



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA CAATINGA

**SUMÉ - PB
2014**

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA CAATINGA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

**SUMÉ - PB
2014**

C626b Clementino, Leandro da Costa.

Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da caatinga / Leandro da Costa Clementino. - Sumé - PB: [s.n], 2014.

52 f.

Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Fungos da caatinga. 2. Antibióticos bioprospecção. 3. Purificação biotecnologia. I. Título.

CDU: 615.33(043.3)

LEANDRO DA COSTA CLEMENTINO

BIOPROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DA CAATINGA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Orientador:

Dr. Jean César Farias de Queiroz



Prof. Examinador 01 – Examinador Interno UATEC - CDSA

Dra. Glauciane Danusa Coelho



Prof. Examinador 02 – Examinador Externo UAEDUC - CDSA

Dr. Rafael Trindade Maia

Aprovada em 30 de maio de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, minha mãe Lourdes, grande guerreira, que sempre me apoiou e incentivou a buscar mais, nunca me desamparou, esteve ao meu lado em todas as horas e sempre soube o quanto é importante à educação em minha vida.

Ao meu pai Severino (*in memoriam*) que partiu muito cedo e não teve a oportunidade de me ver crescer pessoal e profissionalmente, porém sei que onde estiver está torcendo por mim neste momento tão importante da minha vida e orgulhoso pela pessoa que me tornei.

Aos meus irmãos, Cida, Hélio, Lourildo, Luciana, Luciene, Luciano e Nazareno, pela amizade, carinho, e apoio em todos os momentos.

À todos vocês dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que me foi concedido e conduzido ao meu favor;

À Universidade Federal de Campina Grande, em especial ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, que apesar de jovem proporcionou a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu orientador Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz, pelos ensinamentos, amizade, companheirismo e humildade que demonstrou ao longo destes quatro anos de convivência e explicitamente agora na execução deste trabalho, como também à sua esposa Fernanda, por entender o distanciamento do seu marido sempre que preciso para a realização deste trabalho;

À Coordenadora do Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Professora Dra. Fabiana Pimentel por todo o apoio e amizade que me proporcionou;

À todos os professores que tive a honra de adquirir conhecimento e crescer como profissional e como pessoa;

Aos técnicos de laboratório Adriano, Paloma, Simone e Norma pelo apoio, amizade e companheirismo;

À toda a equipe do Biolab pelo apoio, bem como meus companheiros de projeto Mila, Felipe, Dayse e Renally por todo o apoio e auxílio prestado e acima de tudo pela amizade;

Ao meu primo/irmão Jailton Garcia, que foi cúmplice de toda minha vida acadêmica na cidade de Sumé, agradeço a amizade, companheirismo, respeito e por ter feito parte de um momento tão especial da minha vida;

Aos meus amigos Agnodicéia, Antônio, Isa, Rogério e Steve, que passaram por minha vida de forma rápida, mais que deixaram ensinamentos valiosos e pude dividir com vocês alguns momentos especiais;

Às minhas inseparáveis Jucilene e Rayza, mais que amigas, irmãs, cúmplices, juntos desde o quarto período somos uma família de três, agradeço a vocês por todo o carinho, amizade, por me suportarem nos períodos de estresse, pelos conselhos e por me fazerem uma pessoa melhor. Amo vocês!;

À família que eu escolhi pra mim Dayse, Bruna, Mila, Marreiro, Felipe, Raissa, Renally, Rhayanne, Vinicius, Estela, Julya, agradeço muito por ter vocês em minha vida, levarei vocês comigo para sempre, obrigado por tudo, amo todos;

Às ótimas pessoas que conheci na cidade de Sumé, que por vezes me serviram como verdadeiros pais, Dona Sonia Freitas e seu marido Luciano, Seu José Florêncio (Baú) e sua esposa Dona Eliane, Seu Saulo e sua esposa Dona Elza, sou eternamente grato por tudo o que fizeram por mim, seja em palavras ou gestos;

À todos os amigos que conquistei, aos colegas de Turma e a hospitalidade da cidade de Sumé, minha segunda casa.

Aos meus primos, cunhados, tios, tias e sobrinhos pelo incentivo e apoio.

À Edna Carla pelo companheirismo, carinho, cumplicidade e compreensão pela distância que nos foi imposta todos esses anos;

Ao meu afilhado que tanto amo Kayki, por proporcionar momentos únicos de carinho e descontração. Te amo!

À todos que sempre torceram por mim, com esforço, empenho e vontade de vencer, eu cheguei lá e essa é só a primeira conquista de muitas que estão por vir.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O surgimento de microorganismos super-resistentes induz a indústria farmacêutica a desenvolver novos antibióticos, fármacos de amplo espectro e maior eficiência contra bactérias e demais patógenos estão sendo desenvolvidos. Neste sentido, este trabalho buscou a utilização de fungos filamentosos coletados no Bioma Caatinga na microrregião do Cariri paraibano para a produção de antibióticos, visto a necessidade de pesquisas neste sentido utilizando fungos desta região, abrindo expectativa de inovação na indústria farmacêutica. Os fungos foram coletados e avaliados quanto ao seu potencial em produzir compostos antimicrobianos contra bactérias Gram negativa (*Escherichia coli*) e Gram positiva (*Staphylococcus aureus*). Dentre os setenta e dois isolados avaliados, cinquenta e sete (79,17%) apresentaram alguma atividade antimicrobiana, dos quais vinte e sete (47,37%) possuíram atividade contra ambas bactérias e trinta (52,63%) com atividade contra apenas uma destas. Devido aos melhores resultados demonstrados nos testes antibiograma, foram selecionados os isolados CDSA30 e o CDSA71 para a purificação dos extratos antibacterianos através da CLAE-FR. Na purificação dos extratos antimicrobianos foram encontradas duas substâncias que apresentaram atividade antibiótica contra as duas cepas bacterianas utilizadas, estes fungos foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*. O estudo do efeito da temperatura sobre a produção de antibióticos mostrou que há maior rendimento na produção de metabolitos com atividade antimicrobiana quando a temperatura de cultivo for a 45°C.

Palavras chave: Metabólitos secundários. Biotecnologia. Purificação. Antibiograma.

ABSTRACT

The emergence of super-resistant microorganisms induces the pharmaceutical industry to develop new antibiotics, broad spectrum drugs with most effectiveness against bacteria and other pathogens are being developed. Therefore, this study aimed to use filamentous fungi Paraíba's Caatinga collected for antibiotics production, since the need for research in this direction using Caatinga's fungi, opening expectation of pharmaceutical industry's innovation. The fungi were collected and evaluated for their potential to produce antimicrobial compounds against Gram-negative (*Escherichia coli*) and Gram positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria. Among the seventy two isolates, fifty seven (79.17%) showed some antimicrobial activity, of which twenty seven (47.37%) have activity against both bacteria and thirty (52.63%) with activity against only one of these. In line for to better results demonstrated in antibiotic susceptibility testing, the CDSA30 and CDSA71 isolates were selected for purification of antibacterial extracts, by RP-HPLC. In the purification extracts, were found two antimicrobial substances with antimicrobial activity, against both bacterial strains used. These fungi were identified as belonging to the genus *Aspergillus*. The study of the effect of temperature, on the antibiotics production, indicated that there is increased yield in the metabolites production, with antimicrobial activity, when the temperature's cultivation is 45°C.

