao estresse ambiental. Desenvolvendo-se nesse ambiente, os fungos endofíticos são capazes de produzir diversas substâncias bioativas (LIU; GREENSLADE; YANG, 2016; INDRIANINGSIH & TACHIBANA, 2017).

Muitos extratos, sejam eles fúngicos ou vegetais, são testados visando o combate às cepas fúngicas, principalmente daquelas que mais frequentemente causam infecções. Entre essas a mais comum é a *Candida albicans*, um microrganismo saprófito e oportunista que pode colonizar diversos nichos do hospedeiro (intestino, vagina, mucosa oral e pele). Infecções por *C. albicans* são muito frequentes, seja em âmbito hospitalar ou comunitário e sua presença na microbiota natural humana é um fator que está intimamente relacionado com a ocorrência de infecções (DANTAS *et al.*, 2016).

A necessidade da obtenção de novas drogas se torna mais evidente a cada dia, tendo em vista o crescimento da resistência microbiana aos medicamentos já existentes no mercado, tornando a ocorrência de infecções mais frequentes, perigosas e difíceis de serem combatidas. Dessa forma, a realização de pesquisas se torna crescente almejando

drogas mais eficientes e sem tantos efeitos tóxicos. Considerando o potencial dos fungos endofíticos para a produção e aquisição de novos metabólitos, que podem exibir diversas atividades biológicas, o presente estudo tem o objetivo de investigar o potencial antifúngico de extratos orgânicos obtidos pela fermentação de fungos endofíticos isolados de *Humirianthera ampla*, para assim contribuir na descoberta de novas substâncias bioativas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Conforme a etimologia da palavra, endofítico tem origem do grego (éndon + phytón) e significa dentro da planta (Figura 1). O primeiro a descrever o termo endofítico foi Barry em 1866, como qualquer organismo existente no interior dos tecidos de uma planta. Entretanto, essa definição incluía todos os fungos inclusive aqueles patogênicos, então em 1991 Petrini caracterizou os fungos endofíticos, como microrganismos capazes de habitar os tecidos internos das plantas, em alguma fase do seu ciclo de vida, sem lhes causarem danos aparentes (SILVA, 2009).

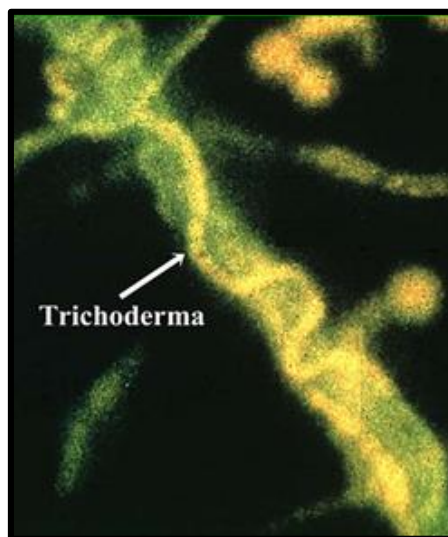


Figura 1: Colonização pelo fungo endofítico *Trichoderma* sp em sementes de ervilha (SARAIWA, 2009).

Os fungos endofíticos são microrganismos que na grande maioria das vezes não causam efeitos nocivos a sua planta hospedeira. No entanto, alguns desses fungos, após um longo período vivendo junto com seu hospedeiro, podem provocar sintomas de doenças, sugerindo assim que eles eram uma forma latente de um patógeno (FERNANDES *et al.*, 2015).

Esses microrganismos endófitos podem estar presentes em algas, musgos, líquens, angiospermas, coníferas e habitar todos os órgãos e tecidos das plantas, estando assim distribuídos entre várias estruturas sejam elas folhas, hastes, rebentos, ramos ou raízes. A sua propagação pode ocorrer de diversas formas: por transmissão vertical através de sementes ou transmissão horizontal por meio de esporos e pela colonização de folhas. Apesar da vasta presença desses fungos em diferentes ambientes, apenas uma pequena porcentagem de 6% a 7% foram identificadas (BORGES, 2008; FERNANDES *et al.*, 2015; INDRIANINGSIH & TACHIBANA, 2017).

As comunidades endofíticas são capazes de garantir ao seu hospedeiro uma maior tolerância a estresses bióticos e abióticos, como escassez de água, contaminação do solo e salinidade. Beneficiando a planta de diferentes maneiras, uma vez que promove o crescimento e germinação através da produção de metabólitos secundários bioativos (ZHENG *et al.*, 2016).

Em determinadas plantas podem existir mais de 100 espécies de fungos associados em apenas um tecido que podem coexistir com outros tipos de endofíticos como as bactérias. Obviamente, um certo endofítico interage direta ou indiretamente com outros endofíticos presentes na planta e tais interações podem exercer um papel crucial para o início da produção de metabólitos por fungos ou bactérias (BORGES, 2008; KUSARI *et al.*, 2012).

De acordo com a hipótese do antagonismo equilibrado, um endofítico consegue se desenvolver no interior de seu hospedeiro sem provocar alterações perceptíveis ao evitar a ativação de suas defesas, tal ação garante ao endofítico resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro. Essa hipótese sugere que a colonização assintomática ocorre devido ao equilíbrio de antagonismos entre o endofítico e o hospedeiro. Dessa forma, se os mecanismos de proteção da planta são proporcionais à virulência do fungo, essa união será assintomática e não causará prejuízos ao hospedeiro. No entanto, se a planta cede à virulência fúngica, tal acontecimento ocasionará uma doença, em contrapartida se as defesas da planta conseguem combater a virulência então o fungo morrerá (KUSARI *et al.*, 2012).

Inúmeros estudos demonstraram que esses fungos são capazes de gerar compostos semelhantes aos metabólitos secundários produzidos por seu hospedeiro. Tornando-se, assim, uma nova maneira de produzir compostos naturais bioativos. Isso desperta bastante

interesse da comunidade científica em relação a essa interação mútua entre fungos endofíticos e seu hospedeiro (GASONG & TJANDRAWINATA, 2015).

Os fungos endofíticos ganharam destaque e foram reconhecidos como fonte de novos compostos bioativos, quando o primeiro medicamento contra o câncer, o Taxol® foi obtido a partir da relação do fungo endofítico *Taxomyces andreanea* e sua planta hospedeira *Taxus brevifolia* (BORGES, 2008). (Figura 2).

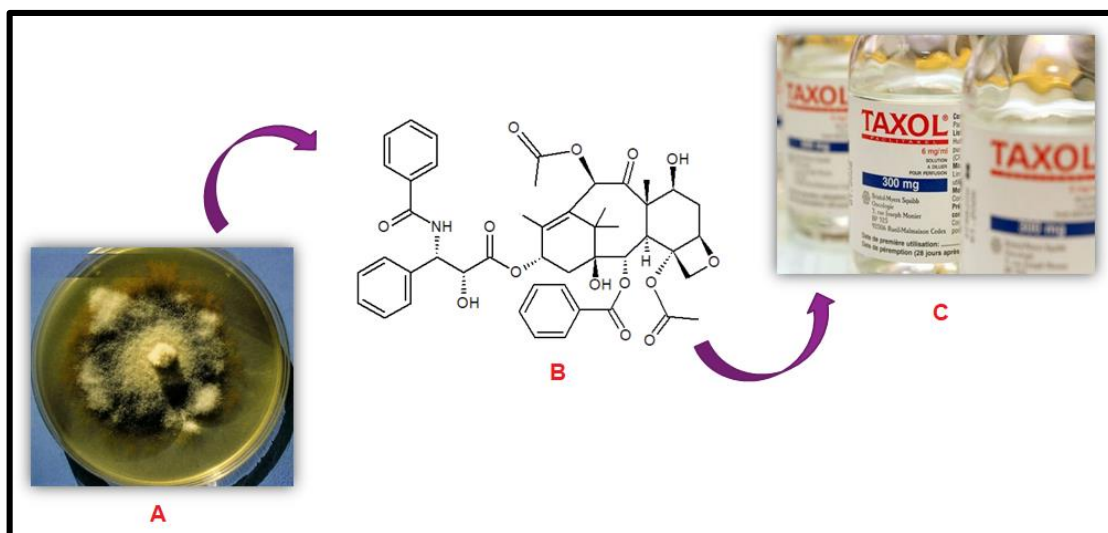


Figura 2: A: Fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, B: Estrutura química do paclitaxel e C: Medicamento Taxol®. (STROBEL, 2009; DRUGDISCOVERY, 2017).

2.2 DIVERSIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Na pesquisa e descoberta de novas drogas, os fungos endofíticos têm se tornado uma fonte promissora de metabólitos secundários, principalmente pela aptidão em produzir compostos capazes de atuar fora do habitat dos fungos, sendo utilizados como agentes antioxidantes, antitumoral, antiparasitário e antiviral (TAKAHASHI *et al.*, 2013).

Almejando aumentar a diversidade de metabólitos produzidos por fungos endofíticos tem sido utilizados alguns recursos como modificações genéticas, alterações em meios de cultura, pH, temperatura, disponibilidade de luz e entre outros. Além de aumentar a variedade de metabólitos secundários, a manipulação nas condições de cultivo de microrganismos é uma estratégia utilizada pela indústria farmacêutica para aumentar o rendimento desses compostos, estratégia essa conhecida como OSMAC (uma cepa,

muitos compostos). Isso é de grande relevância já que os fungos dispõem de mecanismos tanto para a regulação de metabolismo, quanto para a biossíntese de metabólitos, garantindo, assim, que precursores de energia sejam apenas utilizados em ambientes onde a geração de metabólitos é vantajosa (ELIAS *et al.*, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado por Hewage *et al.* (2014) com o objetivo de gerar novos metabólitos através do fungo *Dothideomycete* sp, este foi cultivado nos meios líquidos de batata-dextrose e meio de malte Czapek. Foi observado que a produção de metabólitos pelo fungo dependia não apenas dos meios de cultura serem diferentes, mas também das fontes de batata e malte utilizados, gerando, assim, diferentes compostos de acordo com cada situação proposta para o fungo, metabólitos calbistrina F (1) e calbistrina G (2), ambas isoladas do meio de malte e dotideominona A (3) isolada do meio de batata-dextrose (Figura 3).

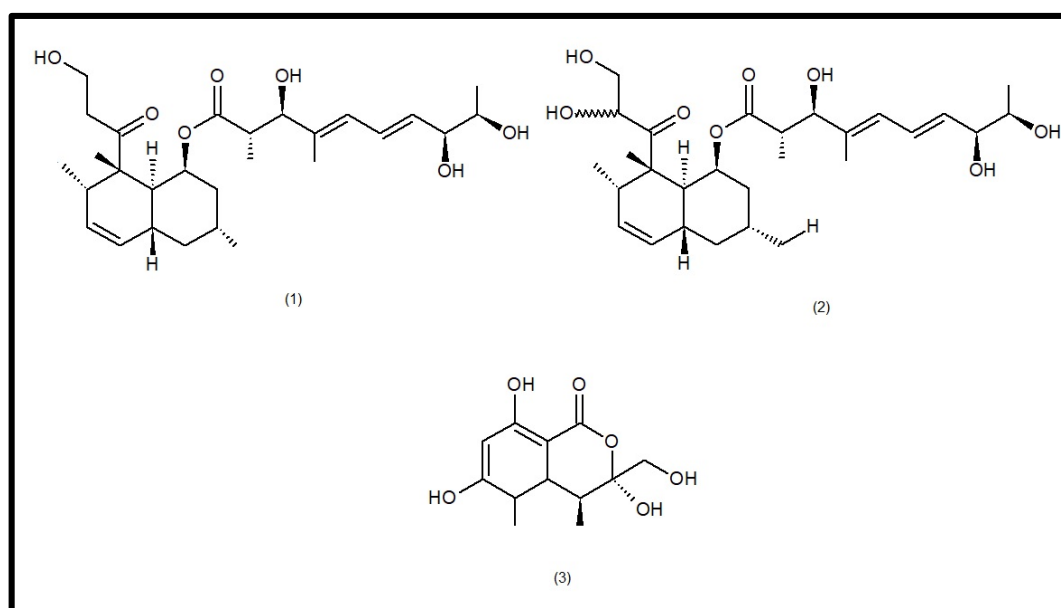


Figura 3: Estruturas químicas de metabólitos secundários descobertos por Hewage *et al* (2014) a partir de alterações no meio de cultivo de fungos endofíticos. calbistrina F (1), calbistrina G (2) e dotideominona A (3). Fonte: Próprio autor.

