



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE MESTRADO E DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

IARA NUNES DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE PIGMENTOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DE
EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Manilkara salzmannii*,
PLANTA DA RESTINGA DE SALVADOR, BA**

SALVADOR

2018

IARA NUNES DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO DE PIGMENTOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DE
EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Manilkara salzmannii*,
PLANTA DA RESTINGA DE SALVADOR, BA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Hugo Moreau

SALVADOR

2018

Nunes de Oliveira, Iara
DETECÇÃO DE PIGMENTOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
BIOATIVOS DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS À *Manilkara salzmannii*, PLANTA DA RESTINGA
DE SALVADOR, BA / Iara Nunes de Oliveira, cristina
amelia nunes. -- Salvador, 2018.
89 f. : il

Orientador: Vitor Hugo Moreau da Cunha.
Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em
Biotecnologia (Mestrado)) -- Universidade Federal da
Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, 2018.

1. fungo endofítico. 2. metabólitos secundários. 3.
pigmentos. II. nunes, cristina amelia. I. Moreau da
Cunha, Vitor Hugo. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por acalmar meu coração em momentos difíceis, me dando sabedoria e guiando meus passos por caminhos tão gratificantes.

À minha mãe Cristina, por acreditar que esse sonho seria possível.

À Prof. Doutora Samira por toda credibilidade, ensinamento e compreensão. Muito mais que uma orientação, ganhei um referencial, alguém em quem me espelhar e alguém que terá minha eterna gratidão e admiração.

Ao meu orientador Vitor Hugo Moreau, pela oportunidade concedida e confiança.

Aos meus antigos e novos colegas do LBI. Day com todo carinho e solicitude, sempre pronta a ajudar. Genazio, que tantas vezes mudou de posição comigo e foi um verdadeiro professor. Barbara, nova integrante do grupo que tanto me ajudou na reta final. Obrigada a todos vocês.

À Caio, amigo sempre presente em meus momentos mais difíceis, ajudando com boa vontade.

Aos colegas de profissão pelo auxílio por diversas vezes.

À FAPESB, pela bolsa concedida.

DE OLIVEIRA, IARA NUNES. Detecção de Pigmentos e metabólitos secundários bioativos de extratos de fungos endofíticos associados à *Manilkara salzmannii*, planta da Restinga de Salvador. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

Com o desenvolvimento da Biotecnologia, a alta taxa da biodiversidade dos ecossistemas brasileiros, tornou-se alvo de interesse do governo, das empresas e da comunidade científica. Fungos são distintos produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais já se encontram empregados em diversos setores de processos industriais e, dentre estes, os endofíticos. Pigmentos são metabólitos secundários ainda pouco explorados, representando uma área em expansão. A notoriedade que tais pigmentos vêm assumindo se deve não só ao apelo ao uso cada vez maior de substâncias naturais, mas também às suas características funcionais e possibilidade de produção em grande escala. Este trabalho teve como objetivo prospectar fungos endofíticos associados à *Manilkara salzmannii*, planta da restinga de Salvador BA, produtores de pigmento e antimicrobianos com potencial aplicação industrial, bem como caracterizar físico-quimicamente tais compostos. Para isso, foi realizada uma coleta de tecidos sadios de *Manilkara salzmannii*, no parque UNIDUNAS, em Salvador, a fim de se isolar fungos produtores de metabólitos secundários de interesse. Iniciou-se o processo de caracterização química destas moléculas através de técnicas como cromatografia em camada delgada (CCD), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), etc. Um dos isolados apresentou produção de pigmento vermelho solúvel secretado no meio de cultivo, com grande potencial antifúngico e antioxidante. A determinação de compostos fenólicos indicou uma produção considerável de flavonoides e a análise da atividade antioxidante constatou que o fungo endofítico C2C3, também produz compostos pró-oxidantes voláteis. Na composição do pigmento foram detectados vários compostos, entre eles resveratrol. A atividade antifúngica ocorreu frente a vários fitopatógenos e patógenos humanos. Este fungo, registrado como C2C3 foi identificado por técnicas moleculares como pertencente ao gênero *Lophiostoma* sp.

Palavras chave: fungos endofíticos; metabolismo secundário; pigmentos; antifúngico, caracterização físico-química.

DE OLIVEIRA, IARA NUNES. Detection of bioactive secondary pigments and metabolites of endophytic fungi extracts associated with *Manilkara salzmannii*, Salvador Restinga plant. Master Dissertation - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

With the development of Biotechnology, the high rate of biodiversity of Brazilian ecosystems has become a target of interest for government, companies and the scientific community. Fungi are distinct producers of secondary metabolites, many of which are already employed in various sectors of industrial processes and, among them, the endophytic. Pigments are secondary metabolites that are still little explored, representing an expanding area. The notoriety that such pigments have been assuming is due not only to the appeal to the increasing use of natural substances, but also to their functional characteristics and possibility of production on a large scale. This work aimed to prospect endophytic fungi associated with *Manilkara salzmannii*, plant of the Restinga of Salvador BA, pigment and antimicrobial producers with potential industrial application, as well as physicochemical characterization of such compounds. For this, a healthy tissue collection of *Manilkara salzmannii* was carried out in the UNIDUNAS Park, in Salvador, in order to isolate fungi producing secondary metabolites of interest. The process of chemical characterization of these molecules was started through techniques such as thin-layer chromatography, HPLC, etc. One of the isolates presented red soluble pigment production secreted in the culture medium, with great antifungal and antioxidant potential. The determination of phenolic compounds indicated a considerable production of flavonoids and the analysis of antioxidant activity found that the endophytic fungus C2C3 also produces volatile pro-oxidant compounds. In the composition of the pigment were detected several compounds, among them resveratrol. The antifungal activity occurred against several phytopathogens and human pathogens. This fungus, registered as C2C3 was identified by molecular techniques as belonging to the genus *Lophiostoma* sp.

Keywords: endophytic fungi; Secondary metabolism; Pigments; Physicochemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula molecular de diferentes compostos fenólicos.....	25
Figura 2: Subclasses de flavonoides	25
Figura 3: Estrutura química básica dos flavonoides	27
Figura 4: Área de restinga do Parque das Dunas (UNIDUNAS), Salvador Ba	34
Figura 5: Esquema do procedimento de desinfecção de amostras: (a) e (c) álcool 70 INPM; (b) hipoclorito de sódio 3%; (d), (e) e (f) água destilada; (g) placa de Petri contendo meio BDA.....	35
Figura 6: Microcultivo de Fungos Filamentosos	36
Figura 7: Teste de Confronto entre Colônias.....	37
Figura 8: Cromatografia em Camada Delgada com amostras do extrato metabólico fúngico.	40
Figura 9: (a) Hifas e (b) ascósporos do isolado C2C3, observados, em lâmina de micro cultivo, em microscópio óptico. Aumento de 100x	45
Figura 10: Fungo C2C3 em placa contendo meio ASD. Em “A” uma placa com 3 dias e em “B” uma placa com 5 dias.	45
Figura 11: Fungo C2C3 após 2 semanas de cultivo	46
Figura 12: Placa contendo meio ASD e fungo C2C3.....	47
Figura 13: Fungo inoculado em meio Sabouraud líquido em três etapas de crescimento	47
Figura 14: Fungo C2C3 após 14 dias de cultivo, produzindo pigmento	48
Figura 15: Ensaio de antagonismo demonstrando frente e verso das placas de confronto direto entre o C2C3 e o patógeno	49
Figura 16: Placas com halo de inibição de <i>Alternaria alternata</i> pela fração aquosa de do extrato de C2C3.	52
Figura 17: Cromatoplaça de CCD do extrato de C2C3	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de metabólitos secundários de alto valor isolados de endofíticos.....	
	23
Tabela 2: Pigmentos não-carotenoides produzidos por fungos promissores para indústria de alimentos.....	30
Tabela 3: Isolados fúngicos da <i>Manilkara salszmannii</i> , de acordo com o tecido vegetal, coleta e período de incubação.....	43
Tabela 4: Índice de inibição do crescimento de microrganismos patogênicos em duas diferentes concentrações do extrato de C2C3.....	51
Tabela 5: Quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides nos extratos novo e velho do fungo C2C3 em diferentes solventes de extração.....	54
Tabela 7: Atividade Antioxidante (DPPH – Amostra Etanólica de C2C3).....	55
Tabela 8: Resultados de análise em HPLC extrato fúngico à 320 nm.....	57
Tabela 9: Análise em HPLC do extrato fúngico à 280 nm.....	58
Tabela 10: Análise em HPLC do extrato fúngico à 360 nm.....	58
Tabela 11: Compostos identificados por HPLC do extrato fúngico à 520 nm.....	59
Tabela 12: Análise em HPLC do extrato fúngico à 320 nm fluorescente.....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
BDA	Ágar Batata Dextrose
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido Desoxoribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
GQ	Gramas de Quercetina
H	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
LBI	Laboratório de Biotecnologia Industrial
mm	Milímetro
mL	Microlítro
M	Molar
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanometro
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
RF	Fator de Retenção

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
UV	Ultravioleta
°C	Graus Célsius
%	Porcentagem
μ	Micro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1. Fungos.....	19
2.1.1. Fungos Endofíticos como fonte de produtos naturais.....	20
2.2. Metabolismo secundário de fungos endofíticos.....	23
2.3. Compostos Fenólicos.....	25
2.3.1. Flavonoides.....	27
2.4. Corantes e Pigmentos fúngicos.....	28
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. Objetivo Geral.....	33
4.2. Objetivos Específicos.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1. Coleta do Espécime Botânico.....	34
5.1.1. Isolamento dos Microrganismos.....	35
5.1.2. Microcultivo do Isolado.....	36
5.2. Ensaio de Antagonismo.....	38
5.3. Cultivo em Pequena Escala e Obtenção de Extratos.....	38
5.4. Bioensaio fungicida.....	39
5.5. Extração, Isolamento e Identificação dos Metabólitos Secundários.....	39
5.6. Ensaio físico-químicos do extrato.....	39
5.6.1. Cromatografia em Camada Delgada.....	39
5.6.2. Compostos Fenólicos.....	40
5.6.3. Flavonoides.....	41
5.6.4. Determinação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH) Soluções.....	41
5.6.5. High-performance liquid chromatography (HPLC) qualitativa.....	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1. Isolamento dos Microrganismos Endofíticos.....	43
6.2. Cultivo em Pequena Escala e Obtenção dos Extratos.....	47
6.3. Bioensaios.....	48
6.3.1. Ensaio de antagonismo.....	48
6.3.2. Bioensaio fungicida.....	48
6.4. Ensaio físico-químicos do extrato fúngico.....	52
6.4.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	52
6.4.2. Determinação de Compostos Fenólicos e Flavonóides Bioensaios.....	53
6.4.3. Determinação da Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> (DPPH).....	54

6.4.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	56
7. PRODUTOS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
8. CONCLUSÃO.....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (SCHIMMEL, 1995; MAIA, 2015).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 a 550.000 (SIMÕES et al., 2007), consistindo em importante potencial de desenvolvimento socioeconômico para o país, como fonte de corantes, óleos vegetais, gorduras, fitoterápicos, antioxidantes e óleos essenciais para o setor produtivo. Destes, apenas 16% da diversidade dos fungos é conhecida, onde no Nordeste, 2.617 espécies e na Bahia 876 (MAIA, 2015).

Com o desenvolvimento da Biotecnologia, a alta taxa da biodiversidade presente nos ecossistemas brasileiros, tornou-se alvo de interesse do governo, das empresas e da comunidade científica. Assim, é imprescindível o conhecimento sobre a diversidade microbiana e de suas funções exercidas (BHAGOBATY; JOSHI, 2011).

Segundo a resolução mais recente do Conselho Nacional do Meio Ambiente, a resolução CONAMA nº 417/2009, a vegetação de Restinga constitui um conjunto de comunidades vegetais, distribuídas em mosaico, que cobre os depósitos arenosos costeiros recentes (quaternário e terciário), também consideradas comunidades edáficas, por dependerem mais da natureza do solo que do clima, encontradas nos ambientes de praias, cordões arenosos, dunas, depressões e transições para ambientes adjacentes, podendo apresentar, de acordo com a fitofisionomia predominante, estrato herbáceo, arbustivo e arbóreo, este último mais interiorizado.

Restingas são formações vegetais costeiras, extremamente adaptadas a condições ambientais adversas, como ventos, terreno arenoso, baixos níveis de fertilidade do solo, elevado grau de salinidade, fatores estes que estão associados à sua proximidade com o mar (CPBM, 2007).

O gênero *Manilkara* sp está inserido na família *Sapotacea* e as espécies do gênero possuem importância econômica, tendo em vista que apresenta madeira de

qualidade, bastante utilizada na construção civil. Além disso, ainda há o látex que é utilizado na fabricação de gomas, e a algumas espécies produtoras de frutos comestíveis que podem ser consumidos e comercializados.

A espécie *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam popularmente conhecida como Massaranduba, apresenta porte arbóreo, entre 10 a 15 m. É uma espécie nativa do Brasil, e está distribuída na mata atlântica, sendo bastante comum no Nordeste e em alguns estados do Sul e Sudeste, como Espírito Santo e Paraná. Ainda há ocorrência na Região Amazônica (PENNINGTON, 1990). É uma das espécies escolhidas para o projeto de reflorestamento no sul da Bahia, no qual há uma parceria entre o *Royal Botanic Gardens, Kew*, a Rio Tinto, uma multinacional anglo-australiana e das Universidade Federal do Recôncavo Baiano e Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Segundo Azevedo e colaboradores (1998), entre os grupos de microrganismos, especialmente bactérias e fungos, encontram-se os endofíticos, espécies que colonizam o interior ou a superfície interna de tecidos saudáveis da planta, incluindo raízes e, sem causar efeito deletério, compartilham de pelo menos uma fase do ciclo de vida vegetal. As interações dos microrganismos endofíticos e as plantas, ainda não são bem compreendidas, mais podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas, estes fungos e bactérias produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como a diminuição da herbivoria, ataque dos insetos, aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros agentes, como os fitopatógenos (AZEVEDO, 2008), conferindo à planta adaptabilidade para sobreviver em condições ambientais adversas (NATH et al., 2012)

Os fungos representam microrganismos presentes em quase todos os biomas do planeta Terra, com enorme diversidade de espécies principalmente nas regiões tropicais, cujo clima favorece sua multiplicação (BLACKWELL, 2011), sendo distintos produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais denominados compostos bioativos. Estes são utilizados como fármacos, ou como precursores para síntese ou semi-síntese de medicamentos diversos, como antibacterianos, antifúngicos, antitumorais, imunossupressores e antidiabéticos (MOHARRAM et al., 2012; ZAFERANLOO et al., 2014; NEWMAN e CRAGG, 2015) após o isolamento e estudo de fungos endofíticos.

Os fungos endofíticos podem apresentar mecanismos fisiológicos e genéticos importantes para a interação com a planta e também como potencial para a produção de metabólitos ativos, podendo apresentar novas descobertas, com aplicação na medicina, na agropecuária, na indústria química e farmacêutica (ZAFERANLOO et al., 2014; COSTA, 2016).

Fungos filamentosos são organismos metabolicamente ativos, utilizados como fábricas celulares na produção de uma série de metabolitos (CORTEZ LOPES, 2011) com amplo espectro de atividades metabólicas, podendo ser agrupados em várias categorias, dentre elas alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quininas, fenilpropanoides, lignanas, fenol, ácido fenólico, entre outros (ZHANG et al., 2006; COSTA, 2016). Podendo ainda produzir metabólitos secundários iguais ou similares aos de seus hospedeiros, como por exemplo o inseticida natural *azadirachtin* (KUSARI et al., 2012).

Por outro lado, a transferência horizontal de genes entre planta e hospedeiro endofíticos vem sendo foco de diversas hipóteses que visam explicar tais similaridades metabólicas, porém, estes mecanismos foram demonstrados apenas em microrganismos até o momento (TAGHAV et al., 2005), não deixando de corroborar com a sugestão de que a interação entre os dois organismos contribui para a produção de moléculas bioativas de extrema importância (HEINIG et al, 2013)

Dentre estes metabólitos fúngicos encontram-se também os pigmentos, ainda pouco explorados. A produção destes pigmentos é uma nova área, em expansão e, apresenta um potencial biotecnológico muito atraente (DURÁN et al., 2004; LI et al., 2017) uma vez que incluem vantagens como a não-toxicidade, segurança, cores naturais e brilhantes, alto valor nutricional e aplicações farmacológicas.

Pigmentos microbianos podem ser uma alternativa promissora em relação a outros aditivos extraídos de animais ou vegetais, pois não apresentam sazonalidade e podem ser superproduzidos, uma vez que a obtenção destas substâncias está intimamente relacionada aos meios de cultura associados às fontes de carbono e nitrogênio disponíveis, assim como condições de pH, temperatura e agitação, que influenciam diretamente nas reações metabólicas e trocas gasosas (MEINICKE, 2008). O uso da tecnologia de fermentação ainda pode reduzir custos por geralmente não estar associada a restrições de recursos (LI et al., 2017). Some-se a isto, o fato

de os corantes sintéticos serem derivados de subprodutos do petróleo, que é uma fonte não-renovável, o que futuramente acarretará no decréscimo da produção (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2012).

Anteriormente aos estudos acerca de pigmentos e metabólitos secundários provenientes de microrganismos, estas moléculas eram extraídas exclusivamente de vegetais. Com o passar da Revolução industrial, entre os séculos XVIII e XIX, se fez maior a necessidade por determinadas substâncias e, evidenciou-se a necessidade por processos que causassem menos impacto ao meio ambiente, abrindo espaço para produtos de origem microbiológicas, com aplicabilidade na indústria de alimentos, uma vez que pigmentos de origem natural possuem melhor aspecto quando comparados à sintéticos (DALLAGO et al., 2005). Sendo estes últimos importantes agentes causadores da poluição ambiental, visto que a complexidade de suas moléculas, desenvolvidas para serem altamente estáveis, dificultam a degradação pelos fungos ambientais (ALI, 2010).

Estudos anteriores revelaram que fungos pertencentes aos gêneros *Talaromyces spp.* e *Penicillium sp.* entre outros, são relatados como grandes produtores de pigmentos, porém detentores de micotoxicidade, não sendo aprovados como componentes alimentares na União Europeia e Estados Unidos, maiores mercados consumidores mundiais (ARAI et al., 2013). Em contraste, os estudos realizados por Romano (2015) e Li (2017) conseguiram demonstrar a produção de pigmentos por fungos endofíticos sem apresentação deste fator.

Além disso, houve um aumento constante na percepção pública negativa sobre o uso de drogas sintéticas devido à sua segurança a longo prazo e preocupações ambientais (STROBEL e DAISY, 2003). Consequentemente, esforços vêm sendo empregados na comunidade científica para que voltem a ser explorados o produto natural como potencial fonte de novas drogas (A. ALVIN et al, 2014).