Keywords: Secondary metabolites. Biotechnology. Purification. Antibiogram.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Mapa de Biomas do Brasil	18
Figura 2 – Representação esquemática dos procedimentos globais para a bioprospecção de produtos naturais	20
Figura 3 – Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. CCD – Cromatografia em Camada Delgada, CP – Cromatografia em Papel, CSC – Cromatografia Supercrítica, CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CG – Cromatografia Gasosa, CGAR – Cromatografia Gasosa de Alta resolução	24
Figura 4 – Equipamento básico da CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador.....	26
Figura 5 – Repique para obtenção de colônias puras	30
Figura 6 – Técnica de Microcultivo para análise de fungos filamentosos	35
Figura 7 – Fungos isolados e após a seleção das colônias (1 e 2). Fungos no vidro âmbar formando a Coleção de Fungos do Semiárido (3)	36
Figura 8 – A) Frascos de vidro com tampa de metal (autoclavável), volume de 40 mL, contendo Meio de aveia. B) Frascos com fungos isolados inoculados para iniciar o cultivo. C e D) Aspecto dos fungos após o cultivo em meio de aveia. E) Extração dos metabólitos secundários em capela de exaustão	37
Figura 9 – CDSA71, fungo do gênero <i>Aspergillus</i> . Na imagem A, colônia após 7 dias de crescimento, na imagem B, conídios e conidióforos	46
Figura 10 – CDSA30, fungo do gênero <i>Aspergillus</i> . Na imagem A, colônia após 7 dias de crescimento, na imagem B, conídios e conidióforos	46
Gráfico 1 – Número de espécies de fungos por região do Brasil	19
Gráfico 2 – Número de extratos e respectivas atividades antibacterianas.....	38
Gráfico 3 – Gráfico da Média (SD) dos halos em antibiograma, a partir do extrato clorofórmico do cultivo (n=5) do espécime CDSA71, contra <i>E. coli</i>	42
Gráfico 4 – Gráfico da Média (SD) dos halos em antibiograma, a partir do extrato clorofórmico do cultivo (n=5) do espécime CDSA71, contra <i>S. aureus</i>	43
Gráfico 5 – Cromatograma em coluna analítica do extrato obtido do espécime CDSA71. Análise realizada em coluna ShimPak – Shimadzu, a um fluxo de 1mL/min, com gradiente crescente de metanol em 30 min, indo de 5 a 95% de metanol, respectivamente.....	44
Gráfico 6 – Cromatograma em coluna analítica do extrato obtido do espécime CDSA30. Análise realizada em coluna ShimPak – Shimadzu, a um fluxo de 1mL/min, com gradiente crescente de metanol em 30 min, indo de 5 a 95% de metanol, respectivamente.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ação antibacteriana dos extratos fúngicos	39
Tabela 2 – Ação antibacteriana dos extratos fúngicos após cultivo em meio líquido.....	41
Tabela 3 – Ação antibacteriana dos extratos fúngicos antes do cultivo em meio líquido.....	41
Tabela 4 – Resultado do teste antibiograma para os compostos purificados do espécime CDSA71	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CCMs – Coleções de Cultura de Microrganismos

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

MS – Metabólitos Secundários

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDSA – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

BSA – Batata Sacarose Ágar

BOD – Biochemical Oxygen Demand

ATCC – American Type Culture Collection

BHIA – Brain Heart Infusion Agar

ADCM – Ágar Dextrose Caseína Malte

UFC – Unidade Formadora de Colônia

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-FR – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Fase Reversa

CLAE-FN – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Fase Normal

BDA – Batata Dextrose Ágar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 FUNGOS	17
2.2 FUNGOS FILAMENTOSOS DA CAATINGA	18
2.3 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	20
2.4 ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS	21
2.5 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FÚNGICOS	22
2.6 METABÓLITOS FÚNGICOS E ATIVIDADE ANTIBIÓTICA	22
2.7 PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	23
2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	25
2.7 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	26
2.7.1 Identificação por microcultivo	27
3 OBJETIVO GERAL	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 CONSTRUÇÃO DA COLEÇÃO DE FUNGOS DO SEMIÁRIDO	29
4.1.1 Meio BSA	29
4.1.2 Isolamento	29
4.1.3 Seleção e Armazenagem	29
4.2 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	30
4.2.1 Microrganismos Utilizados	30
4.2.2 Meios de Cultura e Cultivo	30
4.2.2.1 Meio de Aveia	30
4.2.2.3 Extração por solvente	31
4.3 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
4.3.1 Meio de cultura	32
4.3.2 Preparo do inóculo bacteriano	32
4.3.3 Preparo dos discos de papel	33
4.3.4 Teste antibiograma	33
4.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS	33
4.5 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLAE	34

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	34
4.6.1 Meio de cultura	34
4.7.1 Microcultivo	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA	36
5.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS MELHORES PRODUTORES DE ANTIBIÓTICOS .	40
5.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS.....	42
5.4 PURIFICAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS CONTIDOS NOS EXTRATOS CLOROFÓRMICOS APÓS FERMENTAÇÃO	43
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	45
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais sempre estiveram ligados à humanidade desde os tempos remotos, o homem buscava a cura dos males de acordo com o etnoconhecimento disponível sobre plantas, e outros produtos naturais. Vários medicamentos foram e são desenvolvidos a partir de substâncias encontradas na natureza, nos mais diversos ambientes. Ao passar dos anos a biotecnologia começou a ser aliada a indústria farmacêutica para dar um impulso e otimização na descoberta e aprimoramento de novos fármacos.

As pesquisas que envolvem novos antibióticos se justificam por vários fatores, os quais podemos citar o aparecimento de novos patógenos e a seleção de microorganismos resistentes, diferentes efeitos colaterais dos antibióticos existentes que devem ser eliminados, necessidade de identificação de antibióticos para a agricultura que poderão substituir os agrotóxicos (STROBEL; DAISY, 2003). Dentre os fatores citados há também um fator importante: os níveis de resistência das bactérias, que traz um grande desafio para os novos antibióticos, chamadas de superbactérias. Estima-se que 90-95% das linhagens de *Staphylococcus aureus* existentes no mundo são resistentes a penicilina e em países da Ásia 70-80% destas linhagens são metilicilina resistentes (LOPES, 2011).

Dentro da perspectiva de produção de novos antibióticos, que sejam mais eficazes ou superiores aos existentes, com o auxílio da biotecnologia e a partir de produtos naturais, uma fonte amplamente pesquisada para esse fim são os fungos, conhecidos por seu papel ambiental, por sua versatilidade na obtenção de metabólitos secundários e pela facilidade na reprodutibilidade de resultados. Vários compostos com atividade antibiótica, que vão desde antiparasitários, antifúngicos e antibióticos até anticâncer já foram produzidos, isolados e caracterizados a partir de fungos (CAMPOS, 2009; MOMESSO, 2008; SANTOS, 2012).

No Brasil, alguns grupos de pesquisa já conseguiram purificar e caracterizar quimicamente alguns compostos com atividade antibacteriana, de fungos endofíticos ou micorrízicos e de diversos biomas, como na Amazônia e no Cerrado, por exemplo, (MOMESSO, 2008). No Bioma Caatinga esta linha de pesquisa é bastante pontual, são raros os trabalhos nesse sentido envolvendo microrganismos recorrentes. Nesse sentido este trabalho busca a bioprospecção de fungos produtores de antibióticos isolados do Bioma Caatinga, mais precisamente no Cariri paraibano, bem como, a identificação destes fungos e posterior purificação dos extratos que apresentarem atividade antibiótica contra duas cepas

bacterianas uma Gram negativa e outra Gram positiva, visando à descoberta de novos antibióticos e a construção de uma biblioteca de fungos, uma “Coleção de Fungos da Caatinga”, que servirá como base para inúmeros trabalhos a serem desenvolvidos no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FUNGOS

Os Fungos constituem um grupo heterogêneo de microrganismos aclorofilados heterotróficos, na qualidade de sapróbios, parasitas, ou menos frequentemente, como simbioses que vivem em associação com outros organismos (DIX; WEBSTER, 1995). Todos os fungos são eucariotos e podem ser unicelulares (leveduras, quitrídias), ou multicelulares, produtores de esporos, com nutrição por absorção, capazes de se reproduzirem tanto sexuada quanto assexuadamente, cujas células estão envolvidas por parede celular, rica em quitina e também com galactose e manana, sua membrana celular é rica em ergosterol (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996). Praticamente qualquer parte do fungo é capaz de crescer, e um fragmento do organismo é capaz de produzir um novo ponto de crescimento e gerar um novo indivíduo (SILVA, 2009). Normalmente possuem dois núcleos em suas células os quais podem ser visualizados pelo microscópio óptico empregando-se técnicas de coloração apropriadas (SILVA; COELHO, 2006). Com uma extensa variedade de organismos são cosmopolitas, de formas microscópicas, apresentando-se também em formas macroscópicas, coexistindo em harmonia nos mais diversos ambientes (CARDOSO, 2011).

Estes alimentam-se de substratos orgânicos, tornando-se essenciais para a reciclagem de minerais e carbono no solo e na água (MOORE - LANDECKER, 1996). Desenvolvem importante papel no ambiente, principalmente no equilíbrio ambiental participando da decomposição de algumas espécies vegetais, podendo associar-se com plantas de forma benéfica, como é o caso das micorrizas que auxiliam a planta na absorção de água e minerais (CARDOSO, 2011; PEREIRA *et al.* 1996). Porém são causadores de inúmeras doenças em humanos, animais e vegetais dependendo do tipo de contato e nível de contaminação pelo fungo (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Os fungos são utilizados para a obtenção de diversos produtos extras e intracelulares que são utilizados nos mais diversos fins, seja na indústria de alimentos, cosmética, têxtil e farmacêutica, como em biorremediação (SILVA; COELHO, 2006), isso ocorre pela versatilidade que alguns fungos possuem de produzir determinado produto dependendo do meio de cultura em que é submetido ao crescimento, tal característica permite com que os produtos fungicos sejam explorados e aprimorados pelo setor industrial para a obtenção de enzimas, antibióticos e demais produtos provenientes destes (LOPES, 2011; MORE-LANDECKER, 1996).