Liu e colaboradores (2016) demonstraram, através de um experimento, que ao cultivar o fungo *Talaromyces wortmannii* em três diferentes meios de cultura (ágar arroz-dextrose, ágá milho-dextrose e ágá farelo de trigo-dextrose) ele foi capaz de gerar um composto diferente para cada meio de cultivo utilizado. As substâncias wortmannilactona I1 (4) isolada do meio ágá milho-dextrose, I2 (5) isolada do meio ágá farelo de trigo-

dextrose e I3 (6) isolada do meio ágar arroz-dextrose, apresentaram atividade anti-helmíntica (Figura 4).

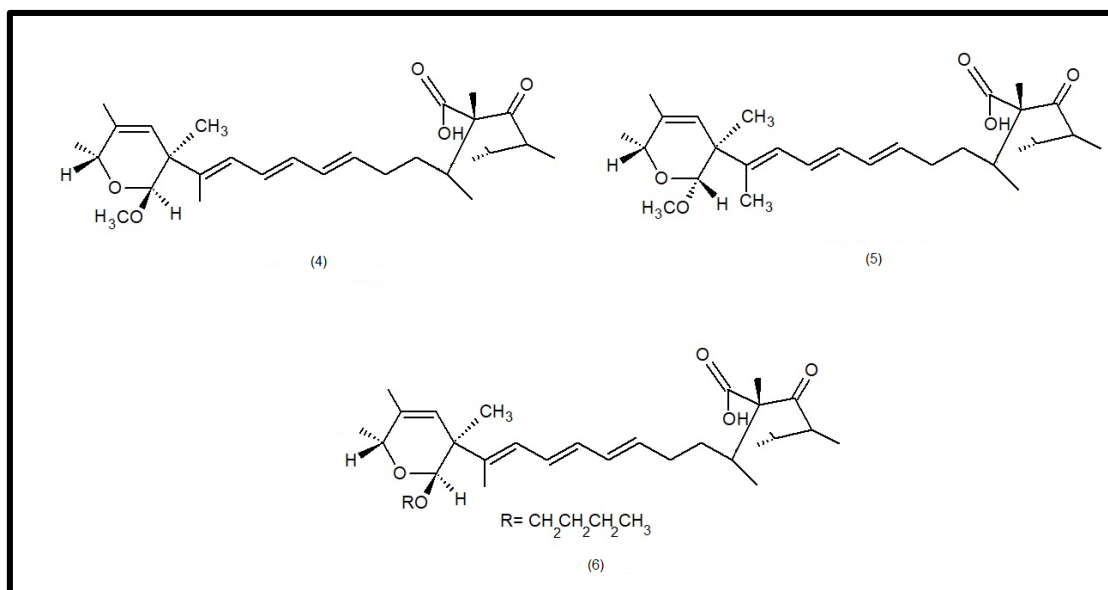


Figura 4: Estruturas químicas dos metabólitos secundários wortmannilactona I1 (4), I2 (5) e I3 (6).
Fonte: Próprio autor.

Foi observado por Hemphill *et al.* (2017), que cultivaram o fungo *Fusarium tricinctum* em meio sólido de arroz acrescido de sumo de frutas e vegetais, que a modificação no meio de cultura proporcionou um aumento de até 80 vezes na acumulação do novo produto natural o fusarielina J (7), bem como a descoberta também do fusarielina K (8) e fusarielina L (9) todos isolados do meio sólido de arroz acrescido de sumo de frutas. Apenas o composto fusarielina J (7) apresentou atividade citotóxica (Figura 5, p. 19).

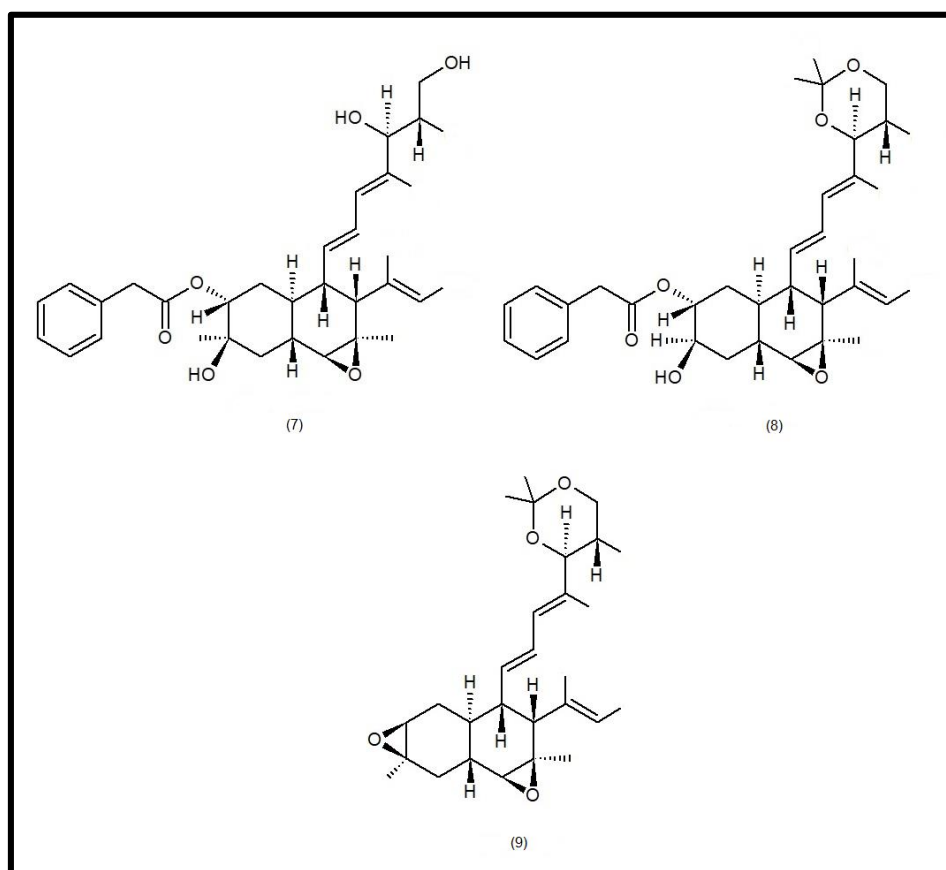


Figura 5: Estruturas químicas dos metabólitos secundários fusarielina J (7), fusarielina K (8) e fusarielina L (9). Fonte: Próprio autor.

Carvalho *et al* (2013) realizaram um estudo onde o fungo *Moniliophthora perniciosa* foi cultivado em quatro diferentes meios de cultura líquidos: caldo mineral, caldo de batata, caldo de batata-dextrose e caldo V8 produzido a partir de vegetais macerados. Eles perceberam que ao acrescentar nesses meios fontes de carbono como galactose, glicose, frutose e extrato de cacau o fungo produzia e secretava de forma mais eficiente poligalacturonases, enzimas que decompõe a pectina.

2.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As infecções fúngicas tornam-se a cada dia um crescente desafio na saúde pública mundial. O restrito número de antifúngicos autorizados para uso e a resistência das cepas às opções de tratamento dificultam ainda mais a resolução desse problema (MOHAMMAD *et al.*, 2017).

O aumento de infecções invasivas causadas por patógenos oportunistas como a *Candida albicans* tem se tornado cada vez mais frequentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou em tratamentos prolongados com antibióticos e quimioterápicos. Com o aumento dessa população, em especial aqueles pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), cresce também a frequência dessas infecções, tendo como a mais recorrente a candidíase oral seguida da candidíase vulvovaginal (DAVID, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Um estudo realizado na França, durante dez anos demonstrou que a incidência global de candidemias foi de 2,5 por 100.000 habitantes por ano, entretanto de 2001 a 2010 ocorreu um aumento de 1,9 para 3,6 (ANTINORI *et al.*, 2016).

A candidemia tem sido responsável por uma mortalidade de 15% a 30% em adultos e 10% a 15% em neonatos, e cada caso tem custos de hospitalização aproximados em 130.000 reais. A falta de tratamento, atraso no início da terapia antifúngica ou ainda uso de medicamentos inadequados ou ineficazes são fatores que contribuem para o aumento da taxa de mortalidade. Sendo assim, o empenho para reduzir essas situações ajudaria significativamente no decréscimo na mortalidade ocasionada pelas candidemias (GUINEA, 2014).

Um dado interessante, é que a maior incidência de candidíase invasiva ocorre em homens seja em crianças menores de um ano ou adultos com mais de sessenta e cinco anos de idade, aproximadamente 16 e 36 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Apesar das infecções por *Candida* sp poderem ser causadas por várias espécies, a *C. albicans* ainda é a maior produtora dessas infecções (QUINDÓS, 2013).

O desequilíbrio entre parasita e hospedeiro proporciona aos fungos um ambiente propício ao seu crescimento. Dessa forma, pesquisas para a descoberta de novos

antifúngicos e/ou para tornar mais eficiente a ação de drogas já no mercado estão em ascensão. No entanto, são diversos os obstáculos farmacocinéticos enfrentados até a fase final de produção de um medicamento como, absorção gastrointestinal, metabolismo e eliminação (DAVID, 2013; NETT & ANDES, 2015).

2.4 O GÊNERO *CANDIDA*

O gênero fúngico *Candida* engloba diversas espécies que colonizam inúmeros hospedeiros, estando presentes como microrganismos comensais ou patógenos. As estirpes de *Candida* são as principais responsáveis pela ocorrência de infecções fúngicas, dentre essas uma das mais predominantes é a *C. albicans* (WHIBLEY & GAFFEN, 2015).

Microrganismos comensais podem tornar-se patogênicos quando ocorrem variações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de algumas barreiras anatômicas através de queimaduras ou procedimentos médicos invasivos (BARBEDO & SGARBI, 2010).

A *C. albicans* é um integrante natural da microflora humana que pode habitar pele e mucosas. No entanto, na presença de fatores predisponíveis como antibioticoterapia prolongada, quimioterapia ou imunodeficiência, é capaz de provocar infecções nas mucosas e sistêmicas (SUCHODOLSKI; KUBIS; KRASOWSKA, 2017).

As infecções ocasionadas por *Candida* são conhecidas como candidíases ou candidoses. A maior parte dessas infecções surge em áreas de dobras cutâneas como axilas, regiões submamárias e interdigitais (figura 6, p. 23). Essas infecções oportunistas são bastante frequentes no sangue, trato urinário e em ambiente hospitalar como as zonas cirúrgicas. Tal fato decorre, sobretudo, pela onipresença de espécies de *Candida*, assim como a expansão de indivíduos com fatores de risco para o progresso de infecções (JÚNIOR *et al.*, 2010; FERREIRA, 2016).



Figura 6: A – Candidíase oral, B – Candidíase no palato mole, C – Candidíase axilar. Fonte: FORUMSAUDE, 2013.

A capacidade patogênica da *Candida* é proveniente de características como aptidão para prosperar a 37 °C, dispor de estruturas filamentosas com mais de 200 µm de comprimento (figura 7), tornando um empecilho à fagocitose, a geração de determinados metabólitos que podem provocar até algumas manifestações alérgicas, produção de enzimas, aderência e alterações fenotípicas (TOZZO & GRAZZIOTIN, 2012).



Figura 7: *Candida albicans*. Microscopia da colônia. Pseudo-hifas, blastoconídios e clamidoconídios. (OLIVEIRA, 2014).

2.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS DISPONÍVEIS

A intensidade das infecções fúngicas podem variar desde irritações menores, como a do pé de atleta, a infecções sistêmicas que são mais graves (MINIYAR *et al.*, 2013). A resistência aos antifúngicos pode ser classificada de duas formas: primária, quando ocorre devido a uma característica típica da espécie resultado da seleção de cepas naturalmente menos suscetíveis, o que pode ser notado em algumas espécies de *Candida* aos antifúngicos azóis; ou secundária, quando decorre da obtenção de mecanismos de evasão (MILANEZI, 2016).

São diversos os artifícios utilizados pelos fungos para a aquisição da resistência às drogas empregadas nos tratamentos. Podemos citar a formação de biofilmes, presente em leveduras, modificação do alvo da droga e redução da captação do fármaco. Outro aspecto interessante observado em várias espécies é a sua capacidade de plasticidade gênica, sendo capaz de alterar a sua morfologia e selecionar métodos de resistência com a duplicação de porções cromossômicas que contém o alvo da droga (MILANEZI, 2016).