Metabólitos secundários são geralmente produzidos em resposta à estímulos externos. Produtos naturais correspondem a cerca de 50% das novas drogas inseridas no mercado entre os anos de 1981 e 2010 além de aproximadamente 75% dos agentes anti-infecciosos serem produtos naturais ou derivados destes (NEWMAN e CRAGG, 2010). Desde a descoberta da penicilina em 1928 e sua produção em massa durante a Segunda Guerra, a medicina moderna vem utilizando

produtos naturais e as entidades farmacêuticas vêm empregando esforços para isolar e identificar produtos naturais bioativos. Segundo Alvin e colaboradores (2014), em um passado recente o isolamento de novos produtos naturais não era a via preferencial para descoberta de novos fármacos, devido principalmente ao tempo despendido e a falta de recursos. Atualmente, com a evolução da biotecnologia e uso de instrumentos de análise avançados, como High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Espectometria de Massa (MS) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), as análises tornaram-se muito mais frequentes e paupaveis à comunidade científica, desencadeando um crescente interesse pela descoberta de novos produtos de aplicação terapêutica.

Desta forma, dando prosseguimento nas investigações realizadas em extratos de fungos endofíticos associados à *Manilkara salzmannii*, propõem-se a bioprospecção de pigmentos naturais e metabólitos secundários, assim como suas atividades.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRIA

1.1. Fungos

Fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. Estão presentes em quase todos os ambientes da Terra, e a maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais do mundo, cujo clima quente e úmido é favorável à sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). Estes microrganismos podem ocorrer associados à outras espécies, como patógenos de animais e plantas ou como espécies de vida livre. Sua nutrição é feita através de absorção, auxiliada pela liberação de enzimas, produzidas por eles e utilizadas na degradação dos nutrientes (AZEVEDO, 1997; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SCHMIT, 2007). Os fungos destacam-se pela produção de alimentos, enzimas, álcoois, ácidos orgânicos e produtos farmacêuticos, entre eles os medicamentos (CHAKRABORTY et al., 2010).

No Reino Fungi estão inseridos três grupos distintos de fungos: filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros considerados microscópicos, constituindo um reino bastante rico e heterogêneo (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; ARCHER et al. 2008). Já as leveduras, mais empregadas em processos industriais, são utilizadas visando a obtenção de células propriamente ditas, componentes celulares e produtos do metabolismo (CORTEZ LOPES, 2015).

Entre os organismos vivos, os fungos filamentosos são os principais produtores de bioativos microbianos com atividade biológica (42%), seguidos dos *Streptomyces* (32,1%) (BRAKHAGE e SCHROECKH, 2011). Tais bioativos são substâncias resultantes do metabolismo primário, geralmente produzidas como resposta às condições de estresse sofridas pelo microrganismo (NGUYEN et al., 2012), geralmente durante a fase estacionária de crescimento microbiano, onde se inicia a escassez de nutriente (RUIZ et al., 2010). Como consequência, muitas substâncias com potencial antimicrobiano e inibidor do crescimento são produzidas nesta fase, onde ocorre disputa com organismos vizinhos em um ambiente pobre em nutrientes, a fim de matar ou atrasar o crescimento dos competidores ou até mesmo reduzir seu próprio metabolismo, diminuindo suas necessidades energéticas (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

Segundo O'Brien e Wright (2011), uma vez que estas novas moléculas vem sendo fonte cada vez mais frequente na descoberta de novas drogas, os esforços para purificação destes compostos têm sido maiores que a busca pela compreensão da sua real função no organismo produtor.

Diversos fármacos encontrados no mercado atual foram obtidos a partir do metabolismo de fungos, como os antibióticos do grupo β -lactâmicos, como a penicilina, cefalosporina e griseofulvina (CHAKRABORTY et al., 2010), algumas drogas anti-cancerígenas como paclitaxel, vincristina, podofilotoxina (KHARWAR et al., 2011) e estatinas, que agem como antideslipidêmicos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Pigmentos, por sua vez, parecem estar ligados a necessidade de proteção contra radiação UV (carotenoides e melanina), afugentar predadores com suas atividades antimicrobiana e citotóxica ou até mesmo atuar como co-fator em reações químicas (vitaminas) (JALMI et al, 2012). Todavia, estas moléculas também despertam grande interesse para aplicação como corantes naturais devido a variedade de cores obtidas por diferentes espécies de fungos em diversas condições ambientais e seu valor agregado (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010).

1.1.1. Fungos endofíticos como fonte de produtos naturais

As plantas vêm desenvolvendo diversas adaptações evolutivas, muitas destas, graças às suas interações com microrganismos. Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam inter ou intracelularmente órgãos vegetais, de forma assintomática, sem causar prejuízos ao hospedeiro (ZOU, 2001; STROBEL et al., 2004; AZEVEDO e ARAUJO, 2007), em pelo menos uma das fases do seu ciclo de vida (PEIXOTO NETO et al., 2004).

Após o primeiro relato de isolamento de fungos endofíticos, feito por Dreyfuss e Petrini (1984) em Aracae, Bromeliaceae e Orchdaceae, na Guiana Francesa, Brasil e Colômbia, várias outras plantas foram investigadas quanto a presença destes microrganismos, como palmeiras e arvores frutíferas (AZEVEDO et al., 2000). É comum a presença de fungos endofíticos em algas marinhas (MATHAN et al., 2013), musgos e samambaias (ZANG et al., 2015), coníferas (YOO et al., 2012)

e árvores superiores (PAZOUTOVÁ et al., 2012). Faeth et al. (2002) e Ryan et al. (2008) afirmaram ainda que a presença de endofíticos é comum a todos os vegetais, uma vez que todas as plantas já investigadas apresentaram ao menos um microrganismo associado. Sendo comum sua presença em diferentes tecidos como flores, sementes, raízes, folhas e tronco.

As interações observadas entre plantas e microrganismos endofíticos ainda não são bem compreendidas, mas apresentam-se das seguintes formas: simbióticas, neutras e antagonicas. Baseado na relação evolucionária, taxonomia, planta hospedeira e funções ecológicas, os fungos endofíticos são classificados como clavissipitáceos ou endofíticos grass (C-endofíticos) ou não clavissipitáceos (NC-endofíticos) de plantas avasculares, samambaias, coníferas e angiospermas (RODRIGUEZ et al., 2009). Atualmente, vem ocorrendo um aumento no interesse pelo estudo dos NC-endofíticos devido a sua diversidade de espécies, papel ecológico, potenciais aplicações e habilidade de alternar seu modo de vida entre endofítico e outros (VENOGUPALAN et al., 2015).

Alguns autores sugerem que certos endofíticos atuam de forma indireta através da indução de mecanismos de defesa ou promovendo o crescimento da planta em uma tentativa de superar a apoptose induzida pela infecção (BERG e HALLMANN, 2006), facilitando a germinação da semente (LEE et al., 2017) ou ainda, atuam de forma direta produzindo metabólitos capazes de atacar qualquer antagonista ou lisar células afetadas. Tais substâncias são muitas vezes enzimas como celulase e lignase, produzidas por fungos do gênero *Xylaria* e fitormônios como a giberelina, produzida por *Fusarium moniliforme* (STROBEL, 2003), conferindo uma defesa biológica contra fitopatógenos (LI et al., 2017), que prolongam a sobrevivência e competitividade da planta no ambiente, permitindo pleno desenvolvimento (SHI et al., 2016).

Segundo Shi et al., (2016) devido às limitações das técnicas de isolamento atuais, um grande número de fungos endofíticos provavelmente ainda não tenham sido isolados, uma vez que estes microrganismos muitas vezes são incapazes de crescer em meio de cultura ou possuem crescimento muito lento, sofrendo inibição por seus competidores presentes *in vitro*.

Um dos produtos de maior relevância na história dos produtos naturais, isolado inicialmente em uma árvore do Pacífico, *Taxus brevifolia*, foi a droga

anticancerígena Taxol (ALVIN et al., 2014), desencadeando uma série de estudos que apontaram diversas árvores do gênero como produtoras deste mesmo bioativo. Estudos posteriores acerca dos endofíticos hospedeiros desta planta, como o fungo *Taxomyces adreanae*, demonstraram que este microrganismo é capaz de produzir exatamente o mesmo composto que sua planta hospedeira (STIERLE et al., 1995). A transferência horizontal de genes entre planta e hospedeiro foi proposta durante muito tempo a fim de explicar a produção desta biomolécula. Recentemente, um estudo realizado por Heinig et al. (2013), demonstrou não haver qualquer sequência de genes com homologia significativa para biossíntese de Taxol entre endofíticos e *Taxos* spp., demonstrando que tais características se desenvolveram de formas independentes.

Embora os pesticidas químicos sejam usados com sucesso na agricultura, causam problemas em águas residuais e subterrâneas, resíduos em alimentos e aumenta a resistência na população de patógenos e pragas, sem contar seus efeitos em população “não alvo”. Assim, métodos e estratégias alternativas são objetos de estudo, como o controle biológico, que vem ganhando espaço por ser menos agressivo, eficiente e de menor custo de manutenção (AMORIM; REZENDE, 2011).

Além dos fitopatógenos, por fungos filamentosos queratinofílicos, que utilizam a queratina como nutriente durante a infecção de pele, cabelos e unhas, causadores de micoses subcutâneas estão entre as infecções fúngicas mais comuns e difíceis de cura. Esses fungos são denominados dermatófitos que incluem os gêneros: *Trichophyton* sp e *Microsporum* sp. O tratamento é geralmente longo e oneroso, podendo ser combinados de drogas de uso tópico e oral na tentativa de aumentar a taxa de cura. As dermatofitoses são geralmente associadas a recidivas que se seguem à interrupção da terapia antifúngica que é muito tóxica ao indivíduo devido aos fortes efeitos colaterais. Desta forma, novos fármacos antimicóticos são alvo de grande importância (DEGREE, 2008).

Com isso, novas atenções vêm sendo dadas à química e atividades dos metabólitos produzidos por este grupo de fungos e, também, para suas funções ecológicas (TAN et al., 2001). Os estudos dos endofíticos em plantas tropicais têm recebido ultimamente muita atenção, possivelmente pela diversidade, pelo excelente potencial de fonte de novos compostos biologicamente ativos e pelos benefícios que podem proporcionar às plantas (ZIMMERMAN et al., 2012).

1.2. Metabolismo secundário de fungos endofíticos

Metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultura, durante o crescimento e diferenciação do organismo vivo e têm sido isolados e caracterizados principalmente para fins industriais (TAN et al., 2001). Muitos endofíticos possuem a capacidade de sintetizar vários metabolitos bioativos que podem ser usados direta ou indiretamente como agentes terapêuticos (KHARWAR et al, 2011; KUSARI e SPITELLER, 2012), dentre estas estão camptotecina, vincristina, vinblastina, huperzina, podofilotoxina, diosgenina e azadiractina, entre outras (ZHAO et al., 2011), como apresentado na tabela 1.

Os fungos filamentosos são conhecidos por biossintetizar uma excelente quantidade de metabolitos secundários, chegando a uma produção 73% que de outras espécies de microrganismos (DREYFUSS et al., 2001). Hoje em dia, a gama de bioativos derivados de fungos se estende a antibióticos, imunossupressores, antidiabéticos, anticancerígenos, etc. (VERUGOPALAN, 2015) (Tabela 1).

Tabela1: Exemplos de metabolitos secundários de alto valor isolados de endofíticos.

Metabólito	Bioatividade	Cepa	Referência
Azadiractin A e B	Pesticida natural	<i>Eupenicillium parvum</i>	Kusari et al. (2012b)
Berberina	Antibiótico; antidiabético; anti-inflamatório; anticâncer	S6	Gao et al. (2008)
Camptotecina	Anticâncer	Diversas cepas	Zhao et al. (2010)
Cytochalasins	Anticâncer; antibiótico	<i>Rhinocladiella</i> sp.,	Strobel and Daisy (2003)
Digoxin glycoside	Cardiotônico; diurético; antiepilético	Diversas cepas	Kaul et al. (2012)
Diosgenin	precursor de progesterona; redutor do colesterol	<i>Cephalosporium</i> sp.	Zhao et al. (2010)
Emodin	Antidiabético; antiviral; anticancerígeno	<i>Paecilomyces</i> sp.	Zhao et al. (2010)
Gentiopicrin	Anti-malarial; fungicida; larvicida	<i>Thielavia subthermophila</i> INFU/Hp/KF/34B	Yin et al. (2009)
Ginkgolide B	Tratamento de doenças cardiovasculares; cerebrovasculares e enxaqueca	<i>Fusarium oxysporum</i> SYP0056	Cui et al. (2012)

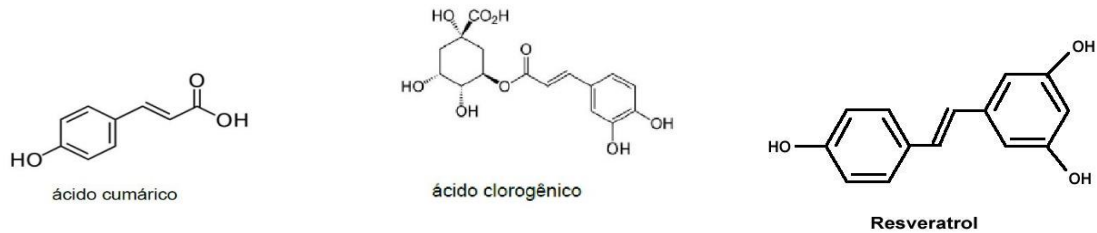
Gimemagenin	Antidiabético	<i>Penicillium oxalicum</i>	Parthasarathy and Sathiyabama (2014)
Huperzine A	Tratamento de doenças neurodegenerativas	Diversas cepas	Zhao et al. (2010)
Hypericin	Antidepressivo; anti-inflamatório; antimicrobiano; antiviral; antioxidante	<i>Thielavia subthermophila</i> INFU/Hp/KF/34B	Zhao et al. (2010)
Kaempferol	Antioxidante; anticancerígeno	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Chaturvedi et al. (2014)
Lapachol	Anticancerígeno	<i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria alternata</i>	Nirupama et al. (2011)
Piperine	Antidepressivo; anti-inflamatório; antimicrobiano; antiviral; antioxidante	<i>Periconia</i> sp.	Verma et al. (2011)
Podophyllotoxin	Anticancerígeno	Diversas cepas	Zhao et al. (2010)
Quercetin glycoside	Anti-hipertensivo; anti-inflamatório; anticancerígeno; antioxidante	<i>Penicillium</i> sp. Gh01	Nair and Padmavathy (2014)
Rhein	Antitumoral; anti-inflamatório; antimicrobiano; homeostático	<i>Fusarium solani</i> R13	You et al. (2013)
Rohitukine	Anti-inflamatório; imunomodulador; anticancerígeno	<i>Fusarium proliferatum</i>	Kumara et al. (2012)
Sanguinarine	Anticancerígeno	<i>F. proliferatum</i> BLH51	Wang et al. (2014b)
Sipeimine	Expectorante	<i>Fritillaria ussuriensis</i> Fu7	Yin and Chen (2008)
Subglutinols A e B	Imunossupressor	<i>Fusarium subglutinans</i>	Lee et al. (1995)
Taxol	Anticancerígeno	Diversas cepas	Zhao et al. (2010); Strobel and Daisy (2003); Strobel et al. (2001); Strobel et al. (1999)
Vincamine	Vasodilatador; estimulante cerebral	XM-J2	Yin and Sun (2011)
Vincristine e Vinblastine	Anticancerígeno	Diversas cepas	Zhao et al. (2010)

Fonte: Venugopalan et al., 2015 (modificado).

1.3. Compostos Fenólicos

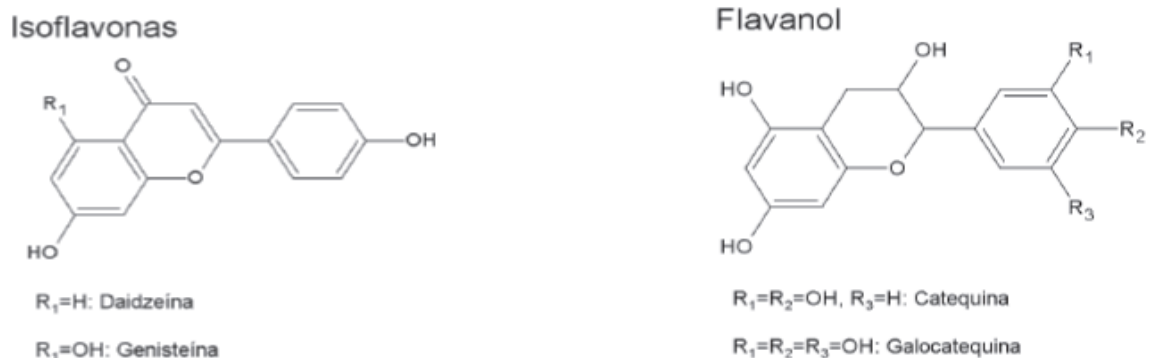
Compostos fenólicos possuem uma, ou mais (polifenóis) hidroxilas ligadas a um anel benzênico (figura 1). Tal estrutura química determina sua capacidade de atuar como sequestrador de radicais livres.

Figura 1- Fórmula molecular de diferentes compostos fenólicos.

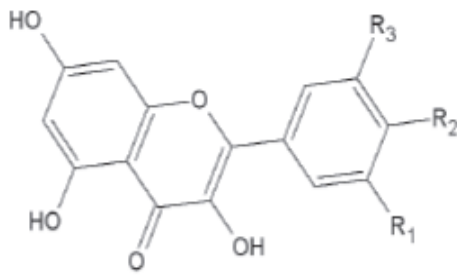


Apesar de possuírem grupo característico de álcool (-OH), esta classe possui propriedades especiais, sendo muito mais ácidos devido a presença de um anel benzênico que confere estabilidade aos produtos de oxidação dos fenóis. Por serem mais ácidos, as oxidações destas moléculas ocorrem mais rapidamente que de outros presentes no organismo, funcionando como antioxidante para estas outras moléculas e protegendo a integridade no organismo formador (SOARES et al., 2008). Os polifenóis caracterizam-se por possuírem múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura, estando divididos em classes de acordo com o número de anéis fenólicos e demais estruturas ligadas a este. Os dois principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos e flavonoides, sendo os primeiros classificados em ácidos benzoicos e derivados e ácidos cinâmicos e derivados. Já os flavonoides encontram-se divididos nas subclasses flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanois, isoflavonas e antocianinas (HOENSCH, 2015; JOHNSTON, 2015), apresentado na figura 2

Figura 2: Subclasses de flavonóides



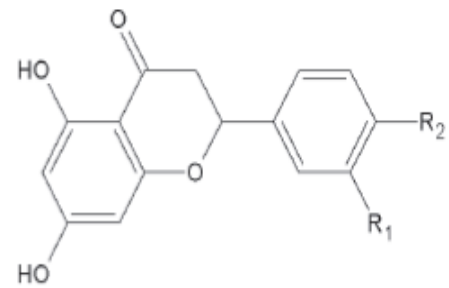
Flavonóis



$R_3=H, R_1=R_2=OH$: Quercetina

$R_1=R_2=R_3=OH$: Miricetina

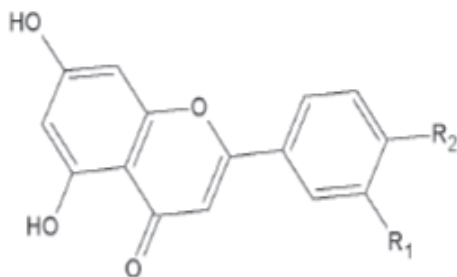
Flavanonas



$R_2=OH, R_1=H$: Naringenina

$R_1=OH, R_2=OCH_3$: Hesperitina

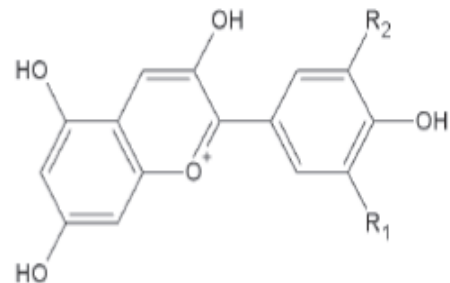
Flavonas



$R_2=OH, R_1=H$: Apigenina

$R_1=R_2=OH$: Luteolina

Antocianidinas



$R_1=OH, R_2=H$: Cianidina

$R_1=R_2=OCH_3$: Malvidina

Fonte: Molnár-Perl et al., 2005 (modificado).