2.2 FUNGOS FILAMENTOSOS DA CAATINGA

A Caatinga é o bioma brasileiro predominantemente da região semiárida do país encontrada principalmente na região Nordeste, é um mosaico de florestas secas e vegetação arbustiva, com enclaves de florestas úmidas em montanhas e cerrados (TABARELLI; SILVA, 2003), o clima semiárido submete sua biota a condições extremas como temperaturas médias anuais entre 26-28 °C, chegando acima dos 35°C em alguns períodos do ano e baixas precipitações que variam de 300-1000 mm anuais, que são irregulares e concentradas em 3 a 6 meses por ano (PRADO, 2003).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE - 2004), o Bioma Caatinga se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%), ocupando cerca de 844.453 Km², correspondente a 9,92% do território nacional, como visto na Figura 1.

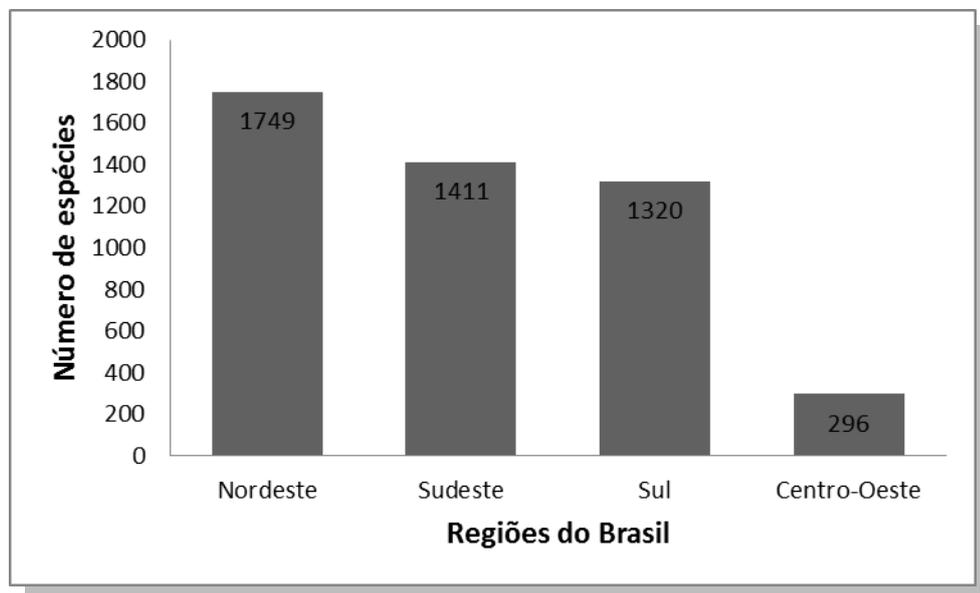
Figura 1 - Mapa de Biomas do Brasil.



Fonte: (IBGE, 2004).

A diversidade fúngica de ambientes áridos e semiáridos pode ser igual ou superior quando comparada a ambientes úmidos. A Região do Nordeste brasileiro apesar de ser caracterizada pelo clima semiárido possui registro de maior diversidade de espécies fúngicas, com 1.749, seguida pela Sudeste com 1.411, Sul com 1.320, Norte com 743 e Centro-Oeste com 296 (FORZZA *et al.*, 2010), como mostra a Figura 2. Segundo o Catálogo Brasileiro de Plantas e Fungos do Brasil (2010), o Nordeste Brasileiro possui cerca de 1749 espécies fúngicas, sendo que 734 destas encontram-se no Bioma Caatinga, com 261 presentes no estado da Paraíba.

Gráfico 1 - Número de espécies de fungos por região do Brasil.



Fonte: Adaptado de (FORZZA, *et al.*, 2010).

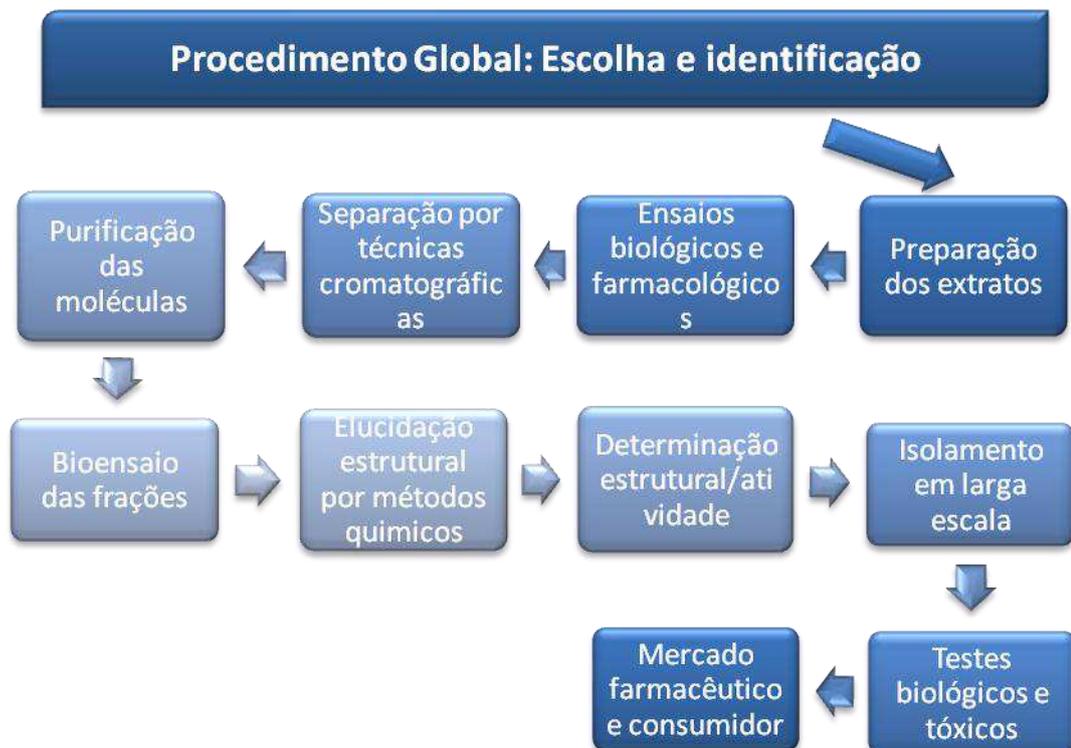
Os Fungos filamentosos formam um grupo de organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente como fábricas celulares para a produção de enzimas e utilizados para os mais diversos fins onde seus metabólitos secundários são de grande interesse farmacológico, a exemplo dos antibióticos, esteroides e inúmeras outras substâncias bioativas que apresentam diversas aplicações biotecnológicas (LOPES, 2011). No bioma Caatinga existem vários estudos de identificação de fungos filamentosos e aplicações biotecnológicas destes, sendo catalogados diversos gêneros como *Acremonium sp*, *Aspergillus sp*, *Chrysosporium sp*, *Cladosporium sp*, *Fusarium sp*, *Monilia sitophila*, *Penicillium sp*, *Scedosporium sp*, *Scopulariopsis sp* e *Sepedonium sp*, dentre outros (SANTOS, 2012). Existem algumas Coleções de Culturas de Microorganismos (CCMs) que funcionam como bancos que armazenam as espécies coletadas, as quais são identificadas e estudadas em

função de todas as potencialidades biotecnológicas existentes. No Nordeste existem sete CCMs, três na Bahia, três em Pernambuco e uma no Piauí, dessas, destacam-se as coleções da Micoteca de Pernambuco – URM, com 6.000 amostras de leveduras e fungos filamentosos, e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com 4.500 amostras de bactérias e actinomicetos (PPB, 2006).

2.3 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

A bioprospecção é a pesquisa de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos de forma a garantir o uso sustentável, a utilização de estratégias de conservação, a garantia de distribuição justa e igualitária dos benefícios provenientes de sua utilização, assim como a promoção e regulamentação de novas tecnologias, uma vez que este material biológico tornou-se um recurso e a informação genética tem valor de mercado (AZEVEDO, 2003). Para realizar a bioprospecção de produtos naturais e consequente investigação dos metabólitos obtidos é necessário seguir algumas etapas descritas na Figura 3.

Figura 2 - Representação esquemática dos procedimentos globais para a bioprospecção de produtos naturais



Fonte: Adaptado de (SANTOS, 2012).

Para fungos, é encontrada na literatura de forma corriqueira a bioprospecção de moléculas de fungos endofíticos (SANTOS, 2012; MELO, 2009), associados a plantas dos

mais diversos biomas, inclusive da Caatinga. Segundo Santos (2012), foi possível a prospecção de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* (Mofumbo), que apresentaram atividade contra células de carcinoma de mama, próstata e pulmão, como também atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. No Bioma Caatinga, ainda é bastante pontual a bioprospecção de fungos para a obtenção de bioprodutos, porém com o avanço das biotecnologias este cenário está mudando rapidamente, visto que já existem grupos de pesquisa dedicados exclusivamente a esta prática.