Entre os principais mecanismos de resistência de *C. albicans* a múltiplas drogas estão, a redução do acúmulo de fármaco intracelular e a utilização de enzimas alvo alteradas, o que amplia consideravelmente a frequência do número de falhas dos tratamentos. A tática habitual para enfrentar a resistência a várias drogas é aumentar a dosagem ou encontrar outra droga alternativa. No entanto, o desenvolvimento da resistência cresce em uma agilidade muito maior que a descoberta e criação de novos antifúngicos, causando um processo vicioso para o crescente aumento da resistência (CASTRO *et al.*, 2006; TONG *et al.*, 2016).

Lamentavelmente, apenas um pequeno número de registro de antifúngicos efetivos estão disponíveis comercialmente para o combate a candidíase: os azóis, como o fluconazol (10); os polienos, como a anfotericina B (11); equinocandinas, como a caspofungina (12); análogos de pirimidina, como a flucitosina (13); e a griseofulvina (14) (TONG *et al.*, 2016) (Figura 8, p. 24).

A anfotericina B é considerada a droga padrão ouro para o tratamento da maior parte das infecções fúngicas. No entanto, devido a sua toxicidade sistêmica e local seu uso é limitado, sendo a disfunção renal o principal efeito tóxico que ocorre em grande parte dos pacientes. Porém, tal complicação normalmente é reversível quando cessada a terapia (CASTRO *et al.*, 2006; TONG *et al.*, 2016).

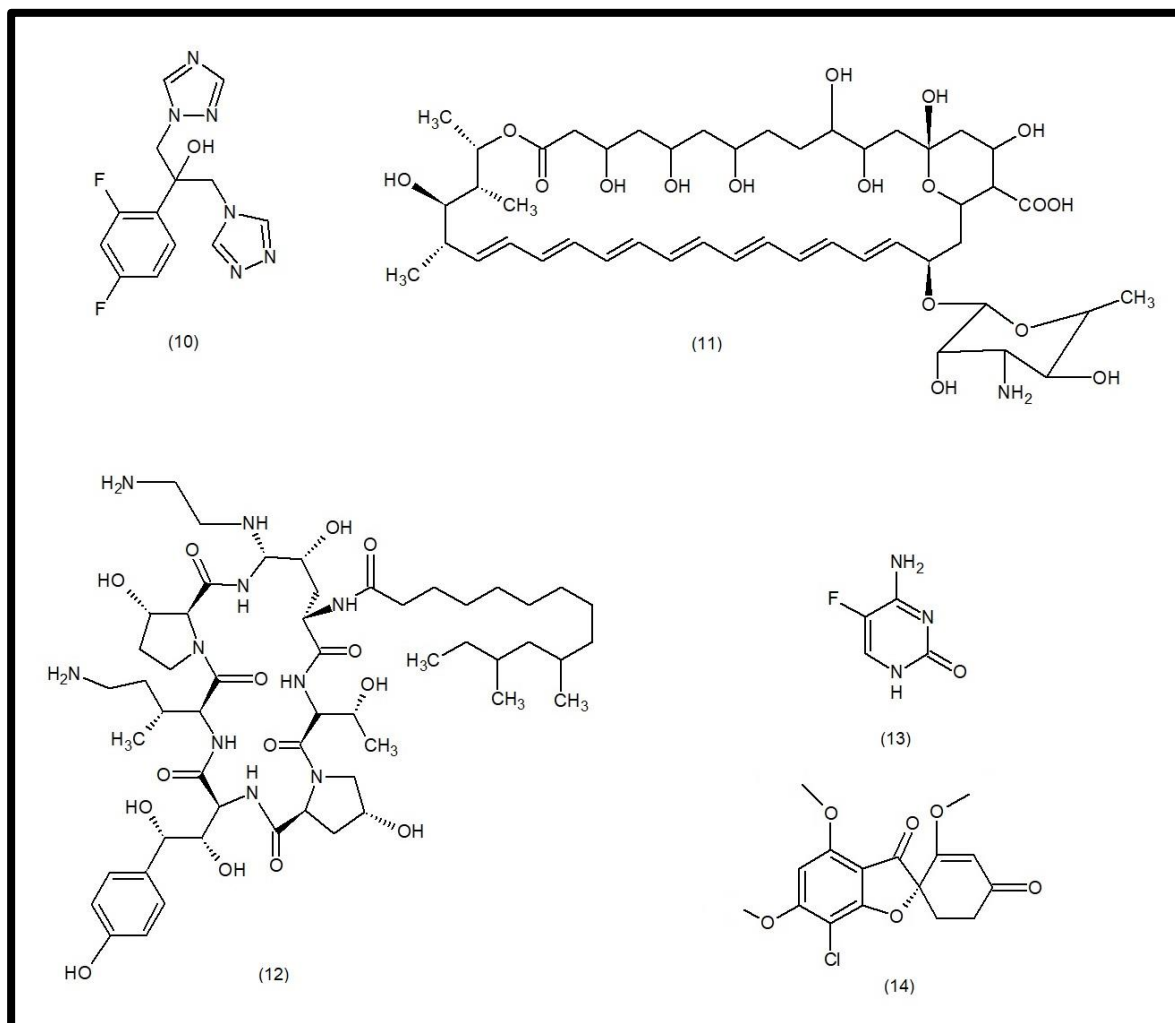


Figura 8: Estruturas químicas dos antifúngicos fluconazol (10), anfotericina B (11), caspofungina (12), flucitosina (13), griseofulvina (14). Fonte: Próprio autor.

Dessa forma, se torna evidente a necessidade de novos antifúngicos potentes, seguros e seletivos para que se possa ter um tratamento eficaz contra doenças fúngicas. Haja vista, que a maior parte dos antifúngicos utilizados não são totalmente efetivos devido à crescente resistência, a toxicidade causada no hospedeiro e efeitos colaterais indesejáveis o que restringem seu uso na prática clínica (CAMPOY & ADRIIO, 2016).

2.6 COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Na literatura podemos encontrar inúmeros antifúngicos isolados de fungos endofíticos como a criptocina (15) isolada do fungo *Cryptosporiopsis quercina*, presente na casca do caule de *Tripterygium wilfordii* e a jesterona (16) isolada do fungo *Pestalotiopsis jesteri*, encontrado em *Fragaea bodenii* (CANUTO *et al.*, 2012). (Figura 9).

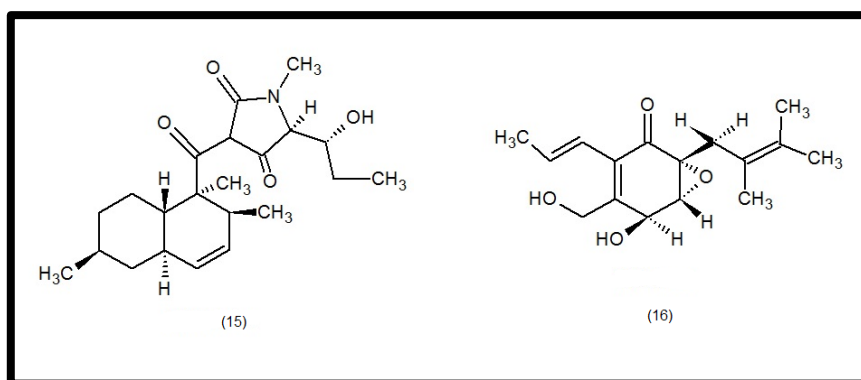


Figura 9: Estruturas químicas dos metabólitos secundários criptocina (15) e jesterona (11). Fonte: Próprio autor.

Mc Mullin, Green e Miller (2015) identificaram o sidonol (17) e metoxisidonol (18) que exibiram significativa atividade antifúngica que foram isoladas do fungo *Lophodermium nitens* encontrado na árvore *Pinus strobus* (pinho branco) (Figura 10).

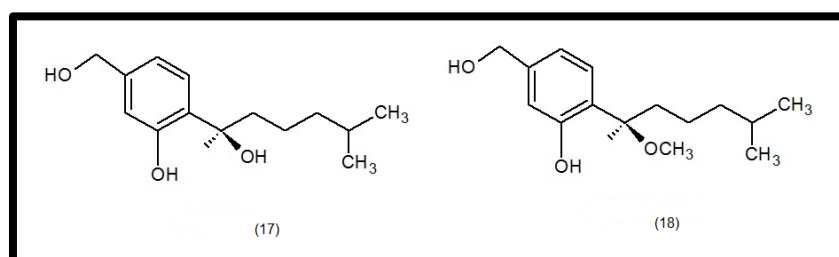


Figura 10: Estruturas químicas dos metabólitos secundários sidonol (17) e metoxisidonol (18). Fonte: Próprio autor.

Em um estudo realizado com o objetivo de identificar constituintes ativos de extratos dos fungos endofíticos *Plectrophomella* sp., *Physalospora* sp. e *Crataegus monogyna* foi possível isolar quatro compostos micorrizina A (19), citocina E (20), citocina K (21) e radicinina (22), todos eles exibiram atividade antimicótica e antibacteriana (HUSSAIN *et al*, 2014). (Figura 11).

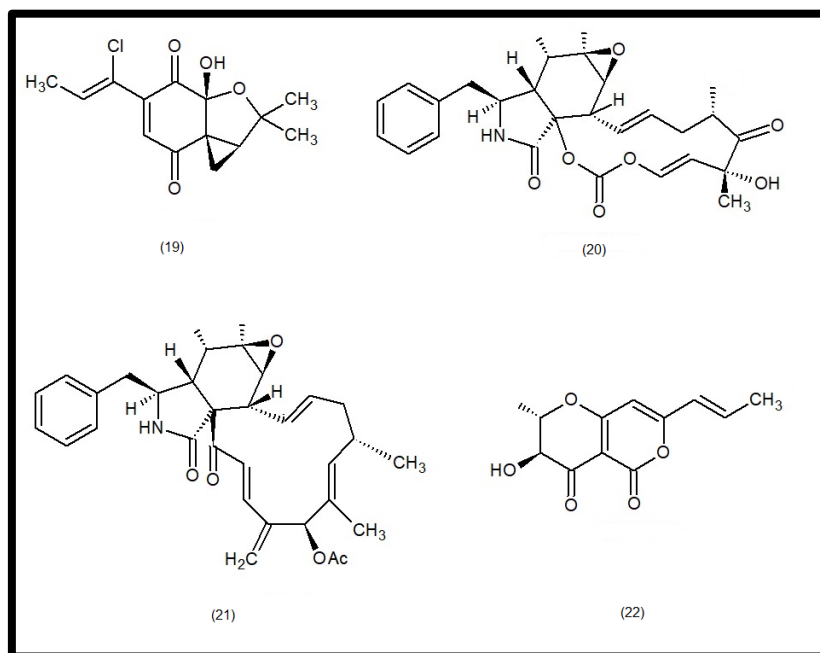


Figura 11: Estruturas químicas dos metabólitos secundários micorrizina A (19), citocina E (20), citocina K (21) e radicinina (22). Fonte: Próprio autor.

Wang e colaboradores (2014) conseguiram isolar do fungo endofítico *Alternaria alternata*, obtido a partir dos ramos frescos de *Camellia sinensis* nove compostos dos quais dois exibiram forte atividade contra a *C. albicans*, identificados como (+)-1 (23) e (+)-2 (24) (Figura 12).

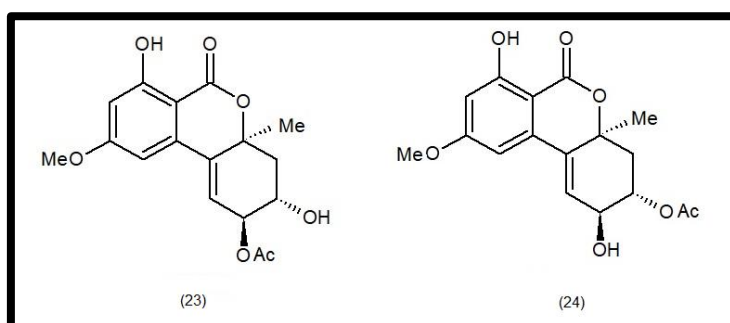


Figura 12: Estruturas químicas dos metabólitos secundários (+)-1 (23) e (+)-2 (24). Fonte: Próprio autor.

2.7 HUMIRIANTHERA AMPLA

A *Humirianthera ampla* é uma planta predominante da Amazônia pertencente à família das Icacinaceas conhecida popularmente por “surucuína” ou “surucucuína”. O extrato etanólico preparado a partir de suas raízes é utilizado por comunidades rurais da Amazônia como antiofídico (STRAUCH *et al.*, 2012).

Poucos compostos foram isolados da planta *Humirianthera ampla*, dentre eles encontram-se o annonalida (25), humirianthol (26), e o acrenol (27) isolados por Graebner *et al* (2000). Um desses compostos isolados o humirianthol (25) apresentou atividade antifúngica contra a *C. albicans* (Figura 13).