Compostos fenólicos são normalmente metabólitos secundários de plantas, geralmente envolvidos na defesa contra organismos patogênicos e raios ultravioleta, (ARCHELA et al., 2013). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em derivados de ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico que conferem propriedades antioxidantes aos vegetais que os possuem.

Estes antioxidantes podem ser divididos em primários e secundários. Antioxidantes secundários atuam interrompendo a cadeia de reação radicalar, reagindo com radicais para formarem produtos termodinamicamente estáveis ou complexos mais estáveis que o radical livre precursor, retardando a etapa que precede a formação de radicais por diferentes mecanismos, como a complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singleto (JORGE, 2007). Já os polifenóis, possuem anéis benzênicos capazes de estabilizar produtos oxidativos formados, além

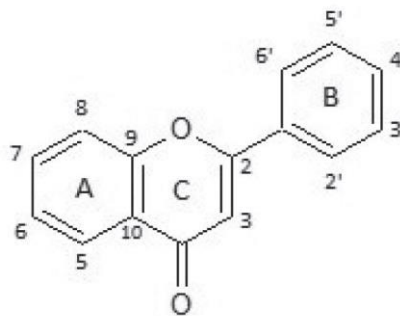
de serem bons complexantes de metais, o que os impede de agir como catalisadores de reações radicalares, atuando como antioxidantes primários.

Espécies reativas de oxigênio podem iniciar a peroxidação de lipídeos na membrana gerando acúmulo de peróxidos de lipídeos. Seus produtos, altamente reativos, reagem com substratos biológicos como proteínas, amins e moléculas de DNA, podendo levar a doenças degenerativas (ARCHELA, 2013).

1.3.1. Flavonóides

Flavonoides são compostos químicos hidrossolúveis, de baixo peso molecular que apresentam na sua formula 15 átomos de carbono, na forma C3-C6-C3, baseada no núcleo de dois anéis benzênicos, diferindo entre si pela sua estrutura química, como demonstrada na figura 4 (BERNARDES et al., 2010). Esses compostos podem ser encontrados nas folhas, frutos, sementes e flores e são amplamente distribuídos no reino vegetal. Nos alimentos, encontram-se geralmente na forma de O-glicosídeos, com uma molécula de açúcar (comumente glicose, galactose, ramnose e frutose) ligada na posição 3 ou 7 (DEMETRA, 2017).

Figura 3: estrutura química básica dos flavonoides



Fonte: Dornas et al., 2008.

Mais de oito mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonoides já foram identificadas até hoje (KOIRALA et al., 2016). São pigmentos naturais importantes e nas plantas tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (LOPES et al. 2010) graças a capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos (VINAYAGAM, 2015). Tais moléculas estão relacionadas a uma ampla variedade de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antiviral, entre outras (PEREIRA, 2012; CHO et al., 2013).

O interesse pelas atividades farmacológicas e bioquímicas dos flavonoides tem aumentado bastante, fato observado pela vasta literatura científica, onde se encontram diversas publicações que visam discutir e revelar a atividade biológica destas biomoléculas (CERQUEIRA, 2013).

1.4. Corantes e Pigmentos fúngicos

De acordo com o *Electronic Code of Federal Regulations* (2007)

Corante é uma tinta, pigmento, ou outra substância feita por um processo de síntese, ou extraído, isolado, ou derivado de outro modo, com ou sem mudança intermediária ou final de identidade, de um vegetal, animal, mineral ou outra fonte e que, quando adicionado ou aplicado a um alimento, medicamento, ou cosmético ou ao corpo humano, é capaz (sozinho ou através de reação com outra substância) de conferir uma cor a estes.

Colorantes são aditivos utilizados com a finalidade de atribuir cor. Eles podem ser classificados como pigmentos (insolúveis no meio aplicado) ou corantes (solúveis no meio aplicado), mas usualmente esses termos são empregados como sinônimos (MAPARI et al., 2010).

Pigmentos naturais e corantes sintéticos tem sido usados, amplamente, nos diversos campos industriais, como têxtil, farmacêutica, alimentos e papel e celulose (MONTEIRO, 2016). Sendo este último grupo uma enorme fonte de poluição ambiental.

Anteriormente ao uso de corantes sintéticos, após a Segunda Revolução Industrial, os pigmentos naturais representavam a única fonte de corantes, amplamente utilizados e comercializados, gerando riquezas em todo o mundo. Devido ao crescente apelo por um estilo de vida mais saudável e causador de menos impactos ao ambiente, é crescente o surgimento de pesquisas voltadas à produção de corantes naturais (GRIFONI et al., 2009).

Plantas, animais (insetos) e microrganismos (bactérias e fungos) são as principais fontes de corantes naturais (MENDONÇA, 2011), que por sua vez possuem boa confiabilidade devido a inexistência de toxicidade e potencial carcinogênico, além

de serem caracterizados como biodegradáveis na natureza (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013; MONTEIRO, 2016).

A obtenção de corantes de origem fúngica, por sua vez, é viável por seu alto rendimento, pois não depende de efeitos sazonais, como as plantas, e permite a produção em um pequeno espaço e em larga escala (MAPARI et al., 2009; VALDUGA et al., 2009; VELMURUGAN et al., 2010).

Na indústria têxtil, a substituição de corantes sintéticos por outros de fonte não sintética também seria viável pela diminuição da toxicidade ambiental gerada, porquanto essas indústrias utilizam extensamente os corantes como matéria-prima, e por isso, geram uma grande quantidade de resíduos tóxicos (MIRJALIL et al., 2011; VELMURUGAN et al., 2010a). Isso ocorre pelo fato de que esses compostos, derivados do petróleo, são em sua maioria xenobióticos, ou seja, os microrganismos ambientais não contêm enzimas específicas para a degradação deste tipo de composto. Já os corantes naturais são biodegradados mais facilmente, o que evita o seu acúmulo na natureza (ALI, 2010; MIRJALIL et al., 2011).

Sendo assim, pesquisas com fungos capazes de produzir corantes são importantes para suprir as crescentes necessidades industriais, que precisam adequar-se às exigências para a redução do uso de substâncias tóxicas (CHATTOPADHYAY et al., 2008; CHENGAI AH et al., 2010).

Os pigmentos produzidos por fungos encontram-se divididos em dois grupos principais: carotenoides e policetídeos (MAPARI et al., 2010). Entre os policetídeos estão as quininoas, flavonoides, melaninas, azafilonas (MAPARI et al., 2005; MAPARI et al., 2010; JALMI et al., 2012), em sua maioria policetídeos aromáticos poliidroxilados (PASTRE et al., 2007). Geralmente, são formados pela condensação de unidades acetil CoA e malonil CoA, moduladas pelas enzimas policetídeo sintases, que alongam as cadeias dessas moléculas e são responsáveis pela grande diversidade de estruturas formadas (RENHE et al., 2006; CELESTINO, 2013).

Já os carotenoides, grupo com mais de 600 estruturas distintas (VALDUGA et al., 2009), são sintetizados através da via de biossíntese dos terpenoides e consistem de sucessivas unidades de isopreno, unidas de maneira que os dois grupos metílicos centrais ficam separados por três carbonos, além da possível presença de

estruturas cíclicas (JULSING et al., 2006). As enzimas que participam ativamente da síntese destas estruturas, utilizam metabolitos primários e moléculas simples do meio na construção de outras substâncias, em geral de baixo peso molecular (RUIZ et al., 2010).

Segundo Ruiz et al. (2010), além da regulação genética estas enzimas sofrem influência das variações do meio. Sendo assim, alterações de temperatura, pH ou a presença de determinado nutriente, é capaz de direcionar rotas metabólicas para produção de diferentes compostos por um mesmo microrganismo (FURTADO et al., 2005)

Diferentemente de plantas e algas, os fungos representam um meio biotecnológico mais interessante de produção de pigmentos, uma vez que podem ser cultivados por técnicas já existentes (WISSGOTT e BORTLIK, 1996) apresentando ainda, rápida taxa de crescimento e viabilidade de desenvolvimento de bioprocessos.

Como o desenvolvimento de vegetais superiores e animais são mais lentos que o de microrganismos e, estes últimos se destacam pela potencial produtividade para processos industriais, uma vez que sobrepõem problemáticas como alto custo de produção e fonte reduzida de material (BABITHA, 2009; VENIL et al., 2013).

Diversos estudos demonstram a capacidade de fungos produzirem antocianinas, licopeno, carotenoides e outros pigmentos seguros e com alto potencial antioxidante (Li et al., 2017). Pigmentos solúveis produzidos por fungos exibem uma ampla faixa de colocação quando comparados a pigmentos carotenoides (MAPARI et al., 2005), como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2: Pigmentos não-carotenoides produzidos por fungos promissores para indústria de alimentos.

Fonte	Pigmento	Cor	Comentários
<i>Monascus</i> spp.	Monascorubrina Rubropunctatina Monascina Ankaflavina Monascusonas	Laranja Laranja Amarelo Amarelo Amarelo	Pigmento muito conhecido no Oriente, autorizado no Japão, estável ao calor e pH, forma pigmentos solúveis reagindo com aminoácidos no meio
<i>Epicoccum nigrum</i>	Flavipina Orevactaena Desconhecido	Amarelo Laranja Amarelo	Solúvel em água, antioxidante, alto poder de coloração, estimula a produção de astaxantina em fungos

<i>Paecilomyces Sinclairii</i>	Desconhecido	Vermelho em pH 3-4, violeta em pH 5-9 e rosa em pH 10-12	Estável à luz, alta produção em cultivo submerso, caracterização química necessária
<i>Penicillium herquei</i>	Atrovenetina	Amarelo	Antioxidante
<i>Roesleria hypogea e Penicillium atrovenetum</i>	Herqueinona Norherqueinona Outros	Vermelho Vermelho Verde azulado	
<i>Penicillium oxalicum var. armeniaca</i>	Arpink Red™	Vermelho escuro	Estável ao pH e calor, patenteado em mais de 120 países
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Purpurogenona Mitorubrina Miturubrinol	Amarelo-laranja Amarelo Laranja a vermelho	Pigmento extracelular dependente do meio
<i>Penicillium Persicinum</i>	Desconhecido	Rosa avermelhado	Grande quantidade de pigmento exógeno, ainda não caracterizado
<i>Penicillium fagi</i>	Desconhecido	Azul esverdeado	Presente no micélio, não caracterizado

Fonte: Adaptado, MAPARI et al., 2005.

Uma série de pigmentos naturais, além de conferir cor, podem trazer benefícios à saúde, podendo auxiliar no tratamento de doenças (MONTEIRO, 2016), entre eles destacam-se o carmim cúrcuma e curcumina, clorofilas, betalaínas e pigmentos *Monascus* (VOLP, RENHE e STRINGUETA, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Microrganismos, no geral, possuem diversas aplicações biotecnológicas citadas na literatura, porém, fungos e bactérias compõem grupos ainda pouco estudados no que diz respeito às aplicações dos seus produtos do metabolismo secundário. Fungos endofíticos são, particularmente, uma fonte ainda pouco explorada de novas substâncias com potencial biotecnológico, capazes de serem aplicadas nas mais diversas áreas da indústria, medicina, agropecuária, têxtil, química e alimentícia.

Cerca de um quarto de todos os produtos naturais, isolados até o momento, são originários de fungos, percebe-se que estes são uma fonte estratégica para a descoberta de novas moléculas com as mais diversas funcionalidades, uma vez que se assume a produção destas biomoléculas pelos microrganismos para sua própria manutenção.

O apelo cada vez maior por substâncias de origem natural, com maior valor agregado e causadores de menores danos ao meio ambiente, torna a prospecção por estas biomoléculas de fundamental importância para a biotecnologia destinada à indústria, em destaque a alimentícia e farmacêutica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a presença de pigmentos naturais e compostos bioativos de fungos endofíticos associados à *Manilkara salzmanii* (A. DC.) H. J. Lam e realizar caracterização físico-química destes metabólitos.

3.2. Objetivos Específicos

- Bioprospectar fungos endofíticos provenientes de diferentes tecidos (caule e folha) de *Manilkara salzmanii*, isolando os possíveis produtores de metabólitos secundários de interesse biotecnológico;
- Extrair e identificar biomoléculas produzidas em escala laboratorial, provenientes do metabolismo secundário dos microrganismos isolados;
- Avaliar a presença de pigmentos naturais e biomoléculas dos extratos dos isolados fúngicos;
- Realizar bioensaios antimicrobianos com os compostos isolados;
- Realizar a identificação molecular dos fungos de interesse.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do espécime botânico

O conhecimento da comunidade endofítica de um vegetal tem início com o isolamento seguido da caracterização destes microrganismos. Para tanto, tecidos saudáveis (folhas e caules) da espécie *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam foram coletados na área de restinga do Parque das Dunas (UNIDUNAS), Salvador-BA (figura 4) e acondicionados em envelopes de papel para preparo da exsicata destinada a identificação de microrganismos de interesse.

Figura 4- Área de restinga do Parque das Dunas (UNIDUNAS), Salvador-Ba



Fonte – Próprio autor.

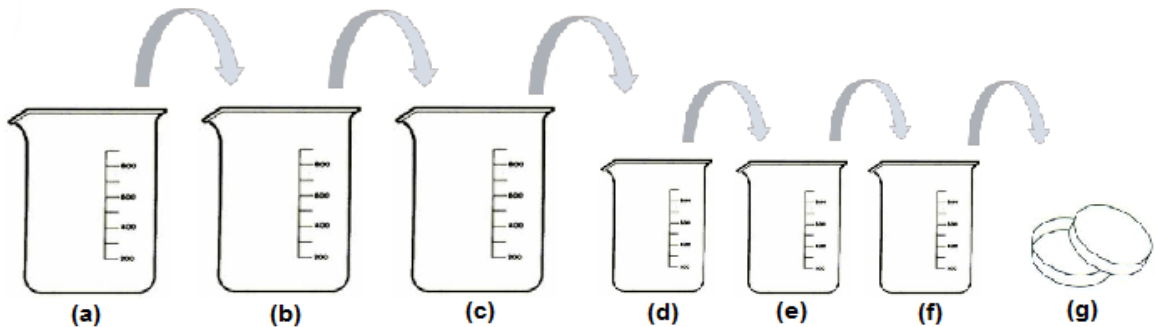
Os tecidos com aparência sadia coletados foram encaminhados ao laboratório de Biotecnologia Industrial – UFBA os quais foram lavados cuidadosamente com água corrente até 3h após a coleta, posteriormente com água destilada esterilizada a fim de remover o excesso de resíduos sólidos.

4.1.1. Isolamento dos Microrganismos

O material coletado foi submetido ao processo descrito por Petrini *et al.*, (1992) para a obtenção dos fungos endofíticos. A desinfecção ocorreu em fluxo laminar por meio de banhos sucessivos de álcool 70%, por 2 minutos, solução de hipoclorito de sódio, por 3 minutos, álcool 70%, por 30 segundos e, por fim, o material foi lavado por três vezes em água destilada para retirada do excesso de álcool (Figura

5.2). Os controles foram efetuados com a inoculação de 100µL da última água de lavagem em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky e encubados por 48h à 30°C.

Figura 5 - Esquemática do procedimento de desinfecção de amostras: (a) e (c) álcool 70% INPM; (b) hipoclorito de sódio 3%; (d), (e) e (f) água destilada; (g) placa de Petri contendo meio BDA. Fonte: próprio autor



Fonte – próprio autor.

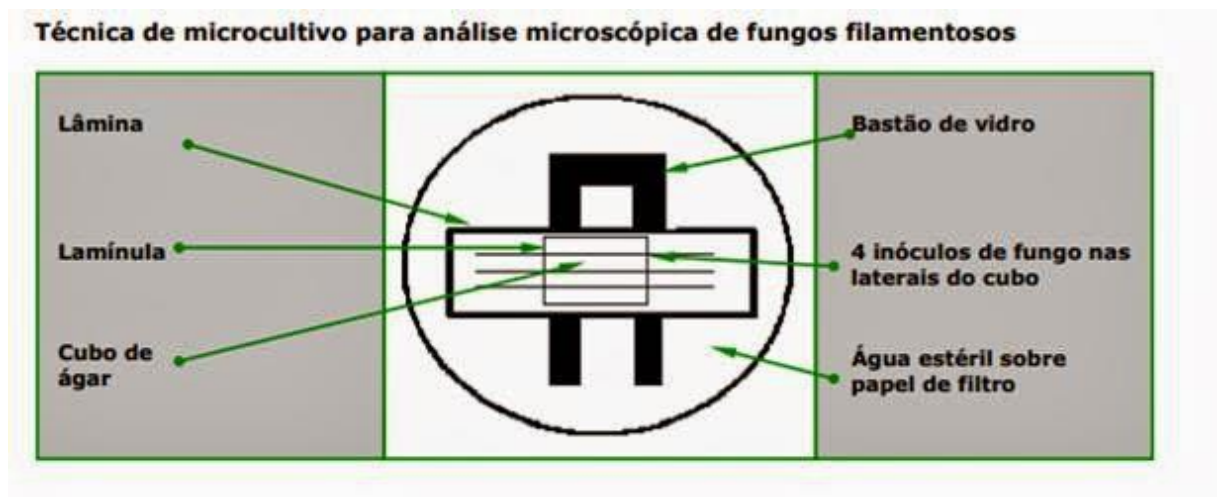
Após a desinfestação da superfície das amostras, foram retirados discos foliares (5 mm) e fragmentos do caule (5 mm), transferidos para placas de Petri contendo o meio Batata Dextrose Ágar (BDA), posteriormente incubados à 25°C, por até 20 dias. Para cada tecido utilizado foram preparadas 10 placas de isolamento. A avaliação do crescimento das colônias foi realizada a partir do terceiro dia, em intervalos de dois a cinco dias, seguindo de repicagem para obtenção de colônias puras destinadas à identificação macroscópica e microscópica das estruturas de reprodução e avaliação de suas características, a fim de auxiliar na identificação das espécies estudadas (KERN e BLEVENS, 1999).