2.4 ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR FUNGOS

No mundo são conhecidas diversas fontes de compostos bioativos, e a pesquisa para o isolamento de novos metabólitos fúngicos que teve início há vários anos atrás, ainda continua muito ativa (ARCHER; CONNERTON; MACKENZIE, 2008; SUN *et al.*, 2010). Produtos naturais de fungos tem se tornado fármacos revolucionários no tratamento de diversas doenças, como também servido de “molde” para fármacos inovadores (JIANG; AN, 2000). Antibióticos produzidos por microorganismos são definidos como produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular, ativos em baixas concentrações contra outros microrganismos (DEMAIN, 1999).

Alguns compostos incluem o antibiótico penicilina, o imunossupressor ciclosporina e o agente hipocolesterolemizante lovastatina, os antibióticos β -lactâmicos ácido clavulâmico, amoxicilina, cefaclor e ceftriaxona, ainda no ano de 1994, atingiram o topo da lista dos medicamentos mais vendidos no mundo (BERDY, 1989). Embora diversos antibióticos disponíveis hoje no mercado sejam produtos de síntese ou semi-síntese, a maioria das classes de fármacos antibióticos usados na terapêutica atual teve, como modelos, produtos naturais de microrganismos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Em um levantamento bibliográfico realizado com mais de 23.000 produtos microbianos bioativos incluindo agentes antifúngicos, antibacterianos, antivirais, citotóxicos e imunossupressores, demonstra que as principais linhagens produtoras são do Reino Fungi (42%), seguidas por linhagens pertencentes ao gênero *Streptomyces* (bactérias) (32,1%) (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2010).

Substâncias com atividades antibióticas também tem amplo emprego na agricultura, em especial, os antibióticos com atividade antifúngica, devido ao fato de que há elevados prejuízos econômicos em decorrência da perda de lavouras, grãos e frutas pela contaminação por fungos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

2.5 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FÚNGICOS

Metabólitos secundários (MS) são produzidos quando o crescimento microbiano encontra-se na fase estacionária, são frequentemente bioativos e de baixa massa molecular. Apresentam grande importância para a humanidade, devido às atividades antibióticas e de importância farmacêutica, bem como atividades imunossupressoras e tóxicas como agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossupressores (DEMAIN, 1999).

A síntese de metabólitos secundários pode garantir ao fungo vantagem em habitats no qual necessita competir com outros microrganismos. Portanto muitos metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios em outros organismos. (KALDHI et al., 2010). Outros produtos naturais de fungos possuem impacto negativo para a sociedade, incluindo micotoxinas e compostos que causam aumento da virulência, produzidos por fungos patogênicos (DEMAIN, 1999).

Para a obtenção dos MS de fungos filamentosos é necessário submetê-los a circunstâncias de escassez de nutrientes, geralmente ocasionados por meio nutritivos adequados, ou após determinado tempo de crescimento em competição com outros fungos. O meio de cultura é crucial, pois irá proporcionar as condições ideais para que o microrganismo possa produzir a biomolécula de interesse na quantidade desejada. Podem ser obtidos em fermentações sólidas, semissólidas ou fermentação submersa, seguida de etapas de purificação (LOPES, 2011).

2.6 METABÓLITOS FÚNGICOS E ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

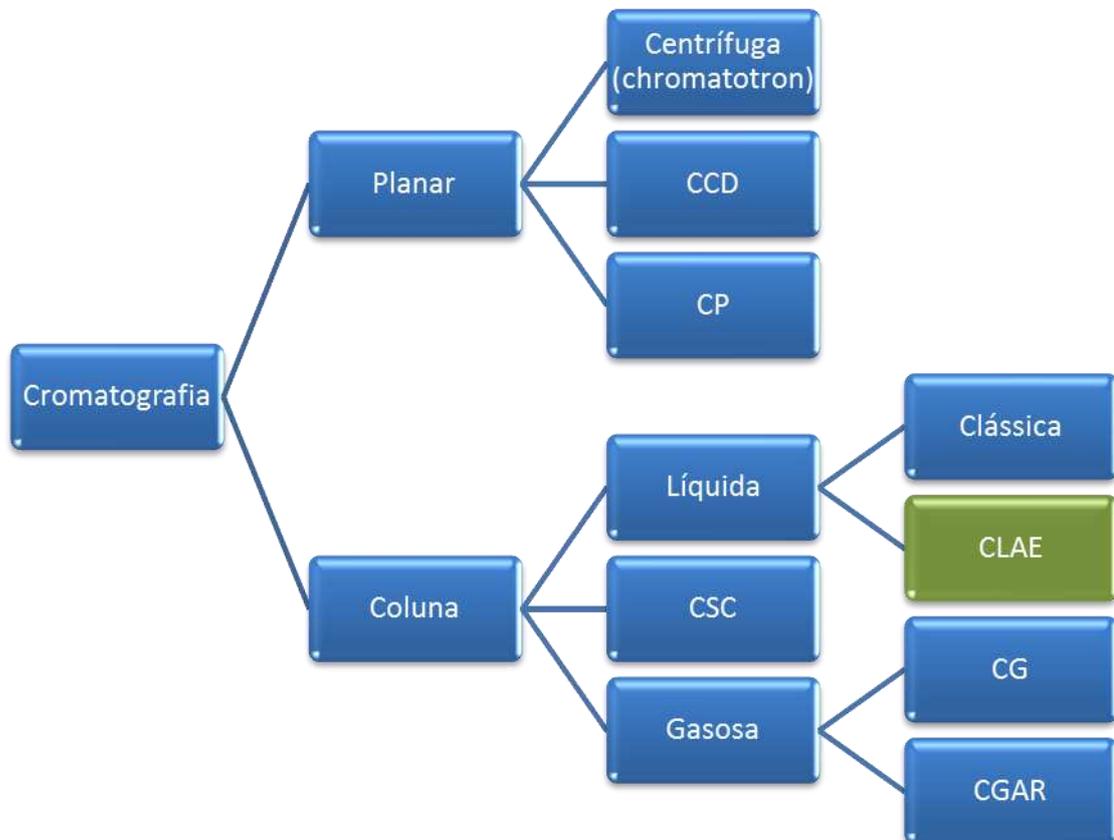
Dentre os metabólitos bioativos descobertos que, entre outras atividades, possuem atividade antibiótica, cerca de 8600 (38%) são obtidos de linhagens fúngicas que incluem principalmente gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SANTOS, 2012). O gênero *Penicillium* é conhecido por apresentar marcadores específicos para alguns gêneros como a epi-neoxalina, assim como metabólitos ativos contra Gram-negativas como o ácido micofenólico (VINOKUROVA et al., 2005; OVERY et al., 2006). Os Fungos do gênero *Aspergillus* são alvos de inúmeras pesquisas. Furtado e colaboradores (2005), conseguiram isolar sete substâncias chamadas de dictopirazinas, que apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*.

Um grupo de pesquisadores de San Diego nos Estados Unidos da América recentemente descobriu um antibiótico, a Antracimicina ($C_{25}H_{32}O_4$), produzido por um Actinomiceto isolado de sedimentos marinhos próximos à costa de Santa Barbara no estado da Califórnia. Esse antibiótico apresentou atividade potencial para o tratamento de doenças causadas pelo *Bacillus anthracis* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (JANG et al., 2013). Bachiega e colaboradores (2005) conseguiram isolar de um estreptomiceto da região de Araraquara no estado de São Paulo, semelhante à eurocidina, utilizando técnicas cromatográficas. Esse mesmo grupo de trabalho já conseguiu isolar diversas cepas produtoras de antibióticos, como a 26-deoxilaidilomicina, bem como antibióticos antifúngicos poliênicos dos grupos de heptaenos, hexaenos, pentaenos, tetraenos e antifúngicos não polienos.

2.7 PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Entre os métodos de purificação de biomoléculas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, uma estacionária (FE) e uma móvel (FM), que estão em contato íntimo. Ela pode ser classificada de diversas formas, de acordo com a forma física do sistema empregado, pela fase móvel empregada, pela fase estacionária utilizada, como também pelo modo de separação (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A Figura 4 apresenta de forma resumida os diferentes tipos de cromatografia.

Figura 3 - Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. CCD – Cromatografia em Camada Delgada, CP – Cromatografia em Papel, CSC – Cromatografia Supercrítica, CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CG – Cromatografia Gasosa, CGAR – Cromatografia Gasosa de Alta resolução.