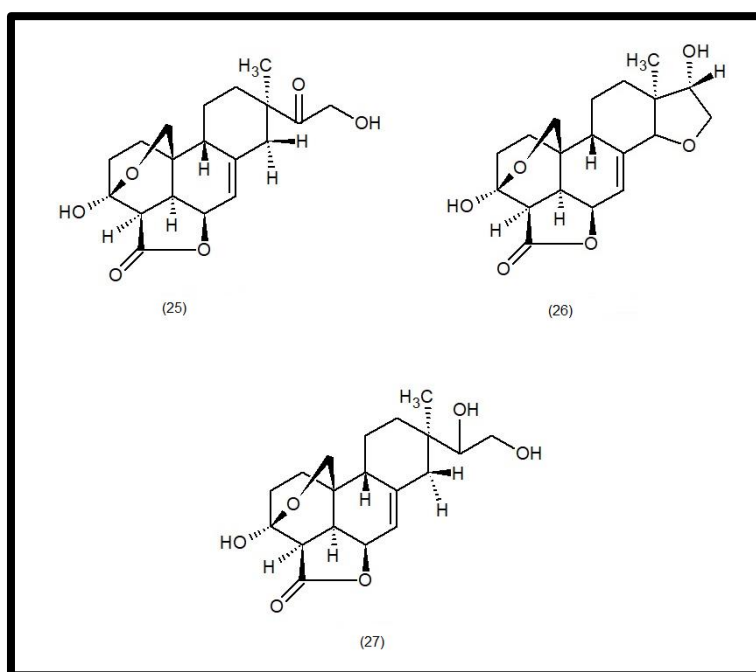


Figura 13: Estruturas químicas dos compostos isolados de *Humirianthera ampla*.
Fonte: Próprio autor.

Atualmente não existem muitos estudos referentes a planta *Humirianthera ampla*, ou pesquisas sobre isolamento e atividade biológica de suas substâncias, bem como estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos oriundos de fungos endofíticos isolados dessa planta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antifúngico de extratos orgânicos obtidos pela fermentação de fungos endofíticos isolados de *Humirianthera ampla*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar o fungo B4-1A em diferentes meios: batata-dextrose (BD), extrato de carne e peptona (MEP), sabourad-dextrose (SBD) e meio sólido de Arroz;
- Obter extratos orgânicos por diferentes métodos de extração (maceração, ultrassom, maceração combinado com ultrassom e partição líquido-líquido) a partir do crescimento do fungo B4-1A em diferentes meios;
- Analisar o perfil cromatográfico dos extratos orgânicos obtidos pela fermentação do fungo B4-1A por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA);
- Avaliar o potencial antifúngico dos extratos obtidos pela fermentação dos fungos B4-1A, B4-3L e B4-2N pelo método de difusão em ágar.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS

Os fungos endofíticos utilizados no trabalho foram obtidos a partir de uma parceria com a Universidade Federal do Ceará, onde foi realizado o isolamento desses microrganismos a partir do rizoma da planta *Humirianthera ampla* coletada no estado do Acre.

Inicialmente, os fungos foram incubados em meio de cultura semissólido BDA (batata-dextrose-ágar) por 7 dias e em seguida preservados em óleo mineral para evitar a desidratação. As culturas fúngicas assim preservadas serviram de matrizes para todos os estudos realizados nesse trabalho (SARAIVA, 2009).

Neste trabalho, foram utilizadas três cepas fúngicas B4-1A, B4-3L e B4-2N. No entanto, apenas a cepa B4-1 foi cultivada de acordo com a metodologia a ser descrita. Os extratos das outras duas cepas utilizados neste estudo, foram obtidos através do grupo de pesquisa do laboratório de farmácia da Universidade Federal de Sergipe.

4.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

O fungo endofítico B4-1A foi cultivado utilizando diferentes meios de cultura. Para este experimento foram utilizados os meios de cultura líquidos: batata-dextrose (BD), extrato de carne e peptona (MEP), sabouraud-dextrose (SBD) e o meio sólido de arroz (SARAIVA, 2009).

O crescimento do fungo ocorreu em 10 frascos de Erlenmeyers para cada meio de cultura líquido (BD, MEP e SBD), contendo em cada, 50 mL de caldo dos meios, onde esses foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos, esses meios líquidos foram preparados conforme o rótulo do fabricante (Kasvi). Para o meio de arroz, foram pesados 25 g para cada frasco de Erlenmeyer e adicionados 21 mL de água destilada. Os frascos foram

autoclavados, inicialmente por 40 minutos, depois retirados da autoclave para serem agitados, e retornados à autoclave por mais 15 minutos (SARAIVA, 2009).

4.3 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Previamente, o fungo foi colocado para crescer durante 7 dias em meio semissólido ágar sabourad (SBA). Após o período de crescimento, com o auxílio de uma pipeta de vidro, os micélios do fungo foram cortados em pequenos discos de aproximadamente 6 mm de diâmetro. Posteriormente, com uma alça de inoculação, foi transferido um disco para cada frasco de Erlenmeyer com os respectivos meios de culturas esterilizados para crescer durante um período de 22 dias (SARAIVA, 2009).

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

Após 22 dias de cultivo, o micélio crescido nos meios líquidos foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo (figura 14, p. 31). O micélio foi extraído por três diferentes processos de extração: maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M+U). O meio líquido foi submetido a uma partição líquido-líquido três vezes com 25 mL de acetato de etila (AcOEt). Para o meio de arroz não foi realizada a partição líquido-líquido, por ser um meio sólido e não dispor de caldo. Dessa forma, foram utilizados para esse meio apenas os processos de maceração, ultrassom e maceração combinado com ultrassom.

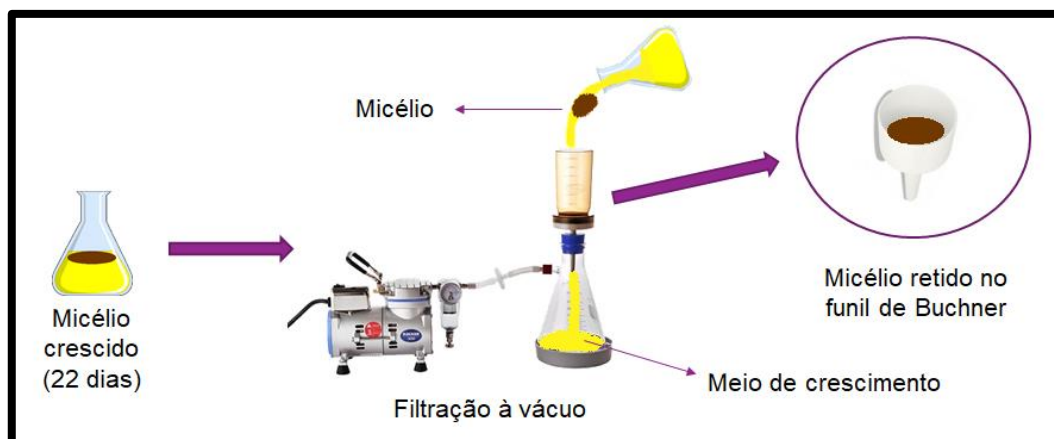


Figura 14: Representação esquemática da separação do micélio obtido após 22 dias de cultivo. Fonte: Próprio autor.

4.4.1 MACERAÇÃO

Os micélios foram expostos a uma mistura binária de 20 mL de acetato de etila/metanol na proporção 1:1 (AcOEt/MeOH 1:1) e deixados em repouso. O solvente foi trocado de dois em dois dias. A maceração ocorreu duas vezes após a primeira exposição. Em seguida foi utilizado o evaporador rotativo para obtenção dos extratos secos (SARAIVA, 2009).

4.4.2 ULTRASSOM

Os micélios foram expostos a uma mistura binária de 20 mL AcOEt/MeOH 1:1 e em seguida colocados no ultrassom durante 30 minutos a 25 °C e frequência de 25 kHz. Logo após, foi utilizado o evaporador rotativo para obtenção dos extratos secos (SIMÕES *et al.*, 2000).

4.4.3 MACERAÇÃO COMBINADO COM ULTRASSOM

Os micélios foram expostos inicialmente a um pré-tratamento (maceração) devido a composição da parede celular fúngica (quitina) ser mais resistente quando comparada a

parede celular de uma planta (celulose) por exemplo, dessa forma, aplicando esse pré-tratamento é possível desestabilizar a parede fúngica e poder extrair os metabólitos do interior dessas células. Esse pré-tratamento foi realizado utilizando uma mistura binária de 20 mL AcOEt/MeOH 1:1 que ficou em repouso por dois dias. Após esse período, o solvente foi trocado e os micélios foram colocados no ultrassom durante 30 minutos a 25 °C a uma frequência de 25 kHz e que posteriormente permaneceram em maceração novamente, onde o solvente foi trocado de dois em dois dias. A remaceração ocorreu duas vezes após a primeira exposição. Seguidamente, foi utilizado o evaporador rotativo para obtenção dos extratos secos (SARAIVA, 2009).

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada frente a cepa *Candida albicans* (ATCC 10231). A levedura foi cultivada e mantida em meio SBA por 48 horas a 35 °C. A partir das colônias crescidas, foi realizada uma suspensão em caldo sabourad dextrose e incubada por 24 horas a 35 °C. Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada de modo a se obter uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (COCKERILL *et al.*, 2012) (Figura 16, p. 35).

4.5.1 PREPARAÇÃO DOS DISCOS

Para a confecção dos discos, foram utilizadas folhas de papel filtro cortadas com o auxílio de um perfurador de papel. Em seguida, os discos foram autoclavados em frasco hermeticamente fechado. Após a esterilização, os discos foram transferidos com o auxílio de uma pinça estéril para uma placa de Petri previamente esterilizada e com assistência de uma micropipeta automática as soluções de cada extrato anteriormente preparadas foram impregnadas em cada disco. Esses discos, permaneceram em repouso de 2 a 3 minutos até secagem (COCKERILL *et al.*, 2012) (Figura 15, p. 33).



Figura 15: Representação esquemática da preparação dos discos de papel filtro estéreis. Fonte: Próprio autor.

4.5.2 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

A atividade antifúngica dos extratos foi determinada através do método de difusão em ágar, utilizando discos de papel filtro estéril com aproximadamente 6 mm de diâmetro. A cultura recentemente preparada com sua densidade celular ajustada foi inoculada na superfície das placas de Petri com ágar sabourad. Os discos previamente embebidos com as soluções dos extratos e completamente secos, foram distribuídos na superfície do ágar. Cada disco possuía 5 μL (0,1 mg/mL) de solução de cada extrato na concentração de 20 mg/mL. Para o controle positivo foi utilizado discos impregnados com nistatina (20 mg/mL) e como controle negativo foram utilizados discos previamente embebidos com 5 μL de metanol, ambos os discos de controle foram secos a temperatura ambiente antes de serem colocados na superfície do ágar. (COCKERILL *et al.*, 2012) (Figura 16, p. 34).

As placas com os testes foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Os dados foram analisados medindo-se os halos de inibição em volta de cada disco com o auxílio de um paquímetro (COCKERILL *et al.*, 2012) (Figura 16, p. 34).

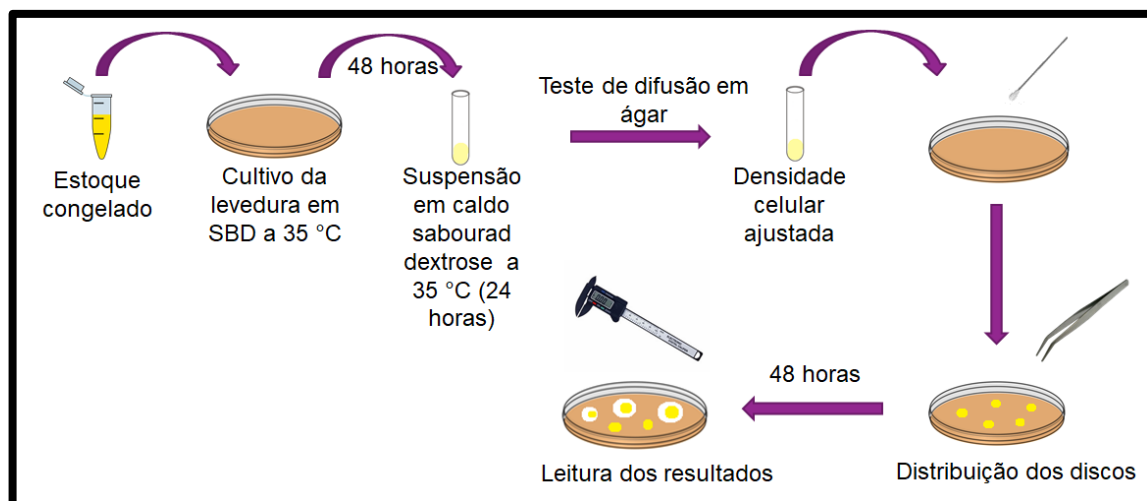


Figura 16: Representação esquemática da realização do teste de atividade antifúngica pelo método de difusão em ágar. Fonte: Próprio autor.