4.1.2. Microcultivo dos Endofíticos Isolados

Seguindo a metodologia de Kern e Blevens (1999) foi realizada a Técnica do Microcultivo em lâmina. Para cada colônia de fungo isolada, duas placas de microcultivo foram preparadas. Foi colocado sobre uma lâmina esterilizada sobre um pequeno bastão de vidro recurvado, contida em uma placa de Petri estéril, forrada com papel de filtro, um fragmento em cubo de Agar Sabouraud Dextrose e também um em Agar Batata Dextrose. O fungo foi inoculado nos quatro cantos do cubo de ágar nos diferentes meios e as lâminas foram recobertas com lamínulas esterilizadas.

O papel de filtro foi umidificado com 0,5mL de água destilada estéril, fazendo uma câmara úmida no fundo da placa, evitando-se o ressecamento do meio de cultura durante o crescimento do microrganismo (figura 6). A placa foi tampada e incubada à 30°C por 7 a 10 dias, até a observação do desenvolvimento de crescimento com ou sem pigmentação. Após este período a lamínula foi retirada cuidadosamente com auxílio de uma pinça. O cubo de ágar foi desprezado e, em seu lugar, pingou-se uma gota de corante lactofenol-azul-algodão e uma lamínula foi colocada, para visualização das estruturas. Nesta etapa foram observados por microscopia eletrônica a colônia, micélio, estruturas de esporulação, forma dos esporos e coloração. Com base na morfologia da cepa e seguindo o Manual de Identificação de Fungos, a identificação inicial do microrganismo pôde ser executada.

Figura 6: Esquema de Microcultivo de fungos filamentosos



4.2. Ensaio de antagonismo

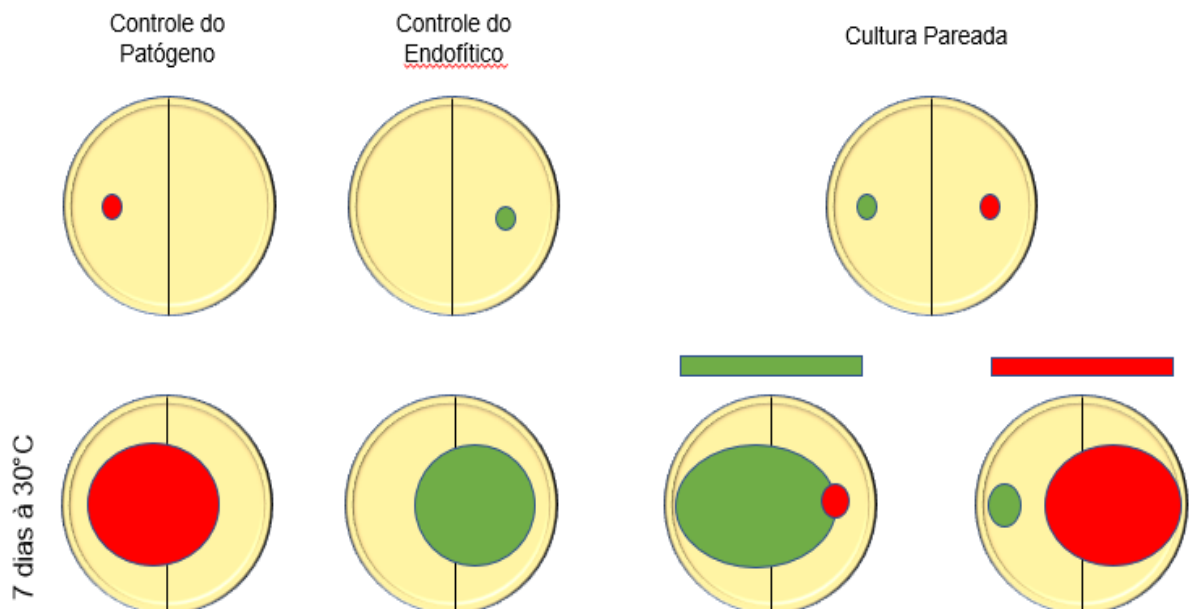
A cultura pareada em disco de Agar foi utilizada como método de rastreamento de atividade fungistática e fungicida, pois permite medir o crescimento micelial bem como detectar interações de antagonismo, competição, parasitismo e predação. O Método da cultura pareada é largamente utilizado em estudos de antagonismo *in vitro* e altamente eficiente na prospecção de microrganismos produtores de biomoléculas que possam ser utilizadas visando o controle de fitopatógenos (ROCHA, 2009).

Após a identificação do microrganismo de interesse para prosseguimento deste trabalho (fungo isolado C2C3), foram pesquisados fungos fitopatógenos, de culturas de interesse na Bahia e patógenos humanos e de animais, destinados aos testes de antagonismo. As cepas ATCC selecionadas foram concedidas pela Fundação

Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, sendo elas: *Alternaria alternata* (ATCC 46582), *Aspergillus flavus* (ATCC 16883, CBS 100927, CBS 569.65), *Aspergillus níger* (ATCC 1004, CBS 104.57), *Fusarium oxysporum* (ATCC 48112), *Fusarium solanni* (ATCC 36031), *Microsporium gypseum* (ATCC 14683), *Rhizopus microsporus* (IPEC 13/02), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533, Emmons 6402) e *Trichophyton rubrum* (ATCC 28189). A descrição das cepas está em anexo.

O teste de antagonismo realizado consistiu na divisão da Placa de Petri ao meio com auxílio de uma caneta marcadora, de modo a se obter dois lados opostos de mesmo tamanho destinados a receber, cada um, um disco de 5mm de micélio do patógeno e outro do isolado endofítico C2C3. Como controle, foram utilizadas outras duas placas de mesma divisão que receberam em lados correspondentes, discos de 5mm de micélio dos mesmos microrganismos utilizados a fim de observar o comportamento de crescimento, como encontra-se esquematizado na figura 7. Os testes foram realizados em triplicata.

Figura 7: Esquematização do teste de confronto entre colônias.



Fonte: Próprio autor.

4.3. Cultivo em Pequena Escala e Obtenção dos Extratos

Após a identificação do potencial fungistático apresentado pelo fungo selecionado para este trabalho, foi realizado cultivo líquido em pequena escala para obtenção do extrato fúngico contendo o pigmento e demais metabólitos.

A cepa C2C3 foi cultivada em meio BDA à 30°C por sete a dez dias. Foram realizados repiques em placas de Petri contendo meio BDA. Após este período, foram retirados sete discos de micélio (5 mm) para cultivo em erlemmeyer contendo 250mL de caldo Sabouraud, por quatorze dias à 30°C, auge da pigmentação, observado anteriormente. Os micélios foram separados do meio de cultivo por filtração em membrana CHROMAFIL® O-20 (0,22 µm) e, então, destinados a preservação do fungo. O extrato contendo o pigmento e demais metabólitos foi acondicionado ao abrigo da luz e estocado a 2°C (geladeira) para análises futuras e uma parcela destinada a confecção estoque.

4.4. Bioensaio fungicida

O extrato obtido do fungo C2C3, que apresentou antagonismo aos fitopatógenos no ensaio de cultura pareada, em triplicata, foi também testado quanto ao seu potencial fungicida segundo a metodologia desenvolvida por Abiala (2010).

Um disco (5mm de diâmetro) de micélio do fitopatógeno foi inoculado em tubo contendo 10 mL de água destilada estéril e submetido ao vórtex por três minutos. Em seguida, 100 µL da suspensão de fragmentos de micélio foram inoculados em tubos com 9,9 mL de 50 % de extrato, 20% de extrato, 10% de extrato, 5% de extrato e 100% água destilada estéril (testemunha), respectivamente. Os tubos foram incubados a 30°C por 1 hora. Em seguida, 500 µL de cada teste foram espalhados em placas de Petri contendo Meio ASD e incubados a 30°C, por três dias. No terceiro dia foi feita a contagem de colônias em crescimento para cálculo do índice de inibição, ou crescimento significativo, de acordo com a seguinte fórmula:

$$MG = \frac{WG - TG}{TG}$$

Onde WG corresponde ao crescimento no controle ou testemunha, TG corresponde ao crescimento no teste e MG corresponde ao crescimento significativo, onde:

- MG = 1: Não houve crescimento micelial na placa teste; 100% dos fragmentos de micélio viáveis, em 100 μ L de suspensão micelial foram inibidos em até três dias;
- MG < 0,5: 50% dos fragmentos viáveis, presentes em 100 μ L de suspensão micelial foram inibidos em até três dias;
- MG = 0: O crescimento no tratamento foi idêntico ao crescimento na testemunha; O efeito do tratamento foi nulo;
- MG < 0: Houve crescimento maior na placa teste do que na testemunha O extrato na concentração em questão potencializou o crescimento dos fragmentos de micélio.

4.5. Preservação dos isolados e extrato fúngico

O microrganismo selecionado para este trabalho e seu extrato foram destinados a formação de uma coleção de culturas e estoque de extratos, respectivamente. Amostras do fungo de 2g foram pesadas, acondicionadas em criotubos de 4,5mL, posteriormente liofilizadas. O extrato produzido foi armazenado em porções de 3 e 7mL em tubos de vidro e posteriormente liofilizados para formação do estoque.

4.6. Ensaio físico-químico do extrato

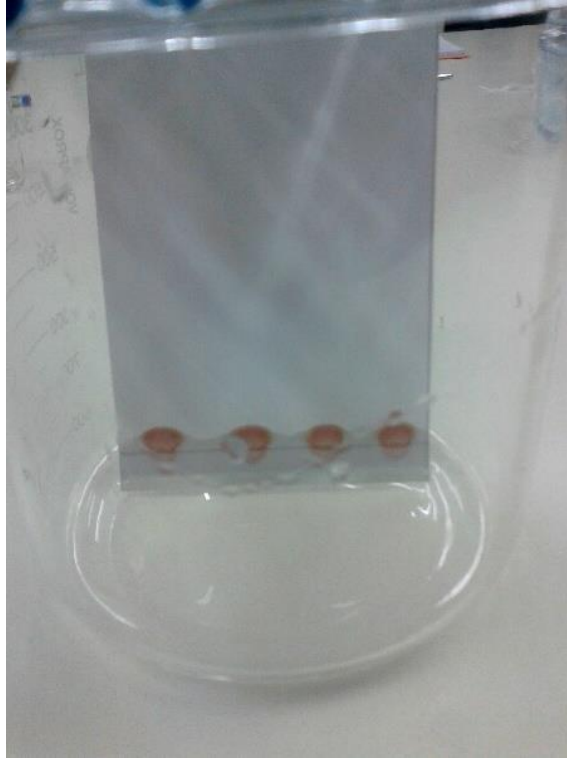
4.6.1. Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em papel é uma técnica de separação por partição líquido-líquido. Como a fase estacionária é um líquido, o processo de separação ocorre por partição, baseado nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária.

A fim de avaliar a polaridade apresentada pelos componentes do extrato fúngico, foram testados diferentes solventes em grau de polaridade crescente (Hexano < ciclohexano < Benzeno < Diclorometano < Clorofórmio < Éter Etílico < Acetato de Etila < Acetona < Etanol < Etanol 70% < Água), como fase móvel.

Uma pequena amostra do extrato filtrado foi depositada sobre a placa cromatográfica com o auxílio de um capilar de vidro e, o local de início na corrida marcado com lápis, de acordo com a figura 8.

Figura 8: Cromatografia em Camada Delgada com amostras do extrato metabólico fúngico.



Fonte: próprio autor.

4.6.2. Compostos Fenólicos

O teor de fenólicos totais foi determinado usando o reagente de Folin Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965; SINGLETON et al., 1999). Foi preparada a reação contendo uma alíquota de 0,5mL do extrato (dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de 200 μ g/mL), 2,5mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0ml de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi mantida em banho-maria a 50°C durante 5 minutos e então, realizada a leitura em espectrofotômetro LAMBDA 25 UV/Vis Systems (PerkinElmer USA), a uma absorvância de 765nm.

A quantidade de compostos fenólicos totais é expressa como equivalentes de ácido gálico [g de ácido gálico (GAE) em 100g de amostra] através da construção de uma curva analítica utilizando soluções conhecidas do padrão ácido gálico nas mesmas condições ($\lambda = 765\text{nm}$).

Para isto, foram utilizados dois extratos fúngicos preparados em tempos diferentes de dois anos, um ano (denominados extrato velho e extrato novo, respectivamente), a fim de se avaliar a presença de tais compostos, bem como sua variação ao longo do tempo. Os extratos foram secos em estufa à 25°C a fim de que não se percam compostos voláteis. O experimento foi realizado em triplicata.

4.6.3. Flavonoides

A determinação do teor de flavonoides foi realizada através de leitura em espectrofotômetro (LAMBDA 25 UV/Vis Systems - PerkinElmer USA) a 415nm, utilizando-se cloreto de alumínio 2% em metanol (MARCUCCI et al., 2001), numa solução 1:1 do extrato fúngico e cloreto de alumínio. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções conhecidas do padrão quercetina para a elaboração de uma curva padrão e, a quantidade de flavonoides totais será expressa como equivalentes de quercetina (g de quercetina (GQ) em 100g do extrato). Os testes foram realizados em triplicata com amostras de dois anos, um ano e uma semana do extrato fúngico evaporado em estufa à 25°C.

4.6.4. Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* (DPPH)

O método baseia-se na redução do radical livre estável de nitrogênio DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil). Esta molécula é caracterizada como um radical livre estável em virtude do elétron desemparelhado da molécula. Pela ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (entre 515-520nm), com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

A atividade antioxidante *in vitro* da amostra foi avaliada utilizando o reativo 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil (BRAND-WILLIAM et al., 1995; MOLYNEUX, 2004). Foram preparadas 5 diluições dos extratos, em triplicata. Uma alíquota de 1mL de cada diluição do extrato foi transferida para tubos de ensaio com 3,0 mL da solução etanólica do radical DPPH (0,004%). Após 30min de incubação, no escuro e à temperatura ambiente, a redução do radical livre DPPH foi mensurada pela leitura da absorbância em 517nm (Espectrofotômetro LAMBDA 25 UV/Vis Systems - PerkinElmer USA). O mesmo procedimento foi adotado com etanol no lugar da amostra, sendo considerado como branco.

A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

Fórmula 3: $Atividade\ antioxidante\ (\%) = [(A_{controle} - A_{amostra}) / A_{controle}] \times 100$

4.6.5. HPLC - High-performance liquid chromatography (HPLC) qualitative

Para a determinação do perfil de compostos fenólicos no extrato metabólico, foi realizada análise em HPLC (High-performance liquid chromatography), marca Shimadzu com detetor de fluorescência, diretamente do extrato produzido, sem tratamento prévio. Através desta técnica foi possível separar as moléculas com base nas suas diferenças de hidrofobicidade. Amostras do extrato foram rotaevaporadas e fracionadas em hexano, metanol e etanol. As leituras foram realizadas em 320, 360 e 520nm. Os padrões de compostos fenólicos utilizados foram todos da Sigma ®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento dos Microrganismos Endofíticos

Após encubação, houve crescimento de 17 isolados fúngicos associados à *Manilkara salzmannii* (como pode ser observado na tabela 3), sendo duas leveduras, sete candidatos a *Lophiostoma* sp, um a *Penicillium* sp, um a *Sclerotina* sp e três a *Aspergillus* sp, de acordo com a caracterização macro e micromorfológica. Destes isolados, quatro não foram identificados devido à ausência de esporulação em câmara úmida.

Tabela 3: Isolados fúngicos da *Manilkara salzmannii*, de acordo com o tecido vegetal, coleta e período de incubação.

ISOLADO	GÊNERO	ORIGEM	INCUBAÇÃO	ISOLAMENTO
C1C5	<i>Aspergillus</i> sp	Caule	24 horas	22/07/16
C1C6	<i>Aspergillus</i> sp	Caule	24 horas	22/07/16
C2C1	<i>Aspergillus</i> sp	Caule	24 horas	22/07/16
C1C4	Não identificado (Levedura)	Caule	24 horas	22/07/16
C1C7	Não identificado (Levedura)	Caule	24 horas	22/07/16
C1F1	Não identificado (Filamentoso)	Folha	48 horas	22/07/16
C1C2	<i>Penicillium</i> sp	Caule	48 horas	22/07/16
C1C8	<i>Lophiostoma</i> sp	Caule	48 horas	22/07/16
C1C9	<i>Lophiostoma</i> sp	Caule	48 horas	22/07/16
C2C2	<i>Lophiostoma</i> sp	Caule	48 horas	22/07/16
C1C1	<i>Sclerotina</i> sp	Caule	1 semana	22/07/16
C1C3	<i>Lophiostoma</i> sp	Caule	1 semana	22/07/16
C2C3	<i>Lophiostoma</i> sp	Caule	2 semanas	22/07/16
C2C4	<i>Lophiostoma</i> sp	Caule	2 semanas	22/07/16
C2F1	Não identificado (Filamentoso)	Folha	4 semanas	22/07/16
C2F2	Não identificado (Filamentoso)	Folha	4 semanas	22/07/16
C1F2	<i>Lophiostoma</i> sp	Folha	12 semanas	22/07/16

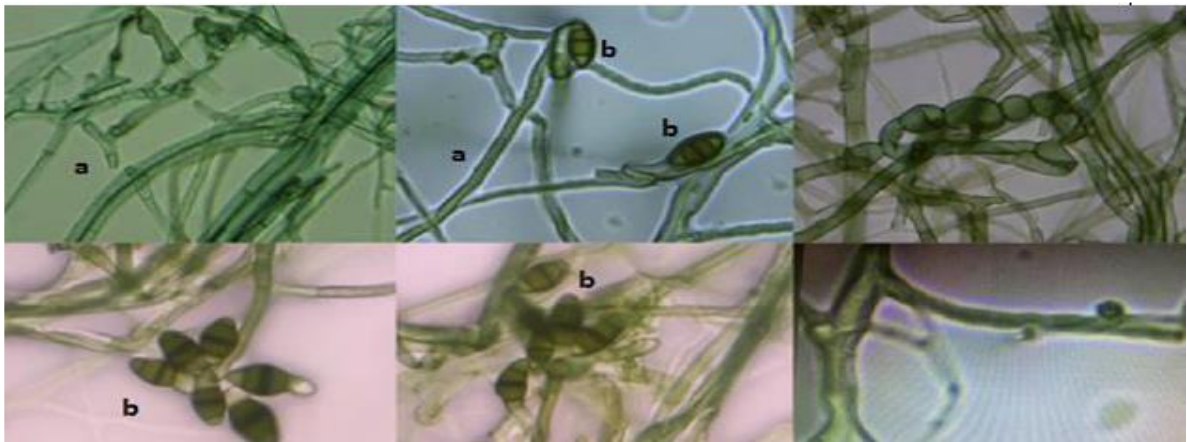
Segundo Tan e Zou, (2001), cada planta é hospedeira de ao menos um microrganismo endofítico. Entretanto, apenas uma pequena parcela destas plantas tem sido estudada em relação à sua microbiota endofítica. Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar um novo e benéfico endófito entre a imensa diversidade vegetal existente é considerável. Atualmente, vários grupos de investigação se motivaram a estudar e elucidar o real papel destes microrganismos no hospedeiro e com vistas em produtos bioativos bem como processos biotecnológicos.