Fonte: Adaptado de (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Na cromatografia, uma das fases permanece estacionária e possui grande área, enquanto a outra é um fluído que percola através da primeira. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes. O transporte de substâncias sujeita à separação pode ser efetuado por um fluído líquido (pentano, hexano, éter, misturas de álcoois e água, etc.) ou por um fluído gasoso (hidrogênio, nitrogênio, dióxido de carbono, hélio, etc.).

A fase estacionária é geralmente acomodada em uma coluna de vidro ou metal, numa placa de vidro, alumínio ou papel de filtro. Os compostos que são fracamente retidos pelo sorbente da fase estacionária passam mais rapidamente pela coluna, enquanto os que estabelecem ligações mais fortes com a fase estacionária saem mais lentamente até à separação completa dos componentes de uma mistura. Quanto mais tempo de retenção uma

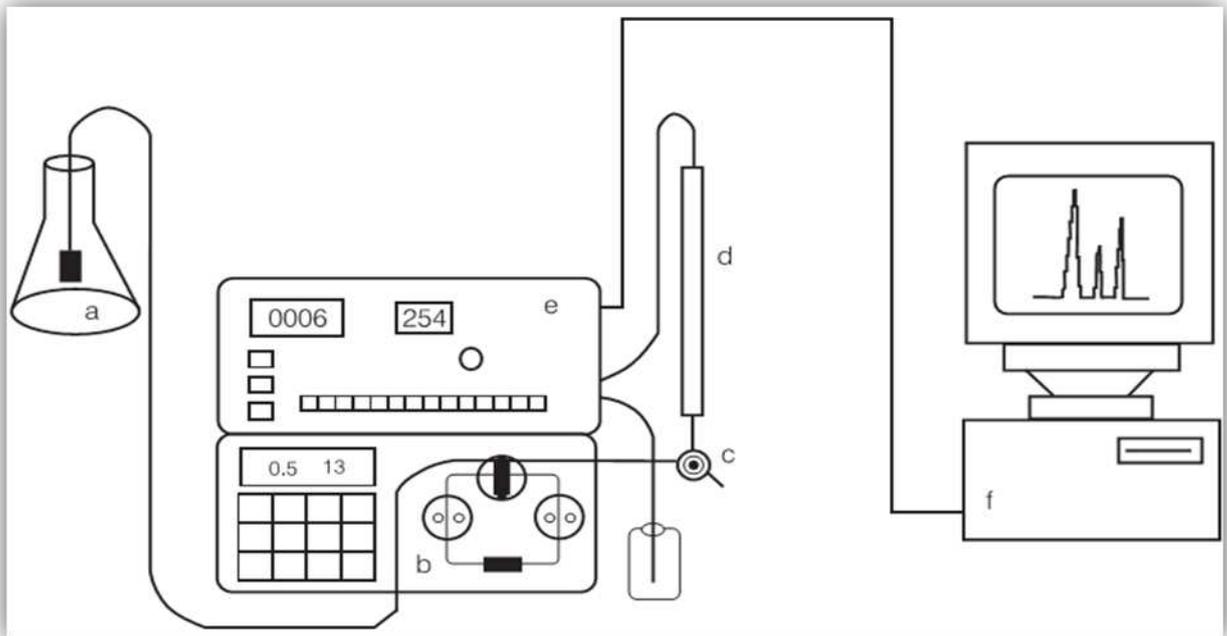
determinada substância apresentar, menor será sua afinidade com a fase móvel e consequentemente sua solubilidade. O processo de escoamento de substâncias por toda a extensão de coluna cromatográfica na fase móvel é chamado de eluição (SCHWEDT, 1997), que pode ser isocrática (mesma composição da fase móvel durante a eluição) ou gradiente (a composição da fase móvel varia durante a eluição). O resultado de um processo cromatográfico é o cromatograma, que trata-se de um gráfico que representa a concentração do analito no efluente em função do tempo ou volume de eluição. O detector é quem registra e gera o cromatograma (GOMES, 2010).

2.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é de especial importância entre os métodos analíticos modernos, pois ela complementa de forma ideal as técnicas cromatográficas conhecidas (cromatografia em coluna convencional, cromatografia em camada delgada e cromatografia de gases). A CLAE é, portanto, um método bastante seletivo e requer tempos de análise curtos, pequena quantidade de amostra a ser analisada, apresentando também uma grande sensibilidade de detecção (GOMES, 2010).

Um sistema de CLAE é composto por um sistema de reservatório de solvente, uma bomba, um injetor de amostra, uma coluna, um detector e um computador com software de aquisição e processamento de dados, a Figura 5 apresenta um sistema de funcionamento da CLAE (ROSA, 2005; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A CLAE pode ser dividida em dois grupos principais, a CLAE-FN (fase normal) e a CLAE-FR (fase reversa) que ocorre pela composição da FE que proporciona a coluna uma característica hidrofóbica. Na CLAE-FN a fase estacionária possui características polares que irão interagir atrativamente com analitos polares, já na fase reversa as forças atrativas entre o analito e a fase estacionária ocorrem por atrações não polares. Pode-se afirmar que, na cromatografia em fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel (ROSA, 2005).

Figura 4 - Equipamento básico da CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector; f) registrador.



Fonte: (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A maioria das separações é realizada por CLAE-FR devido sua abrangência que por fase normal, isso ocorre porque apenas um número reduzido de compostos ficam retidos permanentemente na coluna, limitando assim a CLAE-FN. As colunas empregadas tendem a ser mais robustas para suportar a alta pressão (PRICHARD; MACKAY; POINTS, 1996).

2.7 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Para identificar os fungos são consideradas todas as suas estruturas, estruturas reprodutivas são diferentes das estruturas somáticas e, por exibirem uma variedade de formas, são extremamente úteis para a classificação taxonômica dos fungos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

A identificação de fungos filamentosos tem como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia tem como objetivos observar a cor, pigmentos, textura, conformação da colônia dentre outros aspectos e pode ser conduzida em tubo de ensaio com meio de cultura específico, geralmente ágar *sabouroud* dextrose, ou ágar batata dextrose (ANVISA, 2004). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) é mais adequado analisar a partir da colônia crescida, em uma colônia feita no ponto central de uma camada de ágar em placa de petri, onde a

velocidade de crescimento pode ser rápida, menos que sete dias ou lenta, mais que quinze dias. A observação de estruturas microscópicas, como as hifas, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação desta classe de fungos.

2.7.1 Identificação por microcultivo

A técnica de microcultivo é utilizada para a identificação de fungos filamentosos pois permite a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, como os esporângios que são órgãos de reprodução dos zigomicetos (ANVISA, 2004). O fungo é inoculado na lâmina de vidro para microscopia contendo o meio de cultura e o crescimento é acompanhado no microscópio óptico, até o momento em que sejam detectadas estruturas responsáveis pela característica de cada gênero fúngico.

Esta técnica tem sido utilizada com sucesso por vários grupos de pesquisa, Bisognin (2012), obteve a identificação de 19 gêneros de fungos filamentosos, em uma Biopilha contaminada por hidrocarbonetos em Santa Cruz do Sul, no Rio Grande do Sul. Schuber e colaboradores (2012) conseguiram a identificação de seis gêneros de fungos produtores de β -galactosidase em meio seletivo contendo antibacterianos.

3 OBJETIVO GERAL

- Descobrir novos antibióticos produzidos a partir de fungos do Bioma Caatinga no Cariri paraibano.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos coletados de ambientes da Caatinga, no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – Sumé/PB;
- Selecionar os fungos que gerem compostos antibacterianos e montar uma coleção com estes fungos;
- Avaliar o potencial antibacteriano dos compostos encontrados;
- Purificar os antibióticos dos melhores extratos, já confirmados, com atividade antibacteriana;
- Avaliar a atividade antibacteriana das substâncias purificadas;
- Identificar os melhores produtores de antibióticos.

4 METODOLOGIA

Todos os procedimentos descritos nesta metodologia foram realizados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar vertical. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química e Laboratório de Biologia - Biolab do CDSA – UFCG. O processo de purificação foi realizado no Centro de Biotecnologia - CBiotec da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.1 CONSTRUÇÃO DA COLEÇÃO DE FUNGOS DO SEMIÁRIDO

Foram realizadas coletas de amostras de solo e de plantas no período entre Setembro e Outubro de 2011, nas mediações do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) – Sumé/PB com coordenadas 7° 40' 19" S, 36° 52' 48" W, distante 264 km da capital da Paraíba, João Pessoa, estas amostras foram inseridas em tubos cônicos de plástico de 1,5 mL e adicionados 1 mL de solução salina (0,9%), a solução formada foi agitada e todo o sobrenadante foi retirado e inserido em placas de Petri contendo meio batata-sacarose-ágar (BSA), descrito no tópico seguinte.