4.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PLANAR

A análise cromatográfica em camada delgada analítica (CCDA) foi realizada sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F254 – Merck (espessura de 0,2 mm).

A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light, no comprimento de onda de 365 nm e imersão com solução de vanilina (SARAIVA, 2009).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de triplicatas (média $\pm$ desvio padrão). Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$) aplicando-se ANOVA, seguidos de comparações múltiplas de média pelo teste de Tukey e foi utilizado o Teste T quando se comparam apenas duas amostras. Todas as análises foram realizadas usando o programa STATISTICA 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MASSAS DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-1A

A análise estatística das massas dos extratos orgânicos obtidas a partir dos diferentes meios e métodos de extração, foi dividida em três observações: massas dos extratos obtidos por partição líquida dos caldos de crescimento (BD e SBD); massas dos extratos obtidas por diferentes métodos de extração (maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U) a partir do micélio crescido em meios de cultivo líquidos (BD, SBD e MEP); e massas de extratos obtidos a partir de métodos de extração diferentes (M, U e M + U) a partir do crescimento fúngico no meio sólido de Arroz. Essa divisão levou em consideração a diferença na mudança da matriz de extração dos metabólitos secundários (micélio e caldo de crescimento) e os tipos de meios utilizados no experimento (meio líquido e meio sólido).

Após o cultivo da cepa fúngica B4-1A nos diferentes meios de cultura propostos (BD, SBD, MEP e Arroz) foi possível realizar algumas constatações. A primeira observação foi o não crescimento do fungo no meio MEP. Isso pode ser justificado por ele ser o meio menos nutritivo entre os testados e a cepa, possivelmente, necessitar de um meio mais rico para a sua fermentação.

Quando foram comparadas as massas dos extratos obtidos pela partição líquido-líquido dos caldos separados do micélio, percebeu-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre esses dois meios (BD e SBD) como pode se observar no gráfico 1 (p. 36). Esse resultado pode ser esperado já que ambos os meios são ricos em nutrientes e facilitam o crescimento fúngico. O meio BD por conter principalmente amido, sendo utilizado pelo fungo como fonte de carboidrato e o SBD por conter especialmente peptonas que são fontes de nitrogênio e favorecem o crescimento fúngico. Essa análise foi realizada separadamente, pois para essa extração, tem-se uma matriz diferente, que no caso foi o caldo de crescimento fúngico e não o micélio. Martins e colaboradores (2013) também demonstraram em um experimento que avaliava a viabilidade celular de fermentos biológicos através do cultivo em diferentes meios

(sabouraud-dextrose, batata-dextrose e Yeast Moulds) que não houve diferença estatisticamente significativa entre esses meios SBD e BD.

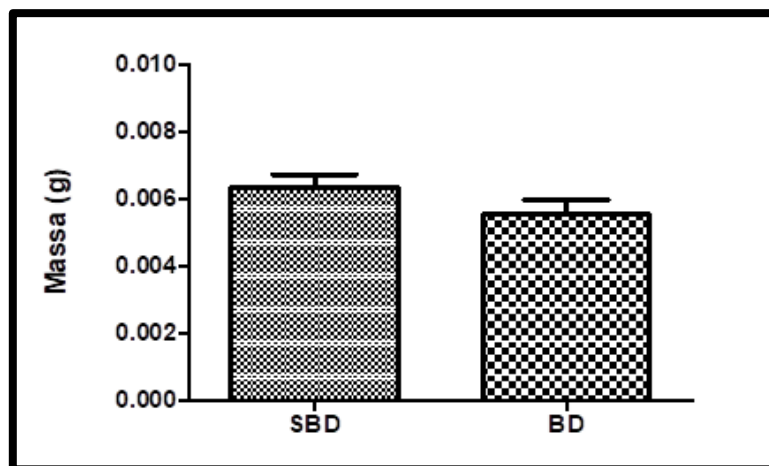


Gráfico 1: Massas de extratos obtidas a partir da partição líquido-líquido dos caldos de crescimento dos meios sabourad-dextrose (SBD) e batata-dextrose (BD).
Fonte: Próprio autor.

A partir da análise do gráfico 2 (p.37), foi possível observar diferenças estatisticamente significativas quando se variou o meio (BD e SBD) e o método de extração na obtenção das massas dos extratos oriundos dos micélios, o que reafirma a importância da otimização na produção de extratos orgânicos. Nesse gráfico (2), observa-se que todos os extratos, exceto aqueles oriundos do meio SBD (maceração) e BD (maceração), são diferentes entre si. Esse resultado está de acordo com princípio da OSMAC onde a diversificação das condições de cultivo para o crescimento fúngico tem um papel crucial na formação do micélio e consequentemente produção de metabólitos secundários (TAKAHASHI *et al.*, 2013).

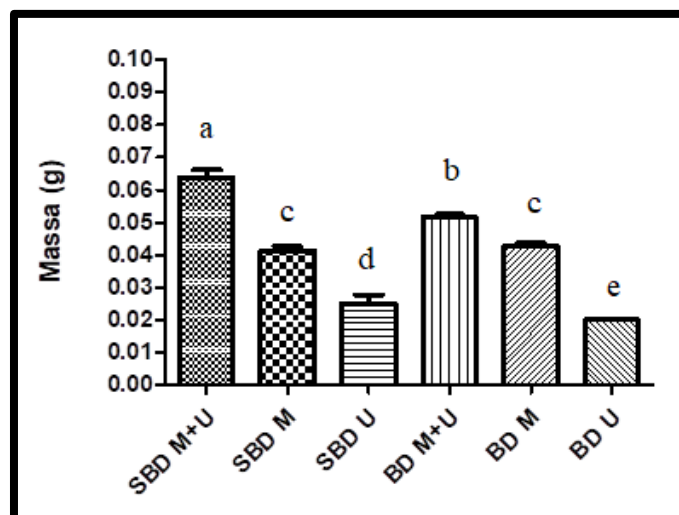


Gráfico 2: Massas dos extratos obtidas a partir dos métodos de extração maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U) a partir dos micélios obtidos a partir do meios sabourad-dextrose (SBD) e batata-dextrose(BD). Letras diferentes representam extratos diferentes ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

Podemos selecionar, assim, o meio SBD e o método de maceração combinado com ultrassom como melhores condições, entre as testadas, quando se deseja obter uma maior quantidade de massa de extrato. Os gráficos 3 e 4 (p. 38) reafirmam essa constatação, onde é verificado o meio SBD e os métodos combinados (M + U) como as melhores condições. Esse resultado em relação ao método de extração pode ser justificado pela combinação dos métodos, pois isso aumenta a eficiência da extração. A maceração pelo maior tempo de contato entre o solvente e o micélio, e o ultrassom devido a propagação de ondas sonoras que geram cavidades no líquido onde pequenas bolhas de gás se formam, podendo aumentar e reduzir de tamanho constantemente até que ocorra o colapso dessas bolhas ocasionando o rompimento das células e assim uma maior penetração do solvente, e consequentemente, aumentando o rendimento da extração (CAVALHEIRO, 2013). Além disso, em relação ao meio de cultivo, o SBD é próprio para o cultivo de fungos, devido as suas altas concentrações de carboidratos, presença de peptonas e um pH adequado ao desenvolvimento desses microrganismos. Apesar do meio BD também ser ótimo para o crescimento fúngico, quando se comparou as massas de extratos derivadas desses dois meios (BD e SBD) obtidas pelos métodos combinados de maceração mais ultrassom o extrato derivado do meio SBD foi o que forneceu uma maior massa de extrato.

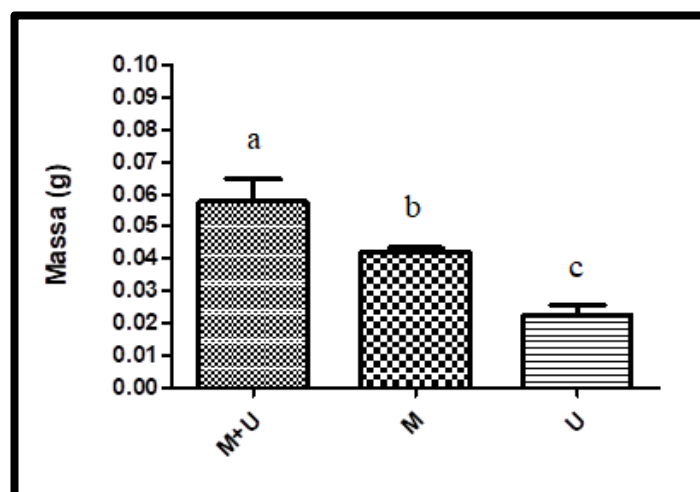


Gráfico 3: Massas dos extratos levando em consideração apenas os métodos de extração maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U). Letras diferentes representam extratos diferentes ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

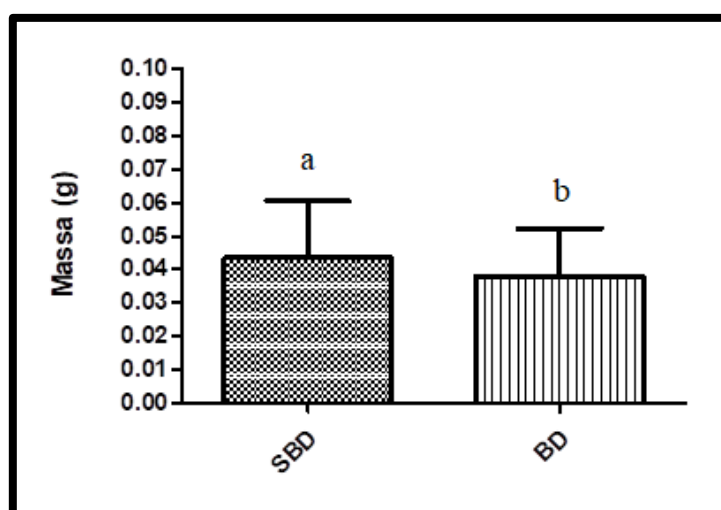


Gráfico 4: Massas de extratos levando em consideração apenas os meios de cultivo sabourad-dextrose (SBD) e batata-dextrose (BD). Letras diferentes representam extratos diferentes ($p < 0,05$). Fonte: Próprio autor.

A respeito do meio sólido de Arroz, ao compararmos as massas dos extratos adquiridas pelos diferentes métodos de extração utilizados (maceração, ultrassom e maceração mais ultrassom) nota-se, mais uma vez, a importância da otimização na produção dos extratos, visto que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nas massas obtidas por cada método, como pode ser visto no gráfico 5 (p. 39). É possível ainda eleger os extratos obtidos pelo método combinado de maceração com ultrassom como o melhor

por fornecer uma maior massa de extrato quando comparado com os outros processos para esse meio de cultivo.

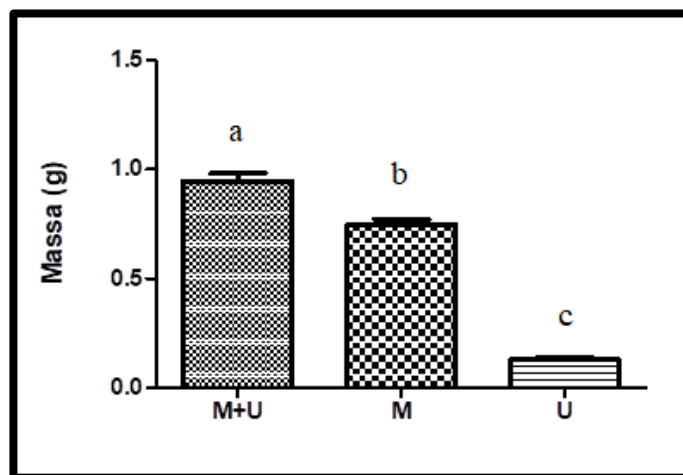


Gráfico 5: Massas obtidas dos métodos de extração maceração (M), ultrassom (U) e maceração combinado com ultrassom (M + U) obtidos do meio sólido de Arroz. Fonte: Próprio autor.