Não foi observado na literatura um estudo aprofundado a respeito dos endofíticos de *Manilkara salzmannii*. Contudo, em dois trabalhos realizados por este grupo foi demonstrada a predominância de fungos do gênero *Lophiostoma* sp. A observação indireta de culturas puras obtidas de colônias fúngicas crescidas em meio de cultivo a partir de tecido vegetal desinfestado superficialmente consiste na principal forma de detecção de fungos endofíticos (SIEGAL et al., 1987). Segundo Petrini et al. (1992), a composição de fungos associada a uma mesma espécie vegetal não se altera muito quando as amostragens são realizadas em locais de coleta distantes. Entretanto, a frequência relativa das espécies de fungos, pode variar bastante de acordo com o índice pluviométrico do local, o método de isolamento dos endofíticos a partir do hospedeiro e a idade dos órgãos vegetais utilizados. Neste trabalho, o número de isolados fúngicos foi baixo, corroborando com um trabalho anterior, que isolou poucos (21) fungos. Os isolados foram agrupados em seis gêneros, com o predomínio de espécies do gênero *Lophiostoma* sp. Os resultados obtidos na fase de isolamento são consoantes ao trabalho de mestrado de Sousa (2013), não só evidenciando a colonização de tecidos vegetais em plantas da espécie *Manilkara salzmannii* por fungos do gênero *Lophiostoma*, mas também a eficiência da metodologia utilizada para cultivo, isolamento e caracterização de fungos endofíticos. Os fungos deste gênero foram isolados tanto da folha quanto do caule e o tempo de crescimento no primo isolamento apresentou grande variação, tendo sido observado em 48 h, uma semana, duas semanas, um mês e três meses. O longo intervalo de tempo de incubação *in vitro* pode ser um reflexo do grau de adaptação deste endofítico ao tecido vegetal e a provável presença de espécies diferentes deste gênero. Foi possível determinar o gênero de treze isolados fúngicos filamentosos, dos 17 isolados a partir da indução de esporulação pela técnica de micro cultivo em câmara úmida e observação de hifas, ascocarpos, ascos, ascósporos, conidiosporos e fusão de hifas.

Se faz necessário o uso de técnicas de biologia molecular para identificar os isolados que não esporularam no micro cultivo de câmara úmida e as leveduras, também para confirmar a identificação dos demais.

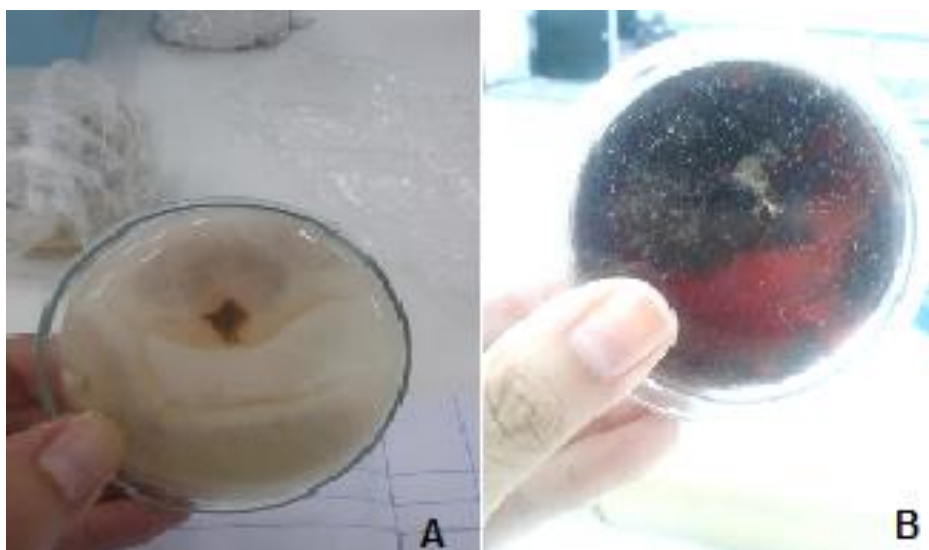
A partir desta etapa, o fungo C2C3 (figura 9) foi selecionado para dar continuidade aos experimentos devido a sua capacidade de produzir pigmentos vermelhos, após 5 dias de cultivo, foco deste trabalho.

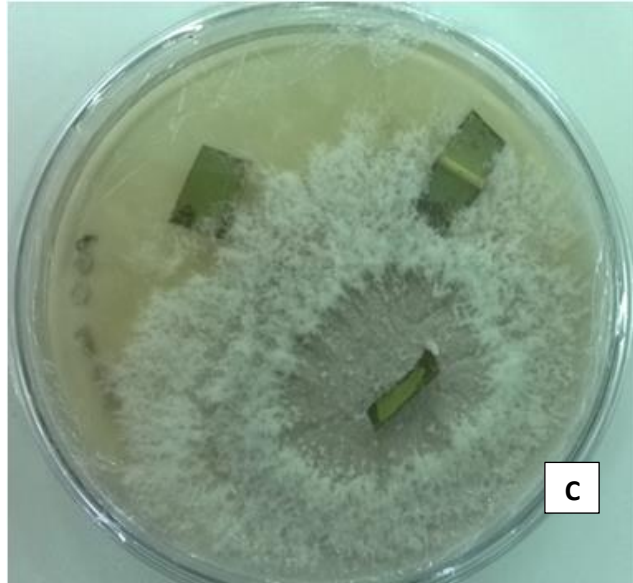
Figura 9: (a) Hifas e (b) ascósporos do isolado C2C3, observados, em lâmina de micro cultivo, em microscópio óptico. Aumento de 100x.



Fonte: próprio autor.

Figura 10: Fungo C2C3 em placa contendo meio ASD. Em "A" uma placa com 3 dias , em "B" uma placa com 5 dias e em "C" o primo isolamento do fragmento da folha.





Fonte: próprio autor.

Nesta etapa do trabalho foi possível observar a degradação do pigmento quando na presença do fungo após, aproximadamente, duas semanas de cultivo, sugerindo um caráter potencialmente biodegradável e/ou fungicida de seus constituintes, como pode ser observado na figura 11.

Figura 11: Fungo C2C3 após 2 semanas de cultivo



Fonte: próprio autor.

5.2. Cultivo em Pequena Escala e Obtenção dos Extratos

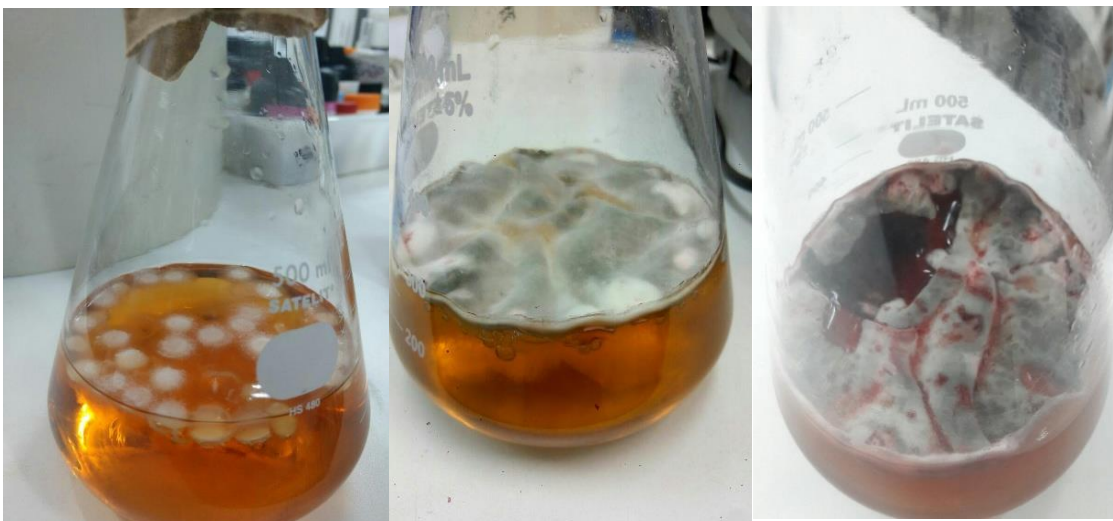
A partir dos discos de micélio transferidos do meio ASD sólido (figura 12) para o meio ASD líquido, foi possível obter uma grande quantidade de micélio e extrato fúngico, após 2 semanas de cultivo (figura 13), contendo o pigmento vermelho e metabólitos (figura 14) utilizados em todas as outras etapas deste trabalho. Os extratos, após filtragem para separação do micélio, não apresentaram degradação do pigmento, mesmo após dois anos de sua obtenção, evidenciando sua potencial ação fungicida quando excretado no meio de cultivo.

Figura 12: Placa contendo meio ASD e fungo C2C3.



Fonte: próprio autor.

Figura 13: fungo inoculado em meio Sabouraud líquido em três etapas de crescimento



Fonte: próprio autor.

Figura 14: Fungo C2C3 após 14 dias de cultivo, produzindo pigmento.



Fonte: próprio autor.

5.3. Bioensaios

5.3.1. Ensaio de antagonismo

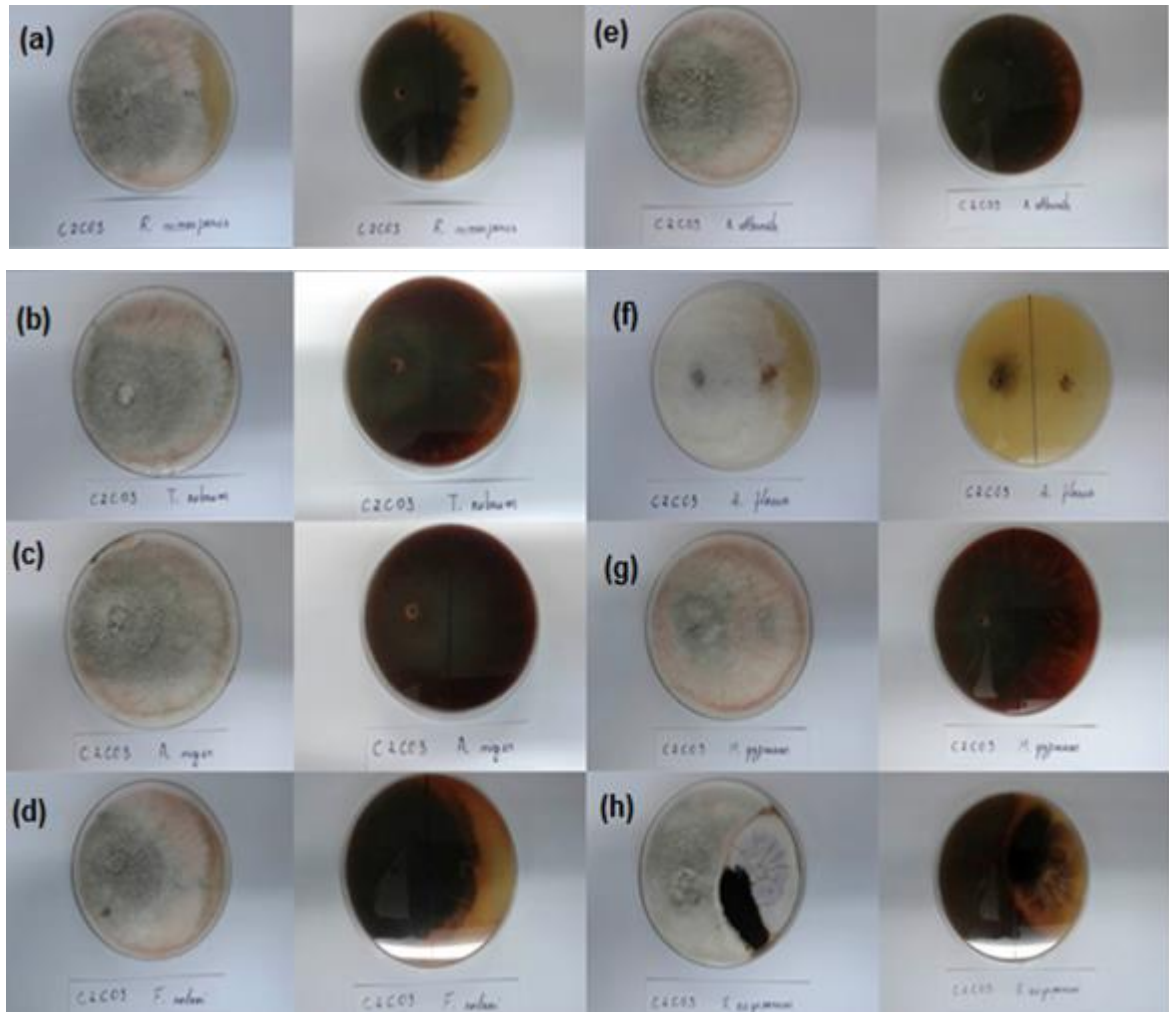
Após a realização do ensaio de antagonismo pode-se observar que o fungo C2C3 apresentou atividade inibidora frente a todos os patógenos testados, como pode ser observado na figura 15, corroborando com seu potencial fungicida.

Embora os pesticidas químicos sejam usados com sucesso na agricultura, causam problemas em águas residuais e subterrâneas, resíduos em alimentos e aumentam a resistência na população de patógenos e pragas, sem contar seus efeitos em população não alvo. Assim, métodos e estratégias alternativas são objetos de estudo, como o controle biológico, que vem ganhando espaço por ser menos agressivo, eficiente e de menor custo de manutenção (AMORIM; REZENDE, 2011).

Além dos fitopatógenos, as micoses cutâneas estão entre as infecções fúngicas mais comuns e difíceis de curar, sendo principalmente causadas por fungos filamentosos queratinofílicos, que utilizam a queratina como nutriente durante a infecção de pele, cabelos e unhas. Esses fungos são denominados dermatófitos que incluem os gêneros: *Trichophyton* sp e *Microsporum* sp. O tratamento é geralmente longo e oneroso, podendo ser combinados de drogas de uso tópico e oral na tentativa de aumentar a taxa de cura. As dermatofitoses são geralmente associadas a recidivas que se seguem à interrupção da terapia antifúngica que é muito tóxica ao indivíduo

devido aos fortes efeitos colaterais. Desta forma, novos fármacos antimicóticos são alvo de grande importância (DEGREE, 2008).

Figura 15: Ensaio de antagonismo demonstrando frente e verso das placas de confronto direto entre o C2C3 e o patógeno. (a) C2C3 e *R. microsporum*; (b) C2C3 e *T. rubrum*; (c) C2C3 e *A. niger*; (d) C2C3 e *F. solani*; (e) C2C3 e *A. alternata*; (f) C2C3 e *A. flavus*; (g) C2C3 e *M. gypseum*; (h) C2C3 e *F. oxysporum*.



Fonte: próprio autor.

Os microrganismos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011). A produção de compostos, como os antibióticos, sugere que os endófitos podem controlar doenças de plantas. O estudo de substâncias produzidas pelos endófitos e seu papel de antagonismo são importantes não só pelo

seu papel ecológico e relações interespecíficas, mas também para viabilizar a aplicação destes microrganismos no controle biológico de patógenos ou mesmo no isolamento de compostos biotecnológicos.

Para avaliar a atividade antagônica dos isolados fúngicos, foi empregada o teste de paridade *in vitro*, ou cultura pareada. O método da cultura pareada em disco de ágar é o mais largamente utilizado em estudos de antagonismo *in vitro*, existindo inúmeros relatos de sucesso na seleção de microrganismos, visando ao controle biológico de fitopatógenos (MARTINS-CORDER; MELO, 1998). É um método que permite mensurar o crescimento micelial, bem como os tipos de interação, como hiperparasitismo, formação de clamidósporos, dentre outros.

Foram avaliadas atividades antagonistas contra fungos fitopatógenos e causadores de micoses em homens e animais também. Os ensaios foram realizados com cepas ATCC, cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, cujas descrições estão no anexo 1. A escolha dos fitopatógenos foi baseada na prevalência destes em alguns dos principais cultivares do Estado da Bahia (algodão, maracujá, banana, mandioca) e que são, portanto, desfavoráveis à agricultura e economia. Dentre os resultados, o mais expressivo tem relação com o isolado C2C3, *Lophiostoma* sp, que apresentou atividade antagonista frente a todos os patógenos fúngicos testados, como os fitopatógenos: *Alternaria alternata* (ATCC 46582), *Aspergillus niger* (ATCC 1004, CBS 104.57), *Rhizopus microsporus* (IPEC 13/02), *Fusarium oxysporum* (ATCC 48112) e *Fusarium solani* (ATCC 36031); patógeno vegetais e humano: *Aspergillus flavus* (ATCC 16883, CBS 100927, CBS 569.65); e patógenos humanos: *Microsporum gypseum* (ATCC 14683), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533, Emmons 6402) e *Trichophyton rubrum* (ATCC 28189).

Estes resultados indicam a presença de substâncias fungistáticas ativas nos fungos endofíticos para outras espécies, explicando talvez a predominância deste gênero na planta hospedeira.

5.3.2. Bioensaio fungicida

O extrato do fungo C2C3 foi testado quanto ao seu potencial de inibição aos fungos *Fusarium solani* e *Alternaria alternata*, por apresentarem os melhores resultados no teste de antagonismo e seus valores médios de MG encontram-se na tabela 4.

Tabela 4: Índice de inibição do crescimento de microrganismos patogênicos em duas diferentes concentrações do extrato de C2C3.

	<i>F. solani</i>		<i>A. alternata</i>	
Extrato	Concentração			
	5%	100%	5%	100%
C2C3	0,63	0,96	0,45	0,2
<i>Lophiostoma</i> sp				

Através desta análise pode-se observar que o extrato do fungo C2C3 foi capaz de inibir o crescimento de quase 100% dos micélios viáveis de *F. solani*, na concentração de 100%, durante os três dias de cultivo. Na concentração de 5% do extrato, mais de 50% dos micélios viáveis deste mesmo fungo foram inibidos.

Os testes de inibição do crescimento de *A. alternata* não apresentaram resultados tão satisfatórios. Menos de 50% dos micélios viáveis foram inibidos nas duas concentrações, sendo a maior concentração quase inexpressiva sobre o crescimento deste fungo. Assim apesar de apresentar um efeito antagonista, não apresenta efeito fungicida, apenas fungistático frente a este fitopatógeno.