4.1.1 Meio BSA

Toda a suspensão salina obtida foi inoculada meio batata-sacarose-ágar, nas proporções descritas abaixo. O ph do meio foi ajustado com HCl para $6,0 \pm 0,1$, distribuído em frascos erlenmeyer de 500 mL e autoclavados, a 121 °C e 1 atm, por 20 minutos.

Ágar	5 g
Sacarose	20 g
Batata	100g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

4.1.2 Isolamento

Após a inoculação do sobrenadante em placas de petri contendo meio BSA, as placas foram incubadas em câmara BOD (Demanda Bioquímica do Oxigênio), por 72 horas, a 37°C.

4.1.3 Seleção e Armazenagem

Após a incubação, foram selecionados os fungos que se destacaram em placa de petri e recultivados na metodologia de quatro pontos por placa afim da obtenção de colônias puras. Após esta etapa os isolados foram inoculados em frascos de xarope âmbar contendo 10 mL de meio BSA, incubados em câmara BOD à 37°C, por 42 horas, em seguida foram armazenados em refrigerador a 8°C, formando assim a Coleção de Fungos da Caatinga do CDSA.

Figura 5 - Repique para obtenção de colônias puras.



Fonte: Felipe Douglas.

4.2 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.2.1 Microrganismos Utilizados

Os microorganismos utilizados nesta etapa foram os isolados provenientes da Coleção de Fungos da Caatinga, denominados CDSA 01, 07, 30, 59, 70 e 71, que apresentaram maiores halos de atividade antibacteriana (SILVA; QUEIROZ, 2012).

4.2.2 Meios de Cultura e Cultivo

4.2.2.1 Meio de Aveia

Para a obtenção dos metabólitos secundários, foi utilizado um meio com poucos nutrientes, composto por 5 gramas de aveia comercial em flocos, homogeneizada em 15mL de água destilada e autocavada por 1 hora à 121°C, 1 atm. Os isolados citados anteriormente foram inoculados e incubados em estufa de crescimento por aproximadamente 144 horas a 37 °C.

4.2.2.2 Meio de Extrato de Malte

Os isolados foram submetidos ao crescimento em meio de cultura contendo Extrato de Malte (Himedia[®]) e Dextrose nas proporções descritas abaixo, em seguida distribuídos em erlenmeyers de 150 mL, com 50 mL cada e autoclavados durante 15 minutos, à 121°C e 1 atm.

Extrato de malte	10 g
Dextrose	18 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ com HCl e incubados em agitador rotativo, sob agitação de 140 rpm, temperatura de 37°C durante 72 horas.

4.2.2.3 Extração por solvente

Para a fermentação em meio de aveia após o crescimento dos fungos, foi adicionado em cada frasco de cultura 10 mL de clorofórmo PA 99,8%, homogeneizado e filtrado em papel de filtro (28 μ m) em capela de exaustão. Em seguida os extratos obtidos foram filtrados a vácuo e armazenados em tubos plásticos sob refrigeração.

Para a fermentação em meio de Extrato de Malte após o crescimento dos fungos, o caldo fermentado obtido foi filtrado assepticamente em papel de filtro, a fim de separar a massa micelial dos metabólitos produzidos. Obtidos os metabólitos, estes foram submetidos a partição com clorofórmo (CHCl_3), resultando em 3 fases, denominadas fase A (inferior), fase B (intermediária) e fase C (superior) que foram separadas em funil de separação, e concentradas em rotoevaporador. Também foi realizada a partição com clorofórmo e éter de petróleo, a fim de realizar uma separação mais precisa de moléculas utilizando um solvente apolar (éter de petróleo) e um polar (clorofórmo), resultando em uma extração triplo líquido. Estes extratos foram separados em funil de separação e concentrados em rotoevaporador.

4.3 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste de antibiograma é comumente utilizado para identificar compostos com ação antimicrobiana, nesta pesquisa, este teste foi realizado com duas linhagens bacterianas, uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e outra Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922). As linhagens de bactérias foram gentilmente cedidas pelo Prof. José Pinto de

Siqueira Júnior, Departamento de Biologia Molecular – UFPB, conservadas em meio de cultura Infusão de Cérebro-Coração em Ágar (BHIA).

4.3.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nos testes antibiograma foi o ágar-dextrose-caseína-malte (ADCM), conforme segue:

Ágar caseína	32,5 g
Dextrose	20 g
Extrato de malte	10 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O meio foi fundido, o pH ajustado com NaOH para $7,0 \pm 0,1$, distribuído em erlenmeyers (250 mL) e autoclavado por 15 minutos, a 121°C , 1 atm, em seguida vertido cerca de 20 mL em placas de petri.

Inicialmente os testes foram realizados utilizando o meio batata-sacarose-ágar-leite, o leite utilizado foi em pó e desnatado, a composição do meio foi da seguinte forma:

Ágar	5 g
Batata	100g
Sacarose	20 g
Leite em pó	20 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O meio foi fundido, o pH ajustado com NaOH para $7,0 \pm 0,1$, distribuído em erlenmeyers (250 mL) e autoclavado por 15 minutos a 121°C , 1 atm, em seguida vertido cerca de 20 mL em placas de petri.

4.3.2 Preparo do inóculo bacteriano

Foi retirada com uma alça de platina, previamente flambada, uma pequena quantidade de bactérias, estas foram inseridas em solução salina (0,9%) e as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas por meio de uma diluição seriada na ordem de 10^{-6} . Inoculou-se em meio ADCM todas as diluições e incubou-as em estufa de crescimento (BOD) por 12 horas a 37°C , em seguida realizou-se a contagem resultando em 9×10^5 UFC/mL, que foi utilizada nos testes antibiograma.

4.3.3 Preparo dos discos de papel

Os discos de papel foram preparados conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (1988) com algumas adaptações. Foi adicionado em cada disco de papel de filtro de 13 mm, 10 µL do extrato obtido, esperando a absorção e repetindo o processo novamente. A fim de comparar o potencial antibacteriano dos metabólitos produzidos, foram preparados discos contendo o antibiótico amoxicilina na concentração de 100mg/mL, como controle positivo e discos contendo apenas clorofórmio PA (99,8%), como controle negativo.

4.3.4 Teste antibiograma

Semeou-se 1 mL da solução padrão de bactérias (9×10^5 UFC) *S. aureus* e *E. coli* em placas de petri contendo meio ADCM aguardando secar, conseguinte os discos contendo o extrato obtido foram dispersos sobre as bactérias com o auxílio de uma pinça. As placas foram identificadas e incubadas em câmara BOD, à 37°C, por 12 horas.

4.4 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Foram selecionados dois isolados para este estudo de acordo com a melhor produtividade de compostos antibacterianos, logo foram escolhidos o isolado CDSA30 e o CDSA71, que foram cultivados em meio BDA por 72 horas, em triplicata. Para padronização do inóculo adicionou-se 6 mL de solução salina (0,9%) e uma gota de detergente em cada placa, afim de obter-se uma solução uniforme de esporos. Foi inoculado 1 mL da suspensão de esporos em meio de aveia, cultivado por 144 horas, em quintuplicata, nas temperaturas de 28°C, 37°C e 45°C. Em seguida, extraíram-se os metabólitos produzidos, com a adição de 10 mL de clorofórmio, em cada frasco de cultivo, após esta etapa, foram realizados os testes antibiograma.

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise no software Origin Pro 8, utilizando o teste de *Fisher*, que é um teste não paramétrico, útil para analisar dados discretos (nominais ou ordinais), quando os tamanhos das amostras são pequenos e funciona atribuindo a cada indivíduo do grupo, um dentre dois escores possíveis. Os escores são frequências em uma tabela 2x2, os cabeçalhos são arbitrariamente indicados com sinais de "mais" e "menos". A prova determina se os dois grupos diferem na proporção em que se enquadram nas duas classificações, ou seja, a prova determina se o Grupo I e o Grupo II diferem

significativamente na proporção de sinais "mais" e "menos" atribuídos a cada um (VIALI, 2014).

4.5 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS POR CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de Fase Reversa (CLAE-FR), foi realizada no Laboratório de Caracterização de Biomoléculas CCEN - UFPB, em colaboração com o Prof. Josean Fachine e a Doutoranda Camila Holanda de Albuquerque.