Os extratos advindos da fermentação sólida foram os que forneceram maior massa de extrato dentre todos os meios de cultivo, mas eles não podem ser analisados estatisticamente juntos com os obtidos a partir dos meios líquidos, pois durante a extração, muitos nutrientes presentes no arroz são extraídos juntamente com as substâncias produzidas pelo fungo e como consequência ocorre maior obtenção de massa de extratos na fermentação sólida do que na fermentação líquida. Isso também acontece com os meios líquidos, mas em menor proporção.

A fermentação sólida possui vantagens quando comparada a fermentação submersa, como maior produção de enzimas e biomassa, além disso, é um processo que se assemelha ao ambiente natural da maioria dos fungos filamentosos (HANSEN *et al*, 2015). Assim, o meio de arroz mostrou-se viável para o cultivo do fungo e foi analisado quanto ao seu perfil cromatográfico e atividade antifúngica.

5.2 ANÁLISE EM CCDA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS DO FUNGO B4-1A

A análise em cromatografia delgada analítica (CCDA) foi realizada com 11 extratos, obtidos pela fermentação da cepa fúngica B4-1A. Esses extratos representam a duplicata de cada meio e método de extração utilizados no cultivo do fungo. Os cromatogramas exibidos na figura 17 mostram o perfil de eluição dos extratos a partir da revelação em solução de vanilina e luz ultravioleta (365 nm).

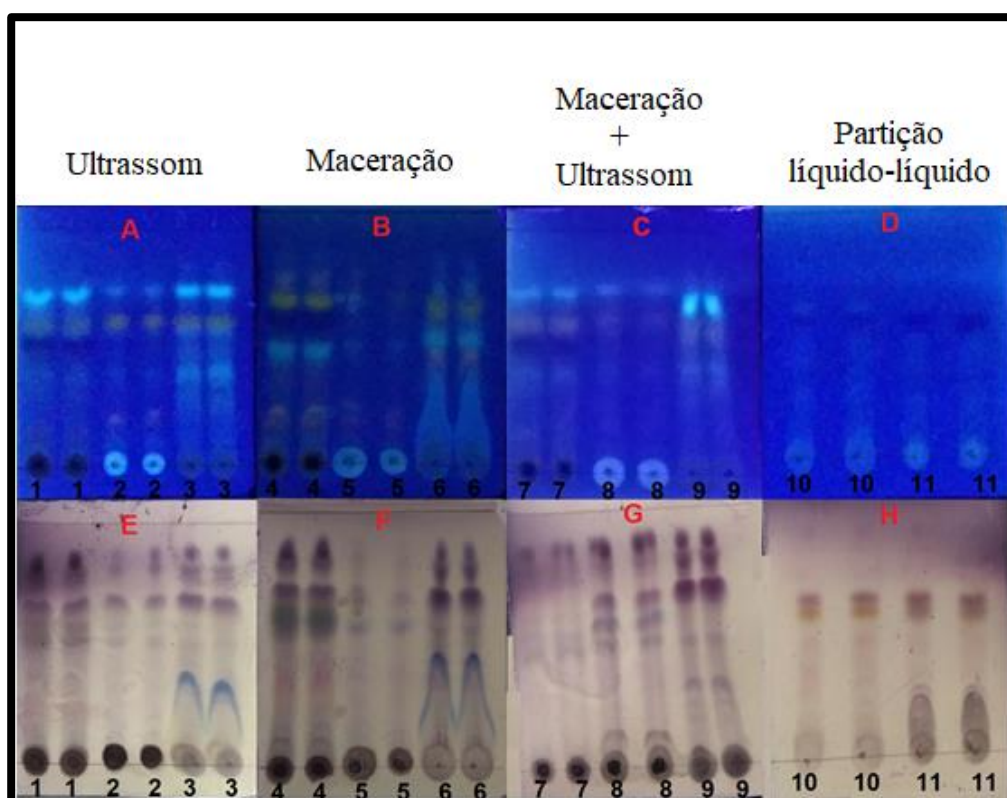


Figura 17: Cromatogramas dos diferentes extratos. A, B, C e D – Com revelação no UV, E, F, G e H com revelação em vanilina. 1 – batata-dextrose (BD) ultrassom, 2 – sabourad-dextrose (SBD) ultrassom, 3 – Arroz ultrassom, 4 – batata-dextrose (BD) maceração, 5 – sabourad-dextrose (SBD) maceração, 6 – Arroz maceração, 7 – batata-dextrose (BD) maceração mais ultrassom, 8 – sabourad-dextrose (SBD) maceração mais ultrassom, 9 – Arroz maceração mais ultrassom, 10 – batata-dextrose (BD) meio líquido, 11 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido. Fonte: Próprio autor.

É importante salientar, que o experimento em CCDA realizado tratou-se de uma análise de perfil cromatográfico qualitativo, com o objetivo tanto de comparar o perfil das substâncias entre os diferentes meios de cultura utilizados, quanto de analisar para cada meio o melhor método de extração.

Além disso, determinou-se a mistura binária do eluente utilizado a partir de experimentos iniciais com eluentes de menores polaridades, até chegar na mistura hexano/acetato de etila 1:1 de polaridade intermediária.

Assim, nota-se, a partir dos cromatogramas obtidos, que há presença de substâncias de baixa polaridade, observadas no topo do cromatograma e polaridades intermediárias. Pode-se perceber também a semelhança existente entre o perfil de eluição das duplicatas, garantindo ao experimento uma maior reprodutibilidade (Figura 17, p. 40).

Inicialmente ao observar os perfis de eluição produzidos pelos diferentes meios de cultura extraídos do micélio (Figura 17 – cromatogramas A, B, C, E, F e G, p. 40), foram observados tanto substâncias em comum como diferentes. Essa diferença foi mais acentuada quando comparam-se os produzidos pelo meio de Arroz e os outros meios de cultura (BD e SBD). Isso demonstra que a mudança nos meios de cultivo possibilitou uma produção diferente de metabólitos pelo fungo.

Quando se comparou os cromatogramas dos diferentes métodos de extração, em relação a cada meio de cultivo, percebeu-se apenas uma semelhança entre os meios BD, SBD e Arroz para os métodos de ultrassom e maceração combinado com ultrassom (Figura 17, cromatogramas A, C, E, e G, p. 40).

Como pode-se observar, principalmente a partir dos cromatogramas revelados no UV (365 nm) (Figura 17 – cromatogramas A, B e C, p. 40), que a utilização do método de extração de ultrassom fez a diferença na produção de metabólitos com grupos cromóforos diferentes dos que são encontrados no cromatograma do método apenas com extração por maceração (Figura 17 – cromatograma B, p. 40). Assim, pode-se concluir que a mudança de método de extração do micélio crescido no mesmo meio de cultivo possibilitou uma diferença na extração de metabólitos. Ressaltando, assim, a importância da otimização na produção de extratos orgânicos a partir de diferentes métodos de extração.

Nos extratos obtidos por partição líquido-líquido a partir do crescimento nos meios BD e SBD (Figura 17 – cromatogramas D e H, p. 40), nota-se uma pequena diferença no perfil cromatográfico entre eles, mas uma grande diferença entre eles e os extratos obtidos do micélio, indicando uma possível diferença de substâncias existentes nos extratos que são produzidas pelo fungo advindos de dentro de suas células e aqueles

liberadas por elas. A impossibilidade de se comparar os cromatogramas obtidos pelo método de partição líquido-líquido com os outros, está pelo fato de seus extratos serem obtidos a partir do caldo de crescimento de cada meio e não da massa micelial como nos outros métodos, mudando, assim, a matriz de extração.

Diante dessas observações em CCDA, foi possível selecionar os extratos orgânicos obtidos tanto do caldo de crescimento como da massa micelial a partir dos três meios de cultivo (BD SBD e Arroz) e obtidos por diferentes métodos de extração como promissores para o possível isolamento de futuros metabólitos secundários.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

5.3.1 EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-1A

Os 11 extratos do fungo B4-1A obtidos sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente, foram testados frente a *Candida albicans*. Os resultados dos extratos que obtiveram atividade antifúngica positiva estão apresentados na tabela 1 e ilustrados na figura 18 (p. 45).

Tabela 1: Halos de inibição em milímetros da *C. albicans* pelos extratos orgânicos obtidos pelo crescimento do fungo B4-1A em diferentes meios de cultura e obtidos por diferentes métodos de extração.

Tipo de meio de cultura	Matriz de Extração	Método de Extração	Halos* (mm)
SBD*	Caldo de crescimento	Partição líquido-líquido	8,46 ± 0,45
BD*	Caldo de crescimento	Partição líquido-líquido	11,46 ± 0,2

*Média das triplicatas ± desvio padrão; *Batata-dextrose (BD) *Sabourad-dextrose (SBD). Fonte: Próprio autor.

Verificou-se que dos 11 extratos testados dois foram capazes de inibir o crescimento da *C. albicans*. Após averiguação dos dados, pode-se alegar que a otimização na produção de extratos orgânicos é importante, visto que os resultados variaram em relação ao método de extração e especialmente ao meio de fermentação utilizado.

Esse resultado está de acordo com a técnica utilizada em diversos estudos para aumentar a produção de metabólitos, onde se utiliza a diversificação de meios de cultivo e/ou métodos de extração como o estudo realizado por Wijesekera *et al.* (2017) onde o fungo terrestre *Dothideomycete* sp. foi cultivado em meios contendo água do mar e halogêneos (brometo de potássio e iodeto de potássio). A partir desses cultivos foi possível a descoberta de nove compostos novos desse fungo quando cultivado em água do mar e KBr.

Quando foram comparados os métodos de extração percebeu-se que o método que mais gerou uma maior quantidade de extratos ativos foram os obtidos a partir da partição

líquido-líquido dos caldos de crescimento. Suspostamente, a cepa B4-1A libera seus compostos ativos majoritariamente para o caldo, não permanecendo dentro de suas células (micélio).

É importante ressaltar que não se pode selecionar quais foram os extratos mais ativos pois, o método de difusão em ágar avalia apenas se o extrato é capaz ou não de inibir o crescimento fúngico e a capacidade desse extrato em se difundir no ágar. Desse modo, quanto maior a capacidade de difusão das substâncias maior será o halo de inibição do extrato.

Uma outra consideração a ser feita é que não se pode ignorar os extratos que não apresentaram halo de inibição, pois existe a possibilidade da presença de substâncias antifúngicas nesses extratos, visto que moléculas com uma maior massa molecular tendem a se difundir no ágar com menor velocidade (ARAÚJO, 2011).

Os extratos que apresentaram atividade antifúngica positiva frente a *C. albicans* foram os que forneceram uma menor quantidade de massa de extrato na análise estatística. Assim como, na análise por CCDA não apresentaram uma maior formação de grupos cromóforos diferentes, o que foi observado em outros extratos que não foram capazes de inibir o crescimento do microrganismo testado. Ressaltando a importância de se testar todos os extratos obtidos pela fermentação dessa cepa (B4-1A), desse modo, não se pode avaliar os extratos por apenas um parâmetro, mas por um conjunto deles.

Até o presente momento, este é o primeiro trabalho que investiga o potencial antifúngico de extratos orgânicos de fungos endofíticos isolados da planta *Humirianthera ampla*, em razão disso, não existem ainda outros estudos sobre a atividade biológica desses extratos para que se possa fazer um comparativo entre as inibições dos extratos.

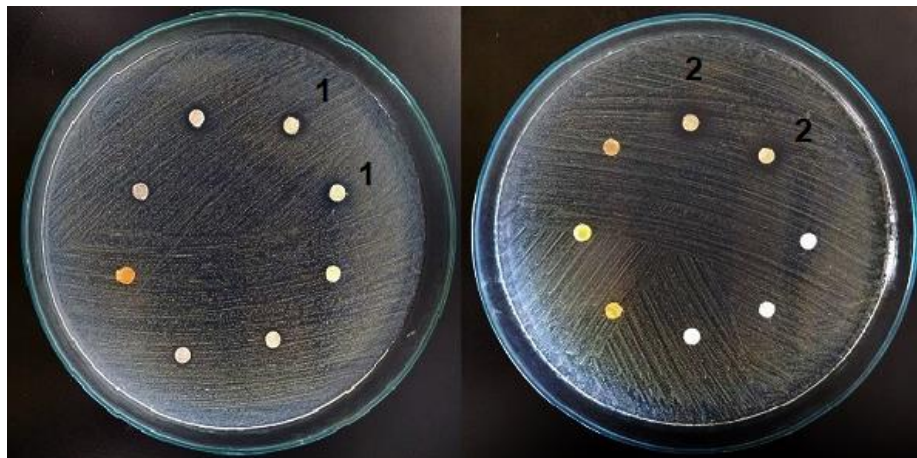


Figura 18: Halos de inibição gerados pelos diferentes extratos orgânicos obtidos pela fermentação do B4-1A em diferentes meios de cultura e métodos de extração. 1 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido, 2 – batata-dextrose (BD) meio líquido. Fonte: Próprio autor.