Porém, novos testes foram feitos com as frações do extrato metabólico, porém protegidos por patente e em período de graça, ou seja, não podendo ser publicitado.

Como um exemplo, a fração aquosa do extrato C2C3 foi liofilizada e posteriormente, solubilizada em solução salina a 0,04g/mL, foi avaliada frente ao fungo *Alternaria alternata*. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

Os resultados dos testes de halo de inibição indicam que a atividade fungicida do C2C3 está ligada à fração aquosa de seu extrato bem como ao (s) seu (s) pigmento (s), sendo eficiente em antagonizar *A. alternata* em concentrações tão baixas quanto 0,04g/mL.

Figura 16– Placas com halo de inibição de *A. alternata* pela fração aquosa de do extrato de C2C3.



Fonte: próprio autor.

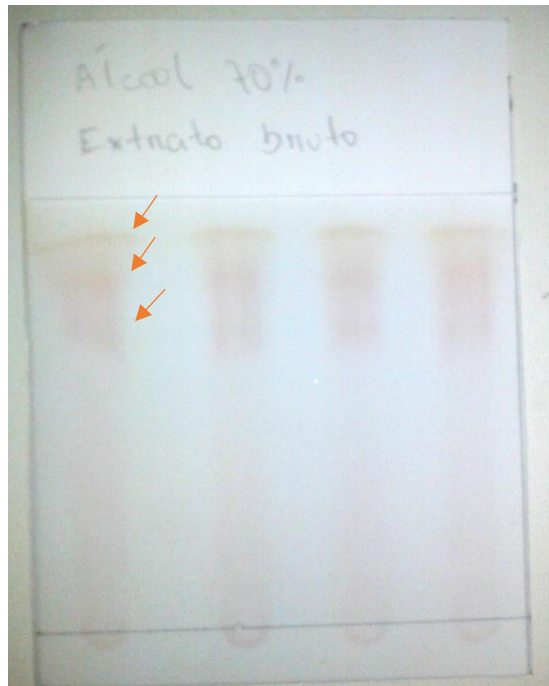
Diante disso, é possível concluir que o fungo testado é considerado produtor de metabólitos com atividade antifúngica, capaz de inibir o metabolismo de fungos patógenos avaliados, ou outros mecanismos como enzimas que degradem estruturas vitais dos mesmos. É importante ressaltar que produtos sintetizados pelos fungos podem ser produtos ainda não conhecidos o que significaria uma alternativa terapêutica contra essas pragas e micoses. Estudos adicionais estão sendo realizados, como os de atividade antioxidante, cujos resultados prévios indicam um possível mecanismo de antibiose. Produtos sintetizados pelo fungo podem ser produtos ainda não conhecidos o que significaria uma alternativa terapêutica contra pragas e micoses. Estudos adicionais estão sendo realizados, cujos resultados prévios confirmam o mecanismo de antibiose.

5.4. Ensaios físico-químicos do extrato fúngico

5.4.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi capaz de demonstrar o caráter altamente polar dos compostos presentes no extrato fúngico. Para realização de tal técnica, o álcool 70% INPM foi apontado como melhor fase móvel empregada, obtendo três diferentes bandas de separação, como demonstrado na figura 17.

Figura 17: Cromatoplaça de CCD do extrato de C2C3.



Fonte: próprio autor.

Segundo apontado na literatura, baseado na retenção das bandas, pode-se sugerir a presença de antocianidinas e flavonóis. As três frações foram filtradas em filtro Chromafil® O-20, para eliminação da sílica, acondicionadas em ultra freezer à -60°C e encaminhadas à análise em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance).

5.4.2. Determinação de Compostos Fenólicos e Flavonóides

Segundo Trantas et al., (2015), dentre os polifenóis, os flavonoides, em particular possuem estruturas ideais para o sequestro de radicais livres e, por isso, são considerados antioxidantes efetivos.

A variação nas concentrações de compostos fenólicos totais ocorre em função do solvente utilizado, como já foi evidenciado por outros autores (CABRAL et al., 2008). A amostra que apresentou maior concentração de compostos fenólicos foi o extrato mais velho em solução aquosa (15,388 µg/mL) e maior concentração de flavonoides o extrato novo em etanol (51,811 µg/mL) conforme a tabela 5.

Tabela 5: quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides nos extratos novo e velho do fungo C2C3 em diferentes solventes de extração.

Material	Solvente	Compostos fenólicos (µg/mL)	Flavonoides (µg/mL)
Extrato velho	Água	15,388	49,192
Extrato velho	Etanol	11,096	49,635
Extrato novo	Água	11,826	47,923
Extrato novo	Etanol	10,548	51,811

Pôde-se verificar pouca variação entre as quantificações realizadas com o extrato mais velho e extrato novo, evidenciando pouco ou nenhum prejuízo destes compostos presentes com o passar do período (2 anos). As variações apresentadas podem estar relacionadas a não padronização da produção do extrato entre os dois tempos, implicando em pequenas variações nos valores finais. Será necessária a avaliação e padronização da produção e estocagem do extrato a fim de se verificar a melhor obtenção destes compostos.

5.4.3. Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* (DPPH)

O ensaio DPPH é bastante simples e possibilita boa reprodutibilidade dos resultados, além de não exigir condições drásticas de temperatura e oxigenação. Este método foi introduzido como sendo um método fácil e preciso para o uso em frutas e extratos vegetais (ATIMANI et al., 2009), possibilitando uma boa adequação as condições do extrato do C2C3.

Apesar do ensaio do DPPH ser relativamente simples e não exigir tratamento prévio da amostra, alguns fatores podem interferir em sua sensibilidade, como o tipo de solvente utilizado, presença e concentração de hidrogênio na amostra e, até mesmo o reagente DPPH. Segundo Shadi e Zhong (2015), outro grande fator limitante diz respeito ao espectro de sobreposição de compostos que absorvem no mesmo comprimento de onda que o DPPH, como por exemplo as antocianinas.

Para as concentrações abaixo de 50 mg/mL de extrato C2C3 em meio reacional com DPPH foram observados valores negativos de atividade antioxidante (AA%).

Foi necessário projetar três novos pontos amostrais [80], [70] e [90] com base na equação da reta formada pelos dois pontos anteriores [50] e [60] para [70], [60] e

[70] para [80] e [70] e [80] para [90], com a finalidade de aumentar a confiabilidade do resultado ($R2 = 0,9887$). Como mostrado na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade Antioxidante (DPPH – Amostra Etanólica de C2C3)

C2C3	Abs 01	Abs 02	Abs 03	Média	Desvio Padrão	AA%	
[]mg/mL	Branco	0,615					
10	0,65	0,630	0,653	0,644	0,013	-4,7696	
20	0,636	0,62	0,639	0,632	0,010	-2,7100	
30	0,618	0,607	0,634	0,620	0,014	-0,7588	
40	0,623	0,605	0,63	0,619	0,013	-0,7046	
50	0,599	0,6	0,619	0,606	0,011	1,4634	
60	0,598	0,581	0,608	0,596	0,014	3,1436	
70				0,5877		4,4390	
80				0,5795		5,7724	
90				0,5731		6,8130	
CE50				380,3751	0,017		

De acordo com a literatura, os valores e observações correspondem a compostos pró-oxidantes voláteis e não foi possível a finalização deste parâmetro. Por outro lado, Dornas et al., (2008), demonstraram que algumas substâncias fenólicas apresentam ação pró-oxidante sob determinadas condições, como na presença de íons metais de transição, uma vez que estes metais podem induzir a auto-oxidação gerando radicais livres.

As ideias sobre a relação entre a atividade pro-oxidante e o potencial carcinogênico ainda não se encontram bem estabelecidas, mas sabe-se que pro-oxidantes induzem ROS (espécies reativas de oxigênio), que comprovadamente contribuem para o efeito anticancerígeno, podendo representar uma boa estratégia de estudos futuros deste extrato.

Com base na equação da reta $Y = 0,1434X - 5,7587$, representada no gráfico 1, foi calculado o valor de $EC_{50} = 380,3751$ indicando que a concentração de 0,3804 g/L do extrato C2C3 apresenta 50 % da atividade antioxidante sobre DPPH a 0,06 mM.

A figura 18 mostra a curva padrão utilizada do ensaio colorimétrico de quantificação do ensaio de sequestro do radical DPPH.

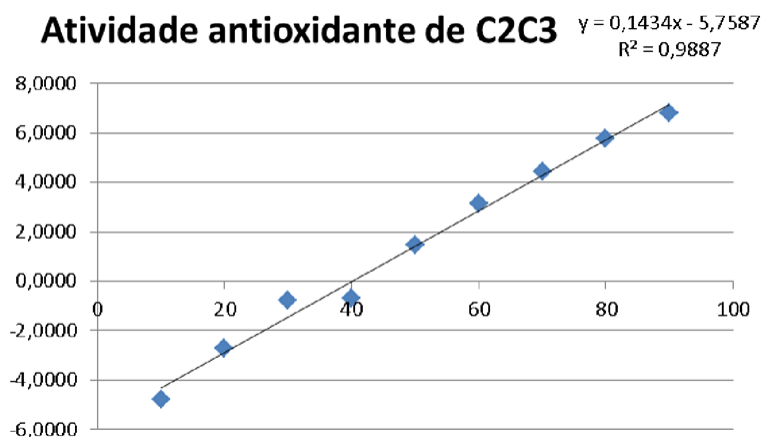


Figura 18: Atividade antioxidante de C2C3 contra DPPH segundo a concentração do extrato.

5.4.4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Os resultados foram variados de acordo com o comprimento de onda, sendo detectados compostos diferentes conforme a variação do mesmo. Os principais compostos detectados estão resumidos nas tabelas 8, 9, 10, 11 e 12. Os cromatogramas encontram-se anexados ao final deste texto.

Além de permitir excelente separação, esta técnica de HPLC possibilita simultaneamente separar, identificar e quantificar pigmentos antocianicos sem requerer purificação excessiva dos extratos. A uma absorbância de 520nm foi possível observar picos correspondentes à flavonoides da classe das antocianinas, como a peonina, petunidina, oenina, ciannidina, mirtilina, malvina e curomanina (tabela 11), que além de possuírem forte caráter antioxidante e anti-inflamatório, são responsáveis pela pigmentação. Estes pigmentos ocorrem geralmente na forma de antocianinas, que são derivadas de antocianidinas (HAYASHI et al., 1996). As antocianinas, geralmente, apresentam-se ligadas a açúcares que lhes confere maior solubilidade e estabilidade de pigmento (TERCI, 2004). Segundo Brouillard et al, (1982), as antocianinas possuem a mesma origem biossintética dos outros flavonoides naturais, diferindo destes por apresentar forte absorção do espectro visível, conferindo-lhes uma infinidade de cores.

As antocianinas possuem como característica marcante sua variedade de estruturas apresentadas em função do pH, quando em solução aquosa. Por outro lado, a estabilidade ao descolorimento aumenta consideravelmente quando ligadas a ácidos

fenólicos (MARÇO et al., 2008). Segundo Bobbio et al. (2001), este aumento de estabilidade deve ser atribuído à copigmentação, que ocorre pela associação através de ligações de hidrogênio entre o flavonol e a antocianina.

Esta grande estabilidade do pigmento pode ser observada em laboratório, uma vez que o extrato fúngico se manteve praticamente inalterado mesmo após dois anos de sua produção.

O conhecimento da estrutura dos pigmentos, da influência imposta pela variação de pH, temperatura, a presença de ácidos e açúcares, ions metálicos e copigmentos é de fundamental importância para avaliação da estabilidade do pigmento, destinado por exemplo à indústria de alimentos. No entanto, a utilização de antocianinas proveniente de um fungo supera as limitações derivadas da disponibilidade de matéria-prima produtora e das dificuldades de obtenção (extração, purificação e isolamento), devendo ainda ser avaliado comparativamente o poder corante em relação a outros pigmentos sintéticos.

Tabela 8: Resultados de análise em HPLC extrato fúngico à 320 nm.

Molécula	Atividade	Referência
Ácido caféico	Anticarcinogênico, antioxidante, antibacteriano, cardioprotetor	Huang et al., 1992; Greenwald, 2004; Sanchez-Moreno et al., 2000; Vinson et al., 2001
Ácido clorogênico	Antioxidante, antibacteriano, anti-amnésico, antiulcerogênico	Tuomilehto et al. 2004; Watanabe et al. 2006; Kwon et al., 2010; Sato et al., 2011; Lou et al., 2011; Shimoyama et al., 2013
Ácido ferrulico	Antioxidante	Ramalho e Jorge, 2005.
Piceatanol	Antitumoral, antioxidante, cardioprotetor	Hartwell JL. 1969; Ferrigni et al., 1984; Gaziano et al., 1993; Rimm et al, 1993.
Trans resveratrol	Antitumoral, cardioprotetora, antiproliferativa, anti-hipertensiva	Merlin et al., 2017

Tabela 9: Resultados de análise em HPLC do extrato fúngico à 280 nm.

Molécula	Atividade	Referência
Ácido gálico	Antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório	Bonifacio et al., 2016; Crus Custódio et al., 2017
Ácido siríngico	Antioxidante	Soares, 2002.
Cis resveratrol	Antitumoral, cardioprotetora, antiproliferativa, anti-hipertensiva	Souza et al., 2016; Dos Santos Lima et al., 2014; Zare Javid et al., 2016; Chang et al., 2016
Epicatequina galato	Antioxidante, cardioprotetor, anti-hipertensivo	Santos, 2015
Epigallocatequina galato	Antioxidante, cardioprotetor, anti-hipertensivo	Santos, 2015

Tabela 10: Resultados de análise em HPLC do extrato fúngico à 360 nm.

Molécula	Atividade	Referência
Campferol	Antioxidante, anticancerígeno, cardioprotetor, anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-diabético	Cui et al., 2008; Calderon-Montano et al, 2011; Chen et al., 2010; Cazarolli et al, 2006; Okamoto et al., 2002
Isoquercetina	Antidiabético, antifúngico, antiviral	Kim, Narayanan e Chang, 2010; Zang et al., 2011; Veras et al., 2011.

Tabela 11: Compostos identificados por HPLC do extrato fúngico à 520 nm.

Molécula	Atividade	Referência
Cianidina		
Malvina	Antioxidante, anti-inflamatória	Kaziama et al., 2012
Curomanina	Antioxidante, anti-inflamatória	
Mirtilina	Antioxidante, anti-inflamatória	Kuskoski et al., 2004
Oenina	Antioxidante	Santin, 2006;
Petunidina	Anti-proliferativa, antioxidante	Zang et al., 2005; Dornas et al., 2008.

Tabela 12: Resultados de análise em HPLC do extrato fúngico à 320 nm fluorescente.

Molécula	Atividade	Referência
Catequina	Herbicida, antioxidante, antimutagênico	Kajiya et al., 2004; Geetha et al., 2004; Anggraini et al., 2011.
Epicatequina	Antioxidante, redutor do colesterol, vasodilatador	Rodriguez et al., 2010; Ngamukote et al., 2011; Iñiguez-Franco et al., 2012
Procianidina B1	Antioxidante, anti-inflamatório	Oldoni et al., 2016
Procianidina B2	Antioxidante, anti-inflamatório	Oldoni et al., 2016
Procianidina A2	Anti-inflamatório	Veloza et a., 1999

Foram observados muitos picos sem identificação nos cromatogramas, o que, segundo Manach e Donovan (2004) e Shahidi et al., (2007) pode ser explicado pela não purificação do extrato analisado, já que estes apresentam-se predominantemente ligados a açúcares (glicosídeos), sendo necessário tratamentos prévios que quebrem estas ligações e permitam uma melhor identificação dos compostos (estes estudos estão em andamento).

A biossíntese de todos os metabolitos secundários surge a partir de intermediários ou produtos monoméricos do metabolismo primário. Eles normalmente são produtos diferenciados de grupos específicos de organismos. Esta especificidade, juntamente com o conjunto restrito de condições fisiológicas comumente necessárias para sua produção, reforça a conclusão de que metabolitos secundários não têm nenhuma função metabólica essencial, sendo, portanto, produtos de metabolismo especializado (VINING, 1990).

Os principais grupos são os terpenos, produzidos a partir do isopentenil difosfato, os compostos fenólicos, sintetizados pela via do chiquimato, e os alcaloides, produzidos a partir de aminoácidos (BOURGAUDE et al., 2001).

Apesar de serem resultados prévios, foram detectados diversos compostos fenólicos no metabolismo secundário do fungo, ainda não relatados em literatura, como o resveratrol e seus isômeros trans e cis-resveratrol. Os estudos prévios do extrato fúngico por HPLC foram realizados em um laboratório da EMBRAPA em Juazeiro BA, cuja rotina de análises é direcionada para uvas. Sendo assim, a identificação do trans-resveratrol e do cisresveratrol estava incluída nos padrões e foi baseada nos tempos de retenção UV sendo a pureza dos picos confirmada através do detector com arranjo de diodos (DAD). Todas as análises cromatográficas, incluindo a validação do método

foram feitas ao abrigo da luz, a fim de evitar que o isômero trans-resveratrol fosse convertido em cis-resveratrol. Portanto, o estudo da estabilidade foi restringido à temperatura de bancada (25°C), e armazenamento a -20°C, nos diversos tempos.

O limite de detecção do trans-resveratrol e do cis-resveratrol foi obtido realizando-se diluições gradativas dos padrões. Os testes de recuperação, limite de quantificação e exatidão foram realizados com adição dos padrões sobre a matriz. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A presença deste composto resveratrol e seus isômeros (trans e cis) são determinados nos diferentes tipos de sucos de uva e vinho no Brasil. O resveratrol é uma fitoalexina produzida por diversas plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), eucalipto, amendoim, amora e também está presente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (KUBO et al., 1981). Na uva esta fitoalexina é sintetizada na casca como resposta ao *stress* causado por ataque fúngico, dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta.

O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol e cis-resveratrol. O isômero transresveratrol é convertido para cis-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável. Existem muitos estudos do metabolismo e efeitos fisiológicos das diferentes formas de resveratrol, mas a biodisponibilidade não foi ainda bem estudada. O resveratrol tem atividade antioxidante através da inibição da atividade dioxigenase da lipoxigenase (HILIS et al., 1974), pode também atuar de modo similar ao estrogênio e substituir parcialmente este estrogênio nos tratamentos pós-menopausa (RATNA e SIMONELLI, 2002). Conforme SUBBARAMAIAH et al. (1998), a atividade anti-inflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e atividade da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), inibindo também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante. Assim, todos os compostos detectados, incluindo-se resveratrol fúngico, devem ser quantificados, pois abrem novas perspectivas de pesquisa para outras rotas do metabolismo vegetal realizada por estes organismos também de impactos na indústria e agropecuária.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, sugere-se que o fungo C2C3 apresenta-se como um promissor meio de obtenção de compostos de importância industrial, contendo agentes antioxidantes, anti-inflamatórios, cardioprotetores e até mesmo anticancerígenos. Porém é necessária a quantificação destes compostos após purificação para avaliar métodos de otimização da produção.