As amostras provenientes dos extratos em clorofórmio dos isolados CDSA30 e CDSA71 foram secas em calor seco, em seguida diluídas em Metanol a 50% e filtradas em filtro com poro de 0,45 µm. Foi utilizada uma coluna C18 (150 mm X 4,6 mm, com partícula de 5µm) ShimPack –Shimadzu, em um cromatógrafo SHIMADZU, Modelo Série 10A vp. Foi programado um gradiente de água deionizada (Tampão A) e Metanol (Tampão B), a um fluxo de 1 mL/min, onde foi passado um Volume de Coluna (5 min) em 5% de metanol. O gradiente de Metanol foi crescente até 95% de metanol, em 30 min, seguido de uma lavagem da coluna com 95% de metanol por 5min. Os cromatogramas apresentados nas Figuras 12 e 13, foi realizado com leitura do eluído em 289 nm.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

4.6.1 Meio de cultura

Para a identificação dos fungos foi utilizado o meio batata-dextrose-ágar BDA, nas proporções descritas abaixo. O meio foi fundido, ph ajustado para $7,0 \pm 0,1$, distribuído em Erlenmeyers (250 mL) e autoclavado por 15 minutos, a 121°C, 1 atm.

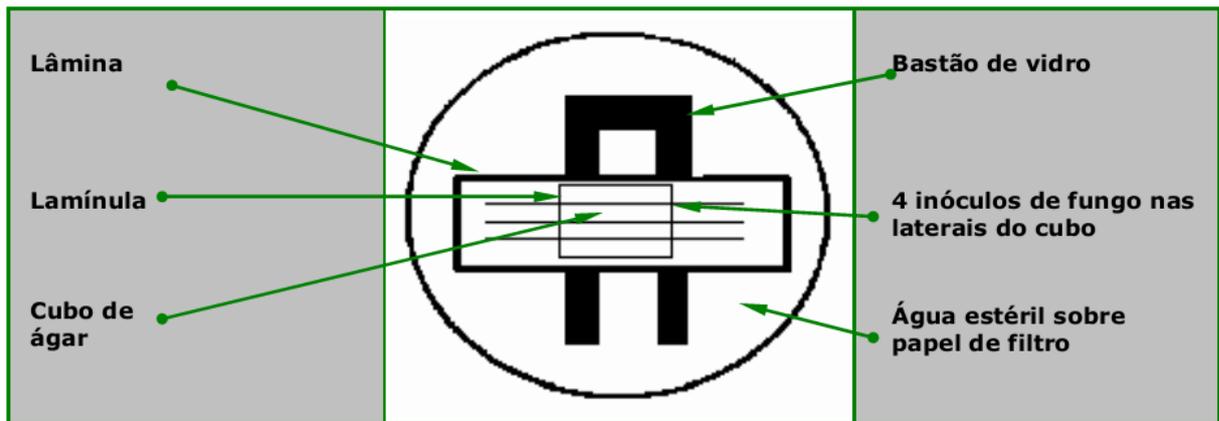
Ágar	5g
Batata	100g
Dextrose	20g
Água	q.s.p 1000 mL

4.7.1 Microcultivo

A técnica de microcultivo foi utilizada conforme descrito pela ANVISA (2004) adaptado. Em uma lâmina para microscopia esterilizada, foi adicionado aproximadamente 1

mL de meio BDA, em seguida foi inoculado o fungo de interesse, coberto por uma lamínula também estéril e selada 3 lados da lamínula, deixando apenas uma entrada de oxigênio. Este conjunto foi inserido em uma placa de petri contendo papel de filtro úmido com água destilada esterilizada e sobre dois palitos de madeira como suporte (Figura 7). Após isso foi incubado a 37°C, com acompanhamento do crescimento por 96 horas e comparação das imagens obtidas com literatura especializada.

Figura 6 - Técnica de Microcultivo para análise de fungos filamentosos



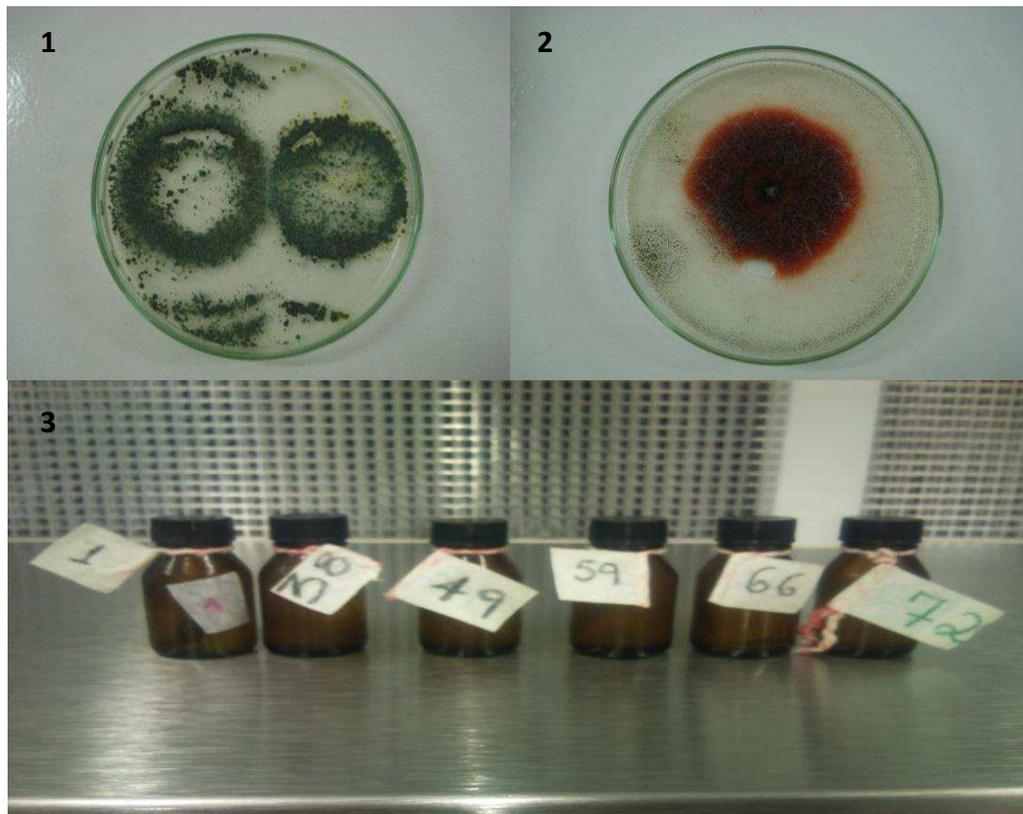
Fonte: (ANVISA, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLEÇÃO DE FUNGOS DA CAATINGA

Após algumas coletas de solo e partes aéreas de plantas, e cultivo do material obtido em meio BSA, observou-se uma grande variedade de espécimes fúngicas. Ocorreu perda de algumas colônias devido à contaminação por bactérias, preferiu-se a não utilização de antibióticos visto que estes presentes no meio de cultura poderiam ocasionar o mascaramento do potencial dos fungos para a produção de antibióticos. No entanto foi possível o isolamento de 72 colônias puras, sem contaminação por bactérias ou outros fungos. Na Figura 8, mostra as colônias purificadas armazenadas sob refrigeração, estas estão sendo utilizadas para a produção de antibióticos bem como outras pesquisas no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido.

Figura 7 - Fungos isolados e após seleção das colônias (1 e 2). Fungos no vidro âmbar formando a Coleção de Fungos do Semiárido (3).



Fonte: Felipe Douglas.

Consequente a construção da coleção de fungos, partiu-se para o cultivo em meio de aveia, com poucos nutrientes que proporcionasse a produção dos metabólitos secundários

responsáveis pela atividade antibiótica. Um meio de cultura contendo apenas um nutriente, neste caso a aveia, induz o fungo a produzir substâncias de defesa para vencer a competição por alimento, geralmente este fato é evidenciado pela esporulação e, conseqüentemente a cor peculiar que o fungo obtém no meio de aveia. Calvo e colaboradores (2002) e Okafor (2007) levantam a hipótese de que a produção destes metabólitos secundários regulam algumas mudanças morfológicas para os microrganismos, envolvidas comumente com a esporulação, ativando-a ou produzindo pigmentos para suas estruturas. Na Figura 9 torna-se evidente a esporulação e a cor característica de cada fungo após cultivo em meio de Aveia.