5.3.2 EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-3L

Também foram testados extratos do fungo endofítico B4-3L cultivado sob as mesmas condições descritas anteriormente. Desse fungo, foram testados 11 extratos frente a *C. albicans*. Os resultados dos extratos que obtiveram atividade antifúngica positiva estão apresentados na tabela 2 e ilustrados na figura 19 (p. 48).

Tabela 2: Halos de inibição (mm) da *C. albicans* pelos extratos orgânicos obtidos pelo crescimento do fungo B4-3L em diferentes meios de cultura e obtidos por diferentes métodos de extração.

Tipo de meio de cultura	Matriz de Extração	Método de Extração	Halos (mm)*
BD*	Caldo de crescimento	Partição líquido-líquido	11,36 ± 0,11
BD*	Micélio	Maceração mais ultrassom	8,2 ± 0,11
SBD*	Caldo de crescimento	Partição líquido-líquido	14,3 ± 0,1

*Média das triplicatas ± desvio padrão; *Batata-dextrose (BD) *Sabourad-dextrose (SBD). Fonte: Próprio autor.

Notou-se que dos 11 extratos testados três foram capazes de inibir o crescimento da *C. albicans*. A partir dos resultados é possível reafirmar que a otimização na produção de extratos orgânicos com atividade antifúngica é importante, pois observa-se que os resultados variaram em relação ao meio de fermentação e método de extração utilizado.

Como pode ser observado na tabela 2, os extratos orgânicos ativos foram obtidos a partir do crescimento de B4-3L nos meios BD e SBD, meios ricos em fontes bastantes nutritivas e próprios para o crescimento fúngico. Por mais que pareça uma constatação óbvia, isso não acontece para todos os fungos, alguns produzem extratos mais ativos quando fermentados em meios de cultura mais pobres ou em condições que lhes provoquem um estresse.

Assim, pode-se dizer que a cepa B4-3L produz mais metabólitos com atividade contra a *C. albicans* em meios de cultivo com mais fontes nutritivas. Venâncio *et al.* (2017) demonstrou através de um experimento os efeitos provocados pela salinidade em

algumas espécies de fungo (*Lentinus sajor caju*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizopus oryzae* e *Trametes versicolor*), foi observado que esses fungos mesmo sob estresse causado pela salinidade foram capazes de se desenvolver através da produção de novos metabólitos, mesmo que em um ambiente não favorável ao seu desenvolvimento.

Já em relação aos métodos de extração e capacidade de difusão dos extratos, observou-se que os melhores resultados foram obtidos nos extratos oriundos a partir da partição líquido-líquido dos caldos separados do micélio: BD – Meio líquido e SBD – Meio-líquido. Provavelmente, a cepa libera seus compostos ativos e com maior capacidade de difusão para o caldo, não ficando dentro de suas células (micélio).

Uma outra observação é que, possivelmente, o meio BD seja o melhor meio de cultivo para a cepa na busca de extratos antifúngicos. Pois, nota-se que há atividade também no extrato obtido a partir da sua massa micelial (BD – Maceração combinado com ultrassom). Esse extrato foi obtido pelos métodos de extração combinados maceração e ultrassom, esperava-se que os extratos desses dois métodos combinados fossem sempre os mais ativos pois, unidos eles melhoram a eficiência da extração.

Em relação aos halos de inibição ilustrados na figura 19 (p. 48), foi possível perceber que dentro deles existiam a presença de algumas colônias. Tal acontecimento pode ser explicado pelo fato de que algumas substâncias podem sofrer hidrólise nas primeiras horas de incubação possibilitando o desenvolvimento de microrganismos, mesmo que sensíveis a elas, alguns também se reproduzem antes de serem inibidos pelo extrato, isso ocorre quando a velocidade de crescimento é maior que a velocidade de difusão da droga. Podem existir também mutantes resistentes ao extrato dentro da população. Essas circunstâncias favorecem o surgimento de “colônias satélite”, colônias que podem aparecer dentro do halo de inibição (HOFLING, 2008).

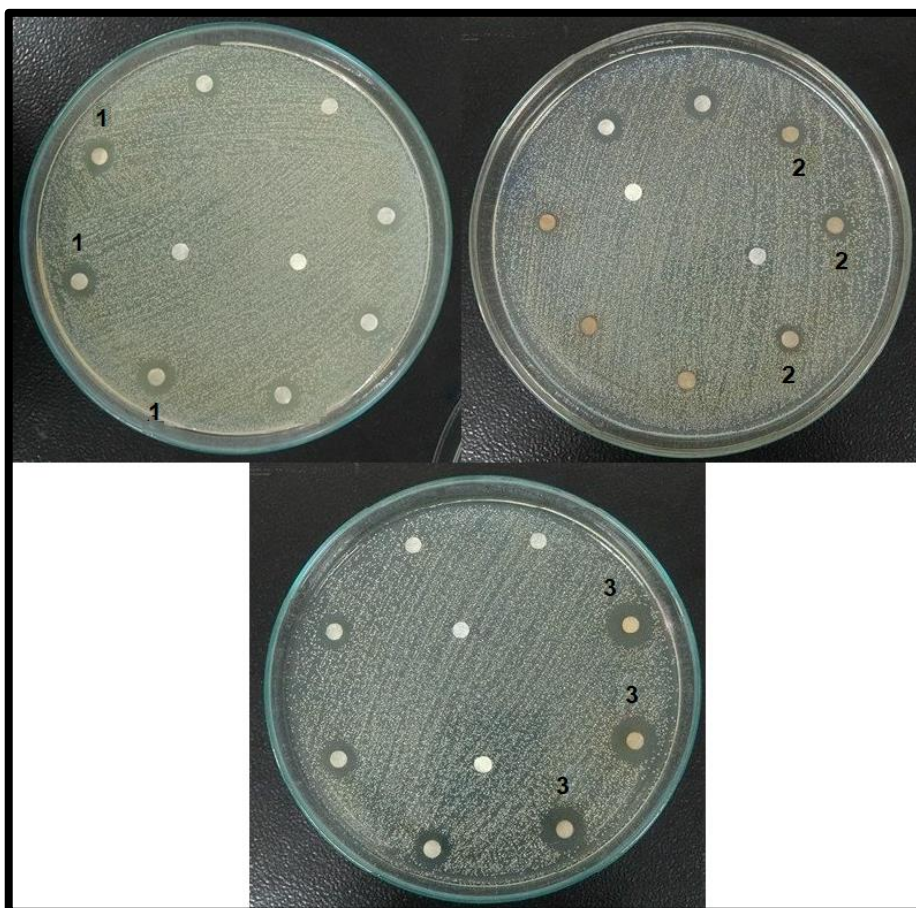


Figura 19: Halos de inibição gerados pelos diferentes extratos orgânicos obtidos pela fermentação do B4-3L em diferentes meios de cultura e métodos de extração. 1 – batata-dextrose (BD) meio líquido 2 – batata-dextrose (BD) maceração mais ultrassom, 3 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido. Fonte: Próprio autor.

5.3.3 EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-2N

Para a cepa fúngica B4-2N também foram testados 11 extratos frente a *C. albicans* cultivado sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os resultados dos extratos que obtiveram atividade antifúngica positiva estão apresentados na tabela 3 e ilustrados na figura 20 (p. 50).

Tabela 3: Média das triplicatas dos halos de inibição em milímetros da *C. albicans* pelos extratos orgânicos obtidos pelo crescimento do fungo B4-2N em diferentes meios de cultura e obtidos por diferentes métodos de extração.

Tipo de meio de cultura	Matriz de Extração	Método de Extração	Halos (mm)*
Arroz	Micélio	Ultrassom	14,83 ± 0,47
Arroz	Micélio	Maceração	14,4 ± 0,43
Arroz	Micélio	Maceração mais ultrassom	13,66 ± 0,51
SBD*	Caldo de crescimento	Partição líquido-líquido	7,76 ± 0,75

*Média das triplicatas ± desvio padrão; *Sabourad-dextrose. Fonte: Próprio autor.

Constatou-se que dos 11 extratos testados quatro foram capazes de inibir o crescimento da *C. albicans*. Após a análise dos resultados pode-se comprovar, novamente, que a otimização na produção de extratos orgânicos é importante, pois percebe-se que os resultados variaram em relação ao meio de fermentação e principalmente ao método de extração utilizado.

Conforme a tabela 3 nota-se que os extratos orgânicos ativos foram obtidos a partir do crescimento de B4-2N nos meios de cultura de SBD e Arroz, enquanto que os extratos oriundos do meio BD não foram eficientes em inibir o crescimento da *C. albicans*. Em vista disso, é possível presumir que a cepa B4-2N produz mais metabólitos ativos em meios de cultura rico em fontes de carboidratos como o meio de Arroz, o qual possui em sua composição o amido como principal carboidrato presente. Apesar do meio BD também ser um meio de cultura rico em carboidratos, é sabido que o crescimento fúngico e a produção de metabólitos pode variar de acordo com os tipos de fontes de nutrientes, nesse caso o carboidrato, que são utilizados para o cultivo de fungos.

Esse resultado está de acordo com o estudo realizado por Lima e colaboradores (2015) onde fungos foram cultivados em meios contendo diferentes fontes de açúcares (mel, açúcar branco comercial e melaço de cana de açúcar). Notou-se, um maior crescimento fúngico no meio contendo melaço, o mel apresentou crescimento intermediário e o açúcar branco o menor crescimento. Ao fornecer diferentes fontes de substratos energéticos aos fungos, pode-se obter tanto um maior desenvolvimento de sua massa micelial, quanto uma maior produção de metabólitos.

Ao examinarmos a capacidade de difusão dos extratos foi possível perceber que os melhores foram aqueles derivados do meio de Arroz (ultrassom, maceração e maceração com ultrassom) e consequentemente obtiveram também os maiores halos de inibição.

Pode-se ainda selecionar o meio de Arroz como o melhor meio de cultivo para a cepa quando se procura extratos antifúngicos. Pois, percebe-se que houve atividade dos extratos obtidos a partir de todos os métodos de extração (ultrassom, maceração e maceração com ultrassom) realizado com esse meio de cultura.

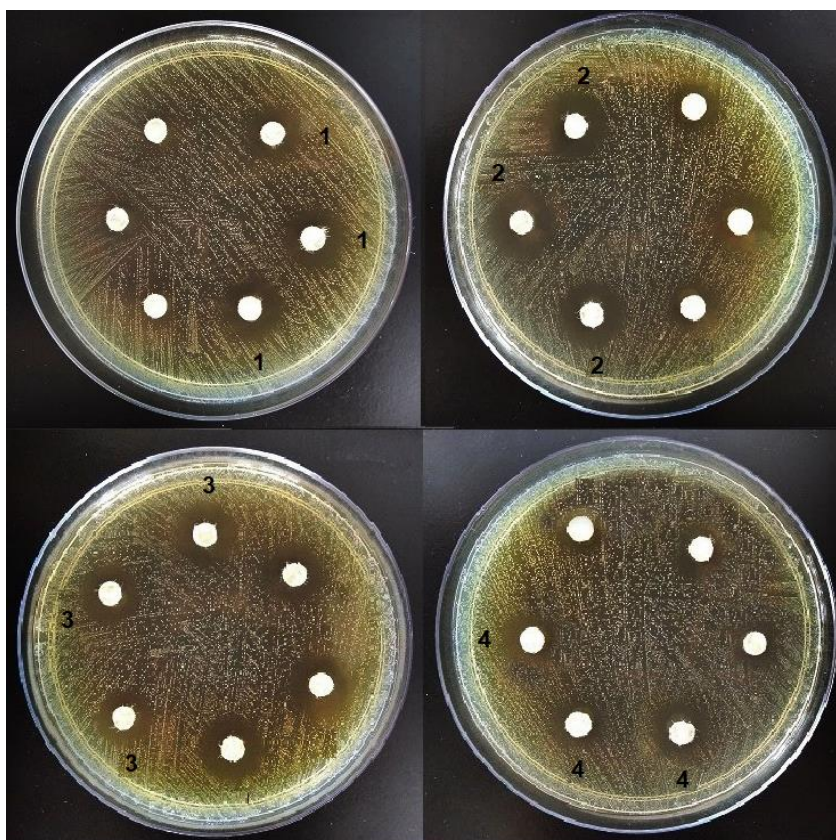


Figura 20: Halos de inibição gerados pelos diferentes extratos orgânicos obtidos pela fermentação do B4-2N em diferentes meios de cultura e métodos de extração. 1 – Arroz (ultrassom), 2 – Arroz (maceração), 3 – Arroz (maceração mais ultrassom), 4 – sabourad-dextrose (SBD) meio líquido. Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÃO

A partir da análise estatística, foi possível selecionar entre os meios líquidos, o SBD e o método de maceração combinado com ultrassom como a melhor combinação para a obtenção de uma maior quantidade de massa de extrato. Esses métodos combinados também foram a melhor condição para o meio sólido de Arroz. Por outro lado, não foi observado uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos obtidos por partição líquido-líquido dos caldos de crescimento dos meios BD e SBD.