- Foram isoladas poucas colônias, porém houve a prevalência de espécies de *Lophiostoma* sp, corroborando com trabalhos anteriores, o que também conclui-se que a técnica utilizada foi reprodutível;
- Foram produzidas biomoléculas fúngicas com atividade antifúngica (contra fitopatógenos e patógenos humanos), o que se torna promissor o prosseguimento dos estudos para novos fármacos antimicóticos de impactos na agricultura e em saúde humana;
- Foi detectada a produção de pigmento natural vermelho amarelado carotenoide pelo fungo endofítico como produto de seu metabolismo secundário;
- Foram detectados compostos fenólicos diversos, incluindo-se resveratrol, nunca antes relatado na literatura sobre fungos.

7. PRODUTOS e PERSPECTIVAS FUTURAS

- Foi redigida uma patente intitulada “PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PIGMENTO E ANTIBIÓTICO A PARTIR DO CULTIVO DE FUNGO *Lophyostoma* sp. Número do processo BR 10 2017 019 100 1
- Foi elaborado um artigo de prospecção e submetido ao periódico Cadernos de Prospecção, intitulado “Fungos Endofíticos – Aplicações Biotecnológicas de Metabolitos Secundários com Atividades Antimicrobiana”, sob orientação desta autora.

Como os próximos passos deste trabalho, estão previstos:

- Atestar a ausência de toxicidade do extrato fúngicos;
- Identificar através de HPLC (Hight Performance Liquid Chromatography) quantitativo e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) os componentes da amostra;
- Determinar potencial antitumoral dos componentes da amostra.
- Redação de patente e artigo (em andamento).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIALA, M. A.; OGUNJOBI, A.A.; ODEBODE, A.C.; AYODELE, M. A. Microbial Control of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet A Notable Pathogen of Bananas and Plantains. **Nature and Science**, v.8, p. 299-305, 2010.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - a review. **Water Air Soil Pollut**, v. 213, n. 1-4, p. 251-273, 2010.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as source of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, n.169, p.483-495, 2014.
- AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. 4ed. UFV: Viçosa. v.1, p. 704, 2011.
- ANGGRAINI, T.; TAI, A.; YOSHINO, T.; ITANI, T. Antioxidative activity and catechin content of four kinds of *Uncaria gamir* extracts from West Sumatra, Indonesia. **Afr Journal Biochemistry Research**, v.5, p.33-38, 2011.
- ARAI, F.M.; DEVOS, S., ENGERT, A.; LIDGE, T.; BORCHMANN, P., YOUNES, A., MORSCHHAUSER, F.; McMILAN, A.; HORNING, S.J. Clearance of yeast eRF-3 prion [PSI⁺] by amyloid enlargement due to the imbalance between chaperone Ssa1 and cochaperone Sgt2. **Translation (Austin)**, v.1, n.2, p. 2031-2033, 2013.
- ARAUJO, D. S. D.; LACERDA, L. D. A Natureza das Restingas. **Ciência Hoje**, v. 6, n. 33, p. 26 – 32, 1987.
- ARCHELA, E.; ANTONIA, L.H.D. Determinação de Compostos Fenolicos em Vinhos: um Revisão. **Semina: Ciencias Exatas e Tecnologia**, Londrina,v.34, n.2, p.193-2010, 2013.
- ATMANI, D.; CHAREN, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plant. **Food Chemistry, Barking**, v.112, n.2, p.303-309, 2009.

- AZEVEDO, J. L.; LACAVAL, P. T.; ANDREOTE, F. D.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P. S.; Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. **Microrganismos e agrobiodiversidade. Guaíba: Agrolivros**, v. 01, p. 211-232, 2008.
- AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S. Jaguariúna: **Embrapa**, 1998. p.445-461.
- AZEVEDO, J.L.; Botânica: uma ciência básica ou aplicada. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, p.225-229, 1999.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**, p. 269-294, 2002.
- BABITHA, S. Microbial pigments. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation, Nova Deli**, v. 1, p. 147-162, 2009.
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R.A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **Microbiology and Ecology**, v.51, p.215-229, 2005.
- BERNARDES, N.R.; PESSANHA, F.F.; OLIVEIRA, D.B. Alimentos Funcionais: Uma breve Revisão. **Ciência e Cultura**, v.6, p.11-19, 2010.
- BHAGOBATY, R.K.; JOSHI, S.R. Metabolite profiling of endophytic fungal isolates of five ethnopharmacologically important plants of Meghalaya, India. **Journal of Metabolomics and Systems Biology**, v.2, n. 2, p. 20-31, 2011.
- BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia, New York**, v. 86, n. 2, p. 187-198, 1994.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438. 2011
- BRAND-WILLIAM, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebenson Wiss Technol**, v.28, p.25-30, 1995.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science, Limerick**, v. 161, n.5, p. 839–851, 2001.

BRAKHAGE, A.A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetical and. Biology**, v.48, p.15–22, 2011.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.;BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO, C.;LÓPEZ-LÁZARO, M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p.298-344, 2011.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciations studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v.91, n.3, p. 553-556, 1999.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. trop Med. Hyg.*, v. 70, p. 181-184, 1967.
Cazarolli, L.H.; Zanatta, L.; Jorge, A.P.; de Sousa, E.; Horst, H.; Woehl, V.M.; Pizzolatti, M.G.; Szpoganicz, B.; Silva, F.R. Followup studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, 163, 177-91.

CELESTINO, J.R. Bioprospecção de Fungos de Amostra de Solo Amazônico com Potencial para a produção de Pigmentos. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) – Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CERQUEIRA, K.S.; LUZ, E.D.M.N.; MAGALHÃES, D.M.A. Fungos endofíticos em plantas ornamentais tropicais na Bahia. **Agrotropica**, v.25, n.3, p.223-232, 2013.

CHAE, J; OH, B. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 346–350, 2010b.

CHAKRABORTY, R.; SEN, S; SRIDHAR, C.; REDDY, Y.S.R.; DE, B. Free Radicals , Antioxidants, Diseases and phytomedicine: current status and future perspective **International Journal of Pharmaceutical Science Reviw and Research**, v.3, n.1, 2010.

CHATTOPADHYAY, P; CHATTERJEE, S; SEN, S. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, p. 2972-2985, 2008.

CHENGAIHAH, B; MALLIKARJUNA RAO, K; MAHESH KUMAR, K; ALAGUSUNDARAM, M; MADHUSUDHANA CHETTY, C. Medicinal importance of natural dyes a review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 1, p. 144-154, 2010.

CHEN, Q.C.; ZHANG, W.Y.; JIN, W.; LEE, I.S.; MIN, B.S.; JUNG, H.J.; NA, M.; LEE, S.; BAE, K. Flavonoids and isoflavonoids from Sophorae Flos improve glucose uptake *in vitro*. **Planta Medica**, v.76, p.79-81, 2010.

CHO, J.G.; SONG, N.Y.; NAM, T.G.; SHRESTHA, S.; PARK, H.J.; LYU, H.N. Flavonoids from the Grain of C1/R-S Transgenic Rice. **Agricultural Food Chemistry**, v.43, p.10354-10359, 2013.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução no 417, de 17 de março de 2009. Disponível em <http://www.mma.gov.br>. Acesso em: 01.02.2016.

CORTEZ LOPES, F. Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos (Dissertação de Mestrado). Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2011.

CPBM. Meio Ambiente na Bahia. 2007. Disponível em http://www.cbpm.com.br/paginas/meio_bahia.php. Acesso em 01.02.2016.

CUI, Y.; MORGENSTEM, H.; GREENLAND, S.; TASHKIN, D.P.; MAO, J.T.; CAI, L.; COZEN, W.; MACKU T.M.; LU, Q.Y.; ZHANG, Z.F. Dietary flavonoid intake and lung cancer-A population-based case-control study. **Cancer**, v.112, p.2241-8, 2008

DALLAGO, R.M.; SMANIOTTO, A.; OLIVEIRA, L.C.A. Resíduos sólidos de curtumes como 67 adsorventes para a remoção de corantes em meio aquoso. **Química Nova**, v.28, p.433- 437, 2005.

DEGREE, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**, v.166, p.166-257, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p. 11-15, 1987.

DORNAS, W.C; OLIVEIRA, T.T; RODRIGUES, D.T.T.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.28, n.3, p.241- 249, 2007

DURÁN, N.; TEIXEIRA, M.F.S.; ESPOSITO, E. Pigmentos fúngicos e seu potencial biotecnológico. In: Esposito, E.; Azevedo J.L. Fungos: uma introdução á biologia, bioquímica e biotecnologia, **EDUCS. Caxias do Sul**, 2004.

ECFR: Electronic Code of Federal Regulations, USA (e-CFR). *Foods and Drugs, Color Additives*. Title 21, Part 70.3, 2007. Disponível em <http://ecfr.gpoaccess.gov/cgi/t/text/text-idx?c=ecfr&sid=0d581a948f0644d117dcaebdda5eb6e2&rgn=div5&view=text&node=21:1.0.1.1.24&idno=21>; acesso em 20/05/2007.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, v. 98, n. 1, p. 25-36, 2002.

FERRIGNI, N.R.; McLaughlin JL, Powell RG, Smith CR. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. **Journal of Natural Production**, v.47, p.347–352, 1984.

FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpurues*. **Journal of Biotechnology**, v.80, p. 271-276, 2000.

FURTADO, N; FONSECA; M; BASTOS, J. The potential of an *aspergillus fumigatus* brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 357-362, 2005.

GAZIANO, J.M.; BURING J.E.; BRESLOW JL, GOLDHABER S.Z.; ROSNER B, VanDenburgh M, Willett W, Hennekens CH. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v.329, p.1829–1834, 1993.

GEETHA, T.; GARG, A.; CHOPPA, K.; PAL KAUR, I. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.556, n.1-2, p.65-74, 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user: friendly biological sequence alignment editor and analysis. **Nucleic Acids Research Symp.**, v.41, p. 95-98, 1999.

HARTWELL, J.L. Plants used against cancer. **A survey Lloydia**, v.32: p.153–205, 1993.

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

HAYASHI, K. Em *The chemistry of flavonoid compounds*; Geissman, T. A.. Journal fo Plant Nutrition and Soil Science, v.100, p.60-61,1962.

HEINIG, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal Divers**, v.60, p.161–170, 2013.

HILLIS, W. E.; HART, J. H.; YAZAKI, Y. Polyphenols of *Eucalyptus sideroxylon*. **Phytochemistry (Oxford)**, v. 13, n. 8, p. 1591-1595, 1974.

IÑIGUEZ-FRANCO, F.; SOTO-VALDEZ, H.; PERALTA, E.; AYALA-ZAVALA, J.F.; AURAS, R.; GAMÉZ-MEZA, N. Antioxidant activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly(l-lactic acid). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, n.26, p.6515-6523, 2012.

HOENSH, H.P.; OERTEL, R. The value of flavonoids for the human nitritions: Short review and perspectives. **Clinical Nutritions Experiments**, v.3, p.8-14, 2015.

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

JALMI, P; BODKE, P; WAHIDULLAH, S; RAGHUKUMAR, S. The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 505-512, 2012.

JULSING, M; KOULMAN, A; HERMAN J. WOERDENBAG, H; QUAX, W; KAYSER, O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. ***Biomolecular Engineering***, v. 23, n. 6, p. 265-279, 2006.

JHONSTON, G.A.R. Flavonoid Nutraceutical and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. ***Clinical Nutrition Experimental***, v.89, p.8-14, 2015.

KAJIYA, K.; HOJO, H.; SIZUKI, M.; MANJO, F.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. ***Journal of Agricultural and food chemistry***. v.52, n.6, p.1514-1519, 2004.

KAZYIAMA, V.M.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. ***Revista Brasileira Pl. Med., Botucatu***, v.14, n.3, p.522-528, 2012.

KHAWAR, R.N.; MISHRA, A.; GOND, S.K.; STIERLE, A.; STIELE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. ***Natural Products Reports***, v.28, p.1208-1228, 2011.

KERN, M. E.; BLEVINS, K.S. ***Micologia Médica***. 2ed. São Paulo: Editora Premier, p.256, 1999.

KIM, M.; LEE, J.H.; KOH, H.; LEE, S.Y.; JANG, C.; CHUNG, C.J.; SUNG, J.H.; BLENIS, J.; CHUNG, J. Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. ***EMBO J.***, v.25, n.13, p.3056-3067, 2006.

KIM, Y.; NARAYAMAN, S.; CHANG, K.O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isouercetin. ***Antiviral Research***, v.88, n.2, p.227-235, 2010.

KOBYLEWSKI, S; JACOBSON, M.F. Toxicology of food dyes. ***Int J Occup Environ Health***, v.18, p.220–246, 2012.

KOIRALA, N.; THUAN, N.H.; GHIMIRE, G.P.; THANG, D.V.; SOHNH, K.J. Methylation of Flavonoids: Chemical structure, bioactivities, progress and perspective for biotechnological production. ***Enzyme Biotechnological Technics***, v.86, p.103-116, 2016.

KOWN, S.H., LEE, H.K, KIM, J.A, HONG, S.I, KIM, H.C, JO, T.H, PARK, Y.I, LEE, C.K, KIM, Y.B, LEE, S.Y, JANG, C.G. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on

spoloamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**. V.649, n. 1-3, p. 210-2017,2010.

KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, T.; TANI, T.; NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drug: 2. On the roots of *Polygonum cuspidatum* (Poligonaceae). **Shoyakugaku Zasshe**, v. 35, n. 1, p. 58-61, 1981.

KUSARI, S.; SINGH, S; JAYABASKARAN, C. Rethinking production of Taxol (paclitaxel) using endophyte biotechnology. **Trends Biotechnol**, v.32, p.304–311, 2014.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LEE, B.; KWON, W.; KIM, J.; PARK, J.; EOM, A. Difference among Endophytes fungal communities Isolated from the Roots *Cephalanthera longibracteata* Collected from Diferent Sites in Korea. **Micobioly**, v.45, p.312-317, 2017.

LI, F.; XUE, F.; YU, X. CG-MS, FTIR and Raman Analysis of Antioxidant Components of red Pigment from *Stemphylium lycopersici*. **Current Microbiology**, v.74, n.4, p.532-539, 2016.

LOPES R.M.; OLIVEIRA T.D.; Nagem T.J., Pinto A.D.S. Flavonóides. **Biociencia & Desenvolvimento**, n.3, v.14, 2010.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; MA, C.; WANG, Z. Antibacterial activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.398-403, 2011.

MAIA, L.C.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.; CAVALCANTI, L.H.; GUGLIOTTA, A.M.; DRECHSLER-SANTOS, E.R.; SANTIAGO, A.L.M.A.; CÁ CERES, M.S.; GIBERTONI, T.B.; APTROOT, A.; GIACHINI, A.J.; SOARES, A.M.S.; SILVA, A.C.G.; MAGNAGO, A.C.; GOTO, B.T.; LIRA, C.R.S.; MONTOYA, C.A.S.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; SILVA, D.K.A.; SOARES, D.J.; REZENDE, D.H.C.; LUZ, E.D.M.N.; GUMBOSKI, E.L.; WARTCHOW, F.; KARSTEDT, F.; FREIRE, F.M.; COUTINHO, F.P.; DE MELO, G.S.N.; SOTÃO, H.M.P.; BASEIA, I.G.; PEREIRA, J.; OLIVEIRA, J.J.S.; SOUZA, J.F.; BEZERRA, J.L.; ARAUJO NETA, L.S.; PFENNING, L.H.; GUSMÃO, L.F.P.; NEVES, M.A.; CAPELARI, M.; JAEGER, M.C.W.; PULGARÍN, M.P.; MENOLLI JUNIOR, N.; MEDEIROS, P.S.; FRIEDRICH, R.C.S.; CHIKOWSKI, R.S.; PIRES, R.M.; MELO, R.F.;

SILVEIRA, R.M.B.; URREA-VALENCIA, S.; CORTEZ, V.G.; SILVA, V.F. Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1033-1045, 2015.

MARÇO, P.H.; POPPI, R.J.; Procedimentos Analíticos para Identificação de Antocianinas Presentes em Extratos Naturais. **Química Nova**, v. 31, n.5, p.1218-1223, 2008

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity to produce water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MAPARI, S; MEYER, A; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6253-6261, 2009.

MAPARI, S; THRANE, U; MEYER, A. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants □ **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010.

MARCUCCI MC, FERRERES F, Guarcía-Viguera C, Bankova VS, Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74(2): 105–112. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00326-3 pmid:11167028.

MANACH, C.; DONOVAN, J. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MEINICKE, R. M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* cct 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana, Embrapa-CNPMA: Jaguariúna, 1998. metabolites. *Nat Prod Report*, n.18, p.448-59, 2001

MICHELIN, MICHELE; POLIZELI, MARIA DE LOURDES T. M.; RUZENE, DENISE S.; SILVA, DANIEL P.; RUIZ, HECTOR A.; VICENTE, ANTONIO A.; JORGE, JOAO A.; TERENCE, HECTOR F.; TEIXEIRA, JOSE A. Production of xylanase and beta-xylanosidase from autohydrolysis liquor of corncob using two fungal strains. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 7, p. 1185-

MICHELIN, MICHELE; SILVA, TONY M.; JORGE, JOAO A.; POLIZELI, MARIA DE LOURDES T. M. Purification and Biochemical Properties of Multiple Xylanases from *Aspergillus ochraceus* Tolerant to Hg²⁺ Ion and a Wide Range of pH. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 206-220, Sep., 2014.

MIRJALILI, M; NAZARPOOR, K; KARIMI, L. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 9-10, p. 1045-1051, 2011.

MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. **Planta Médica**, v.73, n. 2, p.103 -115, 2007.

MOHARRAM, A; MOSTAFA, E; ISMAEL, M. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 490-499, 2012.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2004; 26: 211–219. Available: <http://rdo.psu.ac.th/sistweb/journal/26-2/07-DPPH.pdf>.

NATH, A.; RAGHUNATHA, P.; JOSHI, S. R. Diversity and biological activities of endophytic fungi of *Emblca officinalis*, an ethnomedicinal plant of India. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 8-13, 2012.

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

NGAMUKOTE, S.; MAKYNEN, K.; THILAWECH, T.; ADISAKWATTANA, S. Cholesterol-Lowering Activity of the Major Polyphenols in Grape Seed. **Molecules**, v.16, n.6, p.5056-5061, 2011.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. O'Donnell, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Mol Phylogenet E**, v. 7, n. 1, p. 103-16, 1997.

of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In: Gullo VP.