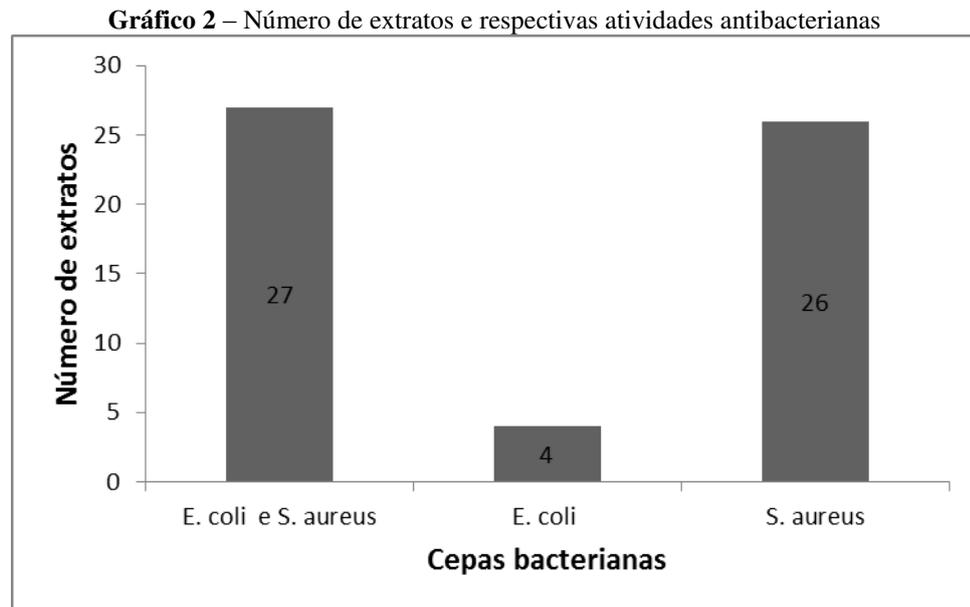
Figura 8 - A) Frascos de vidro com tampa de metal (autoclavável), volume de 40 mL, contendo Meio de aveia. B) Frascos com fungos isolados inoculados para iniciar o cultivo. C e D) Aspecto dos fungos após o cultivo em meio de Aveia. E) Extração dos metabólitos secundários em capela de exaustão.



Fotos: Felipe Douglas.

Dentre os 72 isolados da coleção, 57 (79,%) apresentaram atividade antimicrobiana comprovada através dos testes antibiograma em meio BSAL, dos quais 27 extratos (47,37%) dos isolados apresentaram atividade contra *E. coli* e *S. aureus*, e 30 extratos (52,63%) com

atividade apenas contra uma dessas bactérias (Gráfico 2), com destaque para 26 extratos que inibiram total ou parcialmente o crescimento de *S. aureus*. Este resultado é superior ao observado por Bachiega e colaboradores (2005) analisou várias espécies fúngicas da região de Araraquara – Brasil, em que 53,1 % apresentaram atividade antimicrobiana, quando cultivados em meio pobre de nutrientes.



Dos extratos obtidos dos demais isolados foi possível destacar alguns extratos que possuíram desempenhos satisfatórios com halos de inibição bacteriana maiores que 10 mm, levando em consideração o halo de inibição do controle positivo (Amoxicilina) que foi de 30 mm, como o CDSA71, que apresentou halo de inibição contra *E. coli* de 15 mm, e os isolados CDSA 04, 08, 15 e 30 que tiveram respectivamente 12 mm, 11 mm, 10 mm e 16 mm. Os dados métricos dos antibiogramas foram convertidos em uma tabela com a ação antibacteriana dos extratos obtidos de todos os fungos da coleção, onde as linhagens fúngicas foram denominadas de CDSA.

TABELA 1: AÇÃO ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS

ESPÉCIME FÚNGICA	LINHAGENS BACTERIANAS	
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
CDSA1	+	+
CDSA2	-	++
CDSA3	++	-
CDSA4	-	+++
CDSA5	+	+
CDSA6	-	-
CDSA7	+	++
CDSA8	-	+++
CDSA9	-	+
CDSA10	+	+
CDSA11	+	-
CDSA12	+	+
CDSA13	++	+
CDSA14	++	-
CDSA15	-	+++
CDSA16	-	++
CDSA17	+	++
CDSA18	+	+
CDSA19	-	-
CDSA20	-	-
CDSA21	+	+
CDSA22	+	+
CDSA23	-	++
CDSA24	-	+
CDSA25	-	-
CDSA26	-	-
CDSA27	+	+
CDSA28	-	-
CDSA29	+	-
CDSA30 (A E B)	+	++(A), +++(B)
CDSA31	-	+
CDSA32	-	+
CDSA33	-	+
CDSA34	-	+
CDSA35	-	+
CDSA36	-	-
CDSA37	+	+
CDSA38	-	+
CDSA39	+	+
CDSA40	-	+
CDSA41	-	+
CDSA42	-	-
CDSA43	+	+
CDSA44	-	-
CDSA45	-	-
CDSA46	-	-
CDSA47	-	-
CDSA48	-	-
CDSA49	-	+
CDSA50	-	+
CDSA51	-	+

CONTINUAÇÃO-TABELA 1: AÇÃO ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS		
CDSA52	+	+
CDSA53	+	+
CDSA54	+	+
CDSA55	-	-
CDSA56	+	+
CDSA57	+	+
CDSA58	-	+
CDSA59	+	+
CDSA60	-	+
CDSA61	+	+
CDSA62	-	-
CDSA63	-	+
CDSA64	-	+
CDSA65	-	++
CDSA66	+	+
CDSA67	+	+
CDSA68	-	++
CDSA69	-	+
CDSA70	+	+
CDSA71	+++	++
CDSA72	+	+

+: Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou alguma atividade antibacteriana, que variou desde a inibição do crescimento bacteriano sobre o disco contendo o extrato do fungo, até a formação de halo antibacteriano cerca de 5 mm de diâmetro*.

++: Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou atividade antibacteriana, formando um halo de atividade médio cerca de 10 mm de diâmetro*.

+++ : Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou atividade antibacteriana, formando um halo de atividade grande, cerca de 15 mm de diâmetro*.

-: Significa que a linhagem fúngica em questão não apresentou nenhuma atividade antibacteriana.

A e B: O extrato obtido formou duas fases, denominadas A e B.

* Considerando o halo de atividade formado pelo controle usado, Amoxicilina 250mg/2,5ml, halo de atividade cerca de 30 mm de diâmetro.

Hoje a coleção de Fungos conta com 117 isolados, graças aos esforços do grupo da bioprospecção, há também pelo menos três linhas distintas de pesquisa todas utilizando os fungos da coleção. É importante destacar que esta é a primeira Coleção de Fungos do Semiárido da UFCG, formando assim a primeira CCM da Instituição apenas com microorganismos do Bioma Caatinga.

5.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS MELHORES PRODUTORES DE ANTIBIÓTICOS

Diante dos resultados obtidos na bioprospecção foi realizada uma triagem dos melhores resultados com inibição para ambas as cepas bacterianas utilizadas, para dar início à purificação dos compostos mais promissores capazes de gerar um novo antibiótico. Logo com base na tabela de Ação Antibacteriana dos extratos fúngicos foram selecionados 6 isolados o

CDSA 01, 07, 30, 59, 70 e 71, por apresentarem os melhores resultados de inibição do crescimento bacteriano contra as duas cepas utilizadas.

Estes isolados foram submetidos à fermentação líquida e após a etapa fermentativa realizou-se a extração triplo líquido com clorofórmio e éter de petróleo, porém não houve nenhum resultado positivo para os testes de antibiograma, logo foi realizada a extração apenas com clorofórmio, por já ter resultado comprovado. O isolado CDSA30 no cultivo em meio líquido não formou duas fases como aconteceu no cultivo em meio semissólido. Os resultados métricos dos testes antibiograma foram convertidos na Tabela 2.

TABELA 2: AÇÃO ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS APÓS CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

ESPÉCIME FÚNGICA	CDSA01			CDSA07			CDSA30			CDSA59			CDSA70			CDSA71		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
FASE																		
<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-

+: Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou alguma atividade antibacteriana, que variou desde a inibição do crescimento bacteriano sobre o disco contendo o extrato do fungo, até a formação de halo antibacteriano cerca de 5 mm de diâmetro.

-: Significa que a linhagem fúngica em questão não apresentou nenhuma atividade antibacteriana.

Como observado os resultados foram insatisfatórios uma vez que na fermentação em meio de Aveia, os extratos obtidos apresentaram halos maiores que 10 mm para os isolados selecionados para esta etapa, como mostra a tabela abaixo. Por esse motivo, decidiu-se conduzir os experimentos realizando a fermentação em meio de aveia apenas.

TABELA 3: AÇÃO ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS ANTES DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

ESPÉCIME FÚNGICA	LINHAGENS BACTERIANAS	
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)
CDSA1	+	+
CDSA7	+	++
CDSA30	+	+++
CDSA59	+	+
CDSA70	+	+
CDSA71	+++	++

+: Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou alguma atividade antibacteriana, que variou desde a inibição do crescimento bacteriano sobre o disco contendo o extrato do fungo, até a formação de halo com cerca de 5 mm de diâmetro.

++: Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou atividade antibacteriana, formando um halo medindo cerca de 10 mm de diâmetro.

+++ : Significa que a linhagem fúngica em questão apresentou atividade antibacteriana, formando um halo medindo cerca de