A partir da análise em CCDA foi observado diferenças nos perfis dos metabólitos produzidos entre os diferentes meios BD, SBD e Arroz. Notou-se também, que a utilização do método de extração de ultrassom fez a diferença na produção de metabólitos com grupos cromóforos diferentes. Nos extratos obtidos por partição líquido-líquido advindos dos meios BD e SBD nota-se, um perfil de eluição diferente entre esses extratos obtidos a partir do caldo e aqueles obtidos do micélio, indicando uma possível diferença de substâncias existentes nos extratos que são produzidas pelo fungo advindos de dentro de suas células e aqueles liberadas por elas.

O teste de atividade antifúngica realizado demonstrou que todas as três estirpes fúngicas testadas foram capazes de inibir o crescimento da *C. albicans*, onde a partir dos extratos dos fungos B4-1A, B4-3L e B4-2N foram obtidos dois, três e quatro extratos respectivamente com atividade antifúngica positiva. No entanto os extratos da cepa B4-1A ativos contra *C. albicans* não foram os que se destacaram na análise estatística e por CCDA.

A estratégia OSMAC foi uma importante técnica utilizada nesse trabalho quando se tentou buscar uma diversificação de metabólitos secundários a partir da mudança do meio de cultivo. De fato, com base no presente estudo realizado, os resultados demonstraram que a partir da manipulação desse parâmetro foi possível adquirir diferentes quantidades de massa de extrato, bem como diferentes extratos com atividade antifúngica positiva frente a *C. albicans* devido a possível diferença na produção de metabólitos ativos.

A realização do presente estudo foi de grande relevância já que, a partir dos resultados obtidos, foi possível selecionar uma combinação de meio de cultivo e método de extração que oferecesse uma maior quantidade de massa micelial, perfis cromatográficos interessantes e extratos ativos quando testados contra a *C. albicans*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; Corbellino, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**. v. 34, p. 21-28. 2016.

ARAÚJO, I. S. Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

BARBEDO, L. S. & SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 22-38. 2010.

BORGES, W. S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família *Asteraceae* como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações, 2008. 40 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Candidíase. Fórum Saúde. Disponível em: <
<http://www.forumsaude24.com/candidiase/>>. Setembro 2013. Acesso em: 21 jan. 2018.

CANUTO, K. M. *et al.* Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura, 1 ed. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 35. 2012.

CAMPOY, S. & ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**. v. 133, p. 86-96. 2016.

CAVALHEIRO, C. V. Extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom e determinação de ácidos graxos e minerais em folhas de *Olea europaea L.* 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

CARVALHO, H. A. S.; RIBEIRO, L. F.; PIROVANI, C. P. *et al.* Activity of polygalacturonases from *Moniliophthora perniciosa* depends on fungus culture conditions and is enhanced by *Theobroma cacao* extracts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 40-50. 2013.

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C. *et al.* Mecanismos de resistência da *Candida sp* wwa antifúngicos. **Infarma**, Ceará, v. 18, n. 9/10, p. 30-35. 2006.

COCKERILL, R. F.; WIKLER, A. M.; ALDER, J. *et al.* Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58139aa4615e27240754da03&assetKey=AS%3A422233756704774%401477679780485>>. 2012. Acesso em 13 nov. 2017.

DANTAS, A. S.; LEE, K. K.; RAZIUNAITE, I. *et al.* Cell biology of *Candida albicans*–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v. 34, p.111-118. 2016.

DAVID, L. E. Avaliação das atividades citotóxica, antifúngica e do potencial de segurança in vivo de ar-turmerona (*Curcuma longa L.*). 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE, S. *et al.* The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v. 161, p. 273—280. 2006.

INDRIANINGSIH, A. W. & TACHIBANA, S. Glucosidase inhibitor produced by an endophytic fungus, Xylariaceae sp. QGS 01 from *Quercus gilva* Blume. Food Science and Human Wellness. 2017.

LIU, T.; GREENSLADE, A.; YANG, S. Levels of rhizome endophytic fungi fluctuate in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* as plants age. **Plant Diversity**. v. 39, ed. 1, p. 60-64. 2016.

LIU, W.; YANG, F.; ZHANG, R. *et al.* Production of polyketides with anthelmintic activity by the fungus *Talaromyces wortmannii* using one strain-many compounds (OSMAC) method. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 157–161. 2016.

FERNANDES, E. G.; PEREIRA, O. L.; SILVA, C. C. *et al.* Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**. v. 181, p. 84-92. 2015.

- FERREIRA, R. A. Avaliação da atividade antifúngica de ésteres benzoicos estruturalmente relacionados frente a espécies de *Candida*. 2016. 42 f. Monografia- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- GASONG, B. T. & TJANDRAWINATA, R. R. Production of secondary metabolite E2.2 from *Phaleria macrocarpa* endophytic fungus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 6, ed. 10, p. 881-885. 2015.
- GRAEBNER, I. B.; MOSTARDEIRO M. A.; ETHUR E. M., *et al.* Diterpenoids from *Humirianthera ampla*. **Phytochemistry**. v. 53, ed. 8, p. 955-959. 2000.
- GUIMARÃES, L. B.; SANTOS, V. Z. R.; COVIZZI, L. G. *et al.* Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Brazilian Journal**, n. 7, p. 94-99, 2009.
- GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, s. 6, p. 5-10. 2014.
- GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 7, ed. 2, p. 119-136. 2017.
- HANSEN, G. H; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.
- HEMPHILL, C. F. P.; SUREECHATCHAIYAN, P.; KASSACK, M. U. *et al.* OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. *The Journal of Antibiotics*, p. 1-7. 2017.
- HEWAGE, R. T.; AREE, T.; MAHIDOL, C. *et al.* One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87-94. 2014.
- HOFLING, J. F. **Microscopia de luz em microbiologia**: Morfologia bacteriana e fúngica, ed. 1. Porto Alegre: Artmed, 2008. 244 p.

HUSSAIN, H.; SPORY, C. K.; HARRASI, A., *et al.* Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 224-227. 2014.

JÚNIOR, D. P. L.; YAMAMOTO, A. C. A.; MARTINS, E. R. *et al.* Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT), Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, n. 4, p. 675-680, 2010.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n 7, p. 792-798. 2012.

LIMA, G. T.; BARBOSA, F.; BARRO, M. F. M. S. *et al.* Avaliação de meios de cultura para fungos com diferentes tipos de açúcares. In: Jornada de Iniciação Científica e Extensão do Instituto Federal de Tocantins, nº 6, 2017, Tocantins, p. 4.

MARTINS, S. C. S.; FIÚZA, L. M. C. G.; MARTINS, C. M. *et al.* Comparação de diferentes meios de cultivo para a avaliação da viabilidade celular de fermentos biológicos. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p. 2478 – 2486, 2013.

MCMULLIN, D. R.; GREEN, B. D; MILLER, J. D. Antifungal sesquiterpenoids and macrolides from an endophytic *Lophodermium* species of *Pinus strobus*. **Phytochemistry Letters**. v. 14, p. 148-152. 2015.

MILANEZI, A. C. M. Avaliação do perfil de resistência a antifúngicos de leveduras isoladas do arroio dilúvio de Porto Alegre. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiental). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MINIYAR, P. B.; MAHAJAN, A. A.; MOKALE, S. N. *et al.* Triazole hybrids as new type of anti-fungal agents. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 10, ed. 3, p. 295-299. 2013.

MOHAMMAD, H.; BAFFOUR, K. K.; YOUNIS, W. *et al.* Investigation of aryl isonitrile compounds with potent, broad-spectrum antifungal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 25, ed. 11, p. 2926-2931. 2017.

NETT, J. E. & ANDES, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 30, n. 1, p. 51-83. 2015.

OLIVEIRA, J. C. **Diagnóstico Micológico por Imagem**. 1 ed. Rio de Janeiro, 2013. 104 p.

OLIVEIRA, L. B. S.; BATISTA, A. H. M.; FERNANDES, F. C. *et al.* Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 18, n. 2, p. 511-523. 2016.

OLIVEIRA, R. S.; ROCHA, J. S.; PINHEIRO, K. H. *et al.* Aplicação de processo ultrassom na extração de catequinas dos resíduos de chá verde. **Brazilian Journal of Food Research**. v. 7, n. 3, p. 29-40. 2016.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 31, ed. 1, p. 42-48. 2013.

SARAIVA, N. N. Estudo químico do fungo antagonista (*Trichoderma harzianum*). 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SEABROOKS, L. & HU, L. Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. 2017.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S. *et al.* Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**. p. 124-128. 2009.

SILVA, M. R. O. Diversidade de fungos endofíticos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn: produção, isolamento e identificação da substância com atividade antimicrobiana. 2009. 101 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SIMÕES, C. M. O.; SCHEKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.

SYNYTSYA, A. MONKAI, J.; BLEHA, R. *et al.* Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 7, ed. 3, p. 257–261. 2016.

STRAUCH, M. A.; TOMAZ, M. A.; MACHADO, M. M. *et al.* Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 145, ed. 1, p. 50-58. 2012.

STROBEL, G. Introduction to endophytes and their application to develop commercial products. Disponível em: < <https://www.slideshare.net/TFInnova/talk-1-gary-strobel>>. Novembro 2009. Acesso em: 01 dez. 2017.

SUCHODOLSKI, J.; KUBIS, J. F.; KRASOWSKA, A. Antifungal activity of ionic liquids based on (–)-menthol: a mechanism study. **Microbiological Research**. v. 197, p. 56-64. 2017.

TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. A. P. *et al.* Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochem**, v. 12, p. 773–789. 2013.

Taxol: indicações, interações, efeitos colaterais e advertências. Drugdiscovery. Disponível em:<<http://drugdiscovery.com/viewdetails.php?linkid=813&title=Taxol:-indications,-interactions,-side-effects-and-warnings#.WiFiJkqnHIU>>. Setembro 2013. Acesso em: 01 dez. 2017.

TONG, Y.; LIU, M.; ZHANG, Y. *et al.* Beauvericin counteracted multi-drug resistant *Candida albicans* by blocking ABC transporters. **Synthetic and Systems Biotechnology**. v. 1, ed.3, p. 158-168. 2016.

TOZZO, A. B. & GRAZZIOTIN, N. A. Candidíase Vulvovaginal. **Perspectiva**. Erechim, v. 36, n. 133, p. 53-62. 2012.

VENÂNCIO, C.; PEREIRA, R.; FREITAS, A. C. *et al.* Salinity induced effects on the growth rates and mycelia composition of basidiomycete and zygomycete fungi. **Environmental Pollution**, v. 231, n. 2. p. 1-9. 2017.

WANG, Y.; YANG, M.; WANG, X. *et al.* Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Alternaria alternata*. **Fitoterapia**, v. 99, p. 153-158. 2014.

WHIBLEY, N. & GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**. v. 76, ed. 1, p. 42-52. 2015.

WIJESEKERA, K.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Metabolite diversification by cultivation of the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. in halogen containing media: Cultivation of terrestrial fungus in seawater. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 25, ed. 11, p. 2868-2877. 2017.

ZHENG, Y. K.; MIAO, C. P.; CHEN, H. H. *et al.* Endophytic fungi harbored in *Panax notoginseng*: diversity and potential as biological control agents against host plant pathogens of root-rot disease. **Journal of Ginseng Research**. Disponível em [http://www.ginsengres.com/article/S1226-8453\(16\)30130-0/fulltext](http://www.ginsengres.com/article/S1226-8453(16)30130-0/fulltext) . 2017. Acesso em 28 Jun. 2017.