OLDONI, T.L.C.; MELO, P.S.; MASAROLI, A.P.; MORENO, I.A.M.; BEZERRA, R.M.N.; ROSALEN, P.L.; SILVA, G.V.J.; NASCIMENTO, A.M.F.; ALENCAR, S.M. Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut

(*Arachis hypogaea*) skin combination of chromatography techniques. **Food Chemistry, Barking**, v.192, p.306-312, 2016

OLIVEIRA, M. C. D. S., Regitano, L. C. A., Roese, A. D., Anthonisen, D. G., Patrocínio, E., Parma, M. M., & Jardim, S. N. (2007). Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **EMBRAPA**. Disponível em:<
<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>.

Okamoto, I.; Iwaki, K.; Koya-Miyata, S.; Tanimoto, T.; Kohno, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. The flavonoid Kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8+ T cell engraftment. **Clin. Immunol.**, v. 103, p.132-44. 2002.

PASTRE, R; MARINHO, A; RODRIGUES-FILHO, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.

S. Pazoutova, P. _Sr_ utka, J. Holu_ sa, M. Chudí_ ckov_ a, A. Kub_ atov_ a, M. Kola_ rík, *Liberomyces* gen. nov. with two new species of endophytic coelomycetes from broadleaf trees, **Mycologia**, n.104, p.198-210, 2012.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in applied Microbiology**, v.44, p.1-68, 1997.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 3, n. 4, p.69-72, 2004.

PENNINGTON, T. D. **Sapotaceae**. Flora Neotropica: New York. v. 52, 770 p., 1990.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabolitos Secundários vegetais e benefícios antioxidants. **Jornal de Biotecnologia e Biodiversidade**, v.3, p146-152, 2012.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxis**, v. 1, p.185-196, 1992.

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

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research, London**, v.105, p.1508-1513, 2001.

RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sciences**. v. 70, p. 1577-1589, 2002.

RENHE, I; VOLP, A; VIDIGAL, J; STRINGHETA, P. *Monascus* na nutrição e saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 3, p. 337-343, 2006.

RIBEIRO, LILIANE F. C.; DE LUCAS, ROSYMAR C.; VITCOSQUE, GABRIELA L.; RIBEIRO, LUCAS F.; WARD, RICHARD J.; RUBIO, MARCELO V.; DAMASIO, ANDRE R. L.; SQUINA, FABIO M.; GREGORY, REBECCA C.; WALTON, PAUL H.; JORGE, JOAO A.; PRADE, ROLF A.; BUCKERIDGE, MARCOS S.; POLIZELI, MARIA DE LOURDES T. M. A novel thermostable xylanase GH10 from *Malbranchea pulchella* expressed in *Aspergillus nidulans* with potential applications in biotechnology. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 29-35, 2014.

RIMM, E.B.; KLATSKY, A.; GROBBEE, D, STAMPFER, M.J. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits. **Br Med J**, n.312, p.731–736, 1996.

ROCHA, R; ENGELS,C; PILEGGI, S.A.V; FILHO, D. S. J; MATIELLO, R.R.M; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.73-78, 2009.

RODRIGUEZ, M.; DU, G.J.; WANG, C.Z.; YUAN, C.S. Letter to the Editor: Panaxadiol's Anticancer Activity is Enhanced by Epicatechin. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.38, n.6, p.1233-1235, 2010.

RUIZ, B; CHÁVEZ, A; FORERO, A; GARCÍA-HUANTE, Y; ROMERO, A; SÁNCHEZ, M; ROCHA, D; SÁNCHEZ, B; RODRÍGUEZ-SANOJA, R; SÁNCHEZ, S; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SATO, Y.; ITAGAKY, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, I. In vitro and In vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v.403, n.1-2, p.136-138, 2011.
- SCHIMMEL, D.S. Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. **Global Chang Biology**, v.1, n.1, p. 77-99. 1995.
- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellane* L.) and hazelnut bioproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.4, p.1212-1220, 2007.
- SIEGAL, M, R.; LATCH, G. C. M.; JOHNSON, M. C. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review Phytopathology**, n.25, p.293-315, 1987.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, p.1102, 2007.
- SHI, Y.; LI, W.; Y, H.; ZHANG, T.; GAO, Y.; ZENG, J.; LIN, Q.; MAHEMUTI, O.; LI, Y.; HOU, X.; LOU, K. Endophytic fungal diversity and space-time dynamics in sugar beet. **European Journal of Soil Biology**, v.77, p.77-85, 2016.
- SINGLETON V.L; ORTHOFER, R; LAMUELA-RAVENTONS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. **Meth Enzymol**, n.299, p.152–178, 1999.
- SINGLETON, V.L; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal Enol Vitic**. V.16, n.3, p.144–158, 1965. Available: <http://ajevonline.org/content/16/3/144>.
- SOUSA, F.S.C. Bioprospecção de fungos endofíticos, associados à *Manilkara salzmannii*, planta de Restinga, com atividade antimicrobiana. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2013.

STIERLE, A., STROBEL, I.G., STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, p.214–216, 1993

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

SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W. J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A. J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34 (Aug. 21), p. 21875-21882, 1998.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v.18, n.4, p. 448-459, 2001.

TAGHAVI, S.; BARAC, T.; GREENBERG, B.; BORREMANS, B.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LEILE, D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v.84, n.10, 2005.

TANTRAS, E.A. When Plants Produce not Enough or et all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. **Frontiers in plant Science**, v.6, 2015.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A.V. Natural Ph Indicators: Using Papers or Solutions? *Química Nova*, v.25, n.4, p.684-688, 2004.

TUOMILEHTO, J. et al. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged finish men and women. **JAMA**, v. 291, n. 10, p. 1213-1219, 2004.

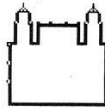
VALDUGA, E; TATSCH, P; TIGGEMANN, L; TREICHEL, H; TONIAZZO, G; ZENI, J; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

VELMURUGAN, P; KAMALA-KANNAN, S; BALACHANDAR, V; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P; CHAE, J; OH, B. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262-268, 2010a

- VELMURUGAN, P.; LEE, Y.; VENIL, C.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; Velozo, L. S. M.; Da Silva, B. P.; Da Silva, E, M. B.; Parente, J. P.; *Fitoterapia* **1999**, *70*, 532.
- VELNUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. **Biotechnologys Advences**. v.33, p.873-887, 2015.
- VENIL, C.K.; ZAKARIA, Z.A.; AHMAD, W. Optimization of culture conditions for flexirubin production by *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8. **Acta Biochemical Polonia**, 2013.
- VINAYAGAM,R.; XU, B. Antidiabetic properties od dietary flavonoids: a cellular mechanism reviw. **Nutriron and Metabolism**, 2015.
- VINING, L. C. Funtions of Sencudary Metabolites. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 395–427,1990.
- VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.
- WATANABE, T.; ARAI, Y; MUTSUI, Y.; KUSAURA, T.; OKAWA, W.; KIJAHARA,Y. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. **Clinical Experimental Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 439-449, 2006.
- WISSGOTT, U. e BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, n.9, p.298-302, 1996.
- YOO, J.J.; EOM, A.H. Molecular identification of endophytic fungi isolated from needle leaves of conifers in Bohyeon Mountain, Korea. **Mycobiology**, v.40, p.231-235, 2012.
- ZAFERANLOO, B. *et al.* Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1755-1762, 2014.
- ZHANG,Y; WANG, H.K; FOURNIER,J.; CROUS,P.W.; JEEWON,R.; POINTING,S.B. ANDD HYDE, H.D. Towards a phylogenetic clarification of Lophiostoma /Massarina and morphologically similar genera in the pleosporales. **Fungal Diversity**, v. 38, p. 225-251, 2009.
- ZANG, R.; YAO, Y.; WANG, Y.; REN, G. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A in mice. **Nutrition and metabolism**. v.8, n.85, p.1-6, 2011.

ZIMMERMAN, N.B.; VITOUSEK, P.M. Fungal endophytes communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, p.13022-13027, 2012.

ANEXO I



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

27/02/2015
 → Tubos Estufa

INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

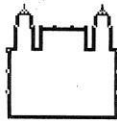
26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40291
NOME CIENTÍFICO: *Alternaria alternata*
STATUS: -----
LOTE: REP40291
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 1 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 46582
HISTÓRICO: ATCC<<<--RK Bush<<<--J. Strobig
FONTE DE ISOLAMENTO: Wisconsin
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: BDA
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 10 dias
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 24 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Congelamento
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: O cultivo original deve ser mantido no máximo por 30 dias em geladeira (entre 4°C e 8°C).
NÚMERO DE PASSAGENS: 2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:: -----
OBSERVAÇÃO: Repique a partir do lote 031440291N em 26/11/2014.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Alternaria alternata
INCQS 40291 (ATCC 46582)
NOTA: -----
CURADOR: Marília Martins Nishikawa

65.3230.014 – Anexo F – Rev. 05

CLASSIFICAÇÃO 544.1

www.incqs.fiocruz.br



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

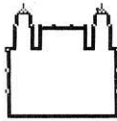
INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

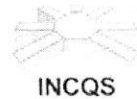
Nº DE ACESSO: 40291
NOME CIENTÍFICO: *Alternaria alternata*
STATUS: -----
LOTE: REP40291
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 1 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 46582
HISTÓRICO: ATCC<<--RK Bush<<--J. Strobig
FONTE DE ISOLAMENTO: Wisconsin
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: BDA
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 10 dias
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 24 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Congelamento
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: O cultivo original deve ser mantido no máximo por 30 dias em geladeira (entre 4°C e 8°C).
NÚMERO DE PASSAGENS: 2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:: -----
OBSERVAÇÃO: Repique a partir do lote 031440291N em 26/11/2014.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Alternaria alternata
INCQS 40291 (ATCC 46582)
NOTA: -----
CURADOR: Marília Martins Nishikawa

65.3230.014 – Anexo F – Rev. 05
 CLASSIFICAÇÃO 544.1
 www.incqs.fiocruz.br

27/02/2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



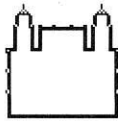
INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

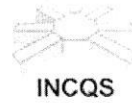
INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40051
NOME CIENTÍFICO: *Trichophyton rubrum*
STATUS: -----
LOTE: 111040051
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 28189
HISTÓRICO: -----
FONTE DE ISOLAMENTO: pele humana, New York, EUA
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: Sabouraud 2% glicose
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 312 h
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 25 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: Avaliação do meio para teste de dermatófitos.
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: Ampola selada à vácuo tem validade indeterminada se mantida entre -10°C e -20 °C.
NÚMERO DE PASSAGENS: 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Salkin IF. Dermatophyte test medium: evaluation with nondermatophytic pathogens. Appl. Microbiol. 26: 134-137, 1973. PubMed: 4795526
 Salkin IF, Hurd N. Quantitative evaluation of the antifungal properties of cycloheximide. Antimicrob. Agents Chemother. 1: 177-184, 1972. PubMed: 5065214
OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa CMRVS.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

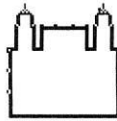
26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40144
NOME CIENTÍFICO: *Fusarium oxysporum*
STATUS: -----
LOTE: 091140144
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 1 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 48112
HISTÓRICO: -----
FONTE DE ISOLAMENTO: -----
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: PDA
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 10 dias
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 25 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: Ampola selada à vácuo tem validade indeterminada se mantida entre -10°C e -20 °C.
NÚMERO DE PASSAGENS: 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:: Sourcebook of experiments for the teaching of microbiology. London: Academic Press; 1982.
OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa CMRVS.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Fusarium oxysporum
INCQS 40144 (ATCC 48112)
NOTA: -----

65.3230.014 – Anexo F – Rev. 05
 CLASSIFICAÇÃO 544.1
www.incqs.fiocruz.br

Av. Brasil, 4365 Manguinhos CEP 21045-900 Rio de Janeiro RJ Brasil
 Tel.: (21) 3865-5186 / 3865-5236 Fax: (0xx21) 2290-0915

27/02/2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



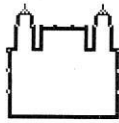
INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

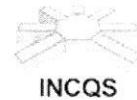
INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40018
NOME CIENTÍFICO: *Aspergillus niger*
STATUS: -----
LOTE: 068840018
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 1004, CBS 104.57
HISTÓRICO: ATCC<<--C. Thom <<--CBS 104.57
FONTE DE ISOLAMENTO: -----
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: BDA
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 240 h
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 26 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: Ampola selada à vácuo tem validade indeterminada se mantida entre -10°C e -20 °C.
NÚMERO DE PASSAGENS: 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Gershon H , Shanks L . Antifungal properties of n-alkanols, alpha, omega-n-alkanediols, and omega-chloro-alpha-alkanols. J. Pharm. Sci. 69: 381-384, 1980. PubMed: 7373528
OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa CMRVS.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Aspergillus niger



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



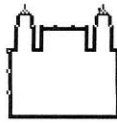
INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40004
NOME CIENTÍFICO: *Trichophyton mentagrophytes*
STATUS: -----
LOTE: REP40004
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 9533, Emmons 640
HISTÓRICO: -----
FONTES DE ISOLAMENTO: micose de pé, "tinea pedis"
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: Sabouraud 2% (Difco 0109)
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 10 dias
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 24 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: Teste para desinfetantes; teste de meio.
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: O cultivo original deve ser mantido no máximo por 30 dias em geladeira (entre 4°C e 8°C).
NÚMERO DE PASSAGENS: 2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:: U. S. Federal Standards and AOAC Methods 4.015-4.019 and 4.030-4.032, 1984.
OBSERVAÇÃO: Repique a partir do lote 088540004 em 26/11/2014.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Trichophyton mentagrophytes
INCQS 40004 (ATCC 9533)
NOTA: -----



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

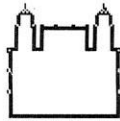


Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40005
NOME CIENTÍFICO: *Microsporum gypseum*
STATUS: -----
LOTE: 111040005
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 14683
HISTÓRICO: ATCC<<--R.I. Mateles <<--Tropical Products Inst. strain TPI
FONTES DE ISOLAMENTO: -----
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: Sabouraud 2% glicose
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 240 h
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 18 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: Ensaio de griseofulvina.
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: Ampola selada à vácuo tem validade indeterminada se mantida entre -10°C e -20 °C.
NÚMERO DE PASSAGENS: 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Analytical microbiology. New York: Academic Press; 1972. Knoll EW, et al. Plate assays for griseofulvin in pharmaceutical preparations and body fluids. J. Pharm. Sci. 52: 586-588, 1963.
OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa CMRVS.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Microsporum gypseum



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



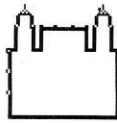
INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40099
NOME CIENTÍFICO: *Fusarium solani*
STATUS: -----
LOTE: REP40099
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 36031
HISTÓRICO: -----
FONTES DE ISOLAMENTO: úlcera de córnea em homem, Estado de Anambra, Nigéria
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: CYA, SNA e BDA
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 10 dias
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 25 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: O cultivo original deve ser mantido no máximo por 30 dias em geladeira (entre 4°C e 8°C).
NÚMERO DE PASSAGENS: 2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:: Gugnani HC, et al. Mycotic keratitis in Nigeria. A study of 21 cases. Br. J. Ophthalmol. 60: 607-613, 1976. PubMed: 791355
 Ophthalmic optics--Contact lens care products--Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses. Geneva (Switzerland):International Organization for Standardization/ANSI;ISO ISO 14729:2001.
OBSERVAÇÃO: Repique a partir do congelado a -70° C Lote 0911400099 em 26/11/2014.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



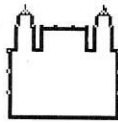
INCQS

Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

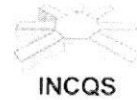
INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40294
NOME CIENTÍFICO: *Aspergillus flavus*
STATUS: CULTURA TIPO
LOTE: 031140294
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 2 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: ATCC 16883, CBS 100927, CBS 569.65
HISTÓRICO: ATCC <<--KB Raper, DI Fennell<<--NRRL 1957
 <<--- Chem. Warfare Serv
FONTES DE ISOLAMENTO: Celofane, Pacífico Sul
DEPOSITANTE: -----
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: Czapek Dox
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 240 h
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 24 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Liofilização
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: Ampola selada à vácuo tem validade indeterminada se mantida entre -10°C e -20 °C.
NÚMERO DE PASSAGENS: 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: Kozakiewicz Z. *Aspergillus* species on stored products. *Commonw. Mycol. Inst. Mycol. Pap.* 161: 1-188, 1989.
OBSERVAÇÕES: O lote é constituído de nove dígitos distribuídos da seguinte forma: os dois primeiros dígitos indicam o mês, os dois seguintes o ano de produção e os cinco últimos dígitos o número da cepa CMRVS.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:
Aspergillus flavus



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária - CMRVS

INFORMAÇÕES DO MICRO-ORGANISMO

26/11/2014

Nº DE ACESSO: 40289
NOME CIENTÍFICO: *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*
STATUS: -----
LOTE: REP40289
CLASSE DE RISCO BIOLÓGICO: 1 A classe de risco pode mudar dependendo do volume manipulado.
Nº DE ACESSO EM OUTRAS COLEÇÕES: IPEC 13/02
HISTÓRICO: INCQS<-- IPEC 13/02<-- UFMT 157/07
FONTES DE ISOLAMENTO: Amostra de raspagem da borda de necrose em torno do olho esquerdo
DEPOSITANTE: Dr. Bodo Wanke
MEIO DE CULTIVO RECOMENDADO: BDA
TEMPO DE INCUBAÇÃO RECOMENDADO: 5 dias
TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO RECOMENDADA: 25 °C
REQUERIMENTO DE OXIGÊNIO: Aeróbica
METODO RECOMENDADO: Congelamento
APLICAÇÕES: -----
SOROLOGIA: -----
PRODUÇÃO DE ENZIMAS: -----
PRODUÇÃO DE TOXINAS: -----
SEQUÊNCIA DE DNA: -----
VALIDADE: O cultivo original deve ser mantido no máximo por 30 dias em geladeira (entre 4°C e 8°C).
NÚMERO DE PASSAGENS: 2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:: Ribeiro LC, Wanke B, da Silva M, Dias LB, Mello R, Canavarros FA, Leite-Jr DP, Hahn RC. Mucormycosis in Mato Grosso, Brazil: a case reports, caused by *Rhizopus microsporus var. oligosporus* and *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*. *Mycopathologia.*; 173(2-3):187-92. 2012 Mar
OBSERVAÇÃO: Repique a partir do lote 011240289N em 26/11/2014.
RASTREABILIDADE: Os testes de pureza, viabilidade e autenticação realizados no lote, apresentaram resultado satisfatório.
CITAÇÃO DA LINHAGEM: Se o uso desta linhagem resultar em publicação científica deverá ser citado da seguinte maneira:

ANEXO II

INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

06/09/2017 870170066231
12:49



0000221607417884

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 019100 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 15180714000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Augusto Viana s/n,

Cidade: Salvador

Estado: BA

CEP: 40-110060

País: Brasil

Telefone: (71)3263 7000

Fax: (71)3263 7027

Email: npi@ufba.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 06/09/2017 às
12:49, Petição 870170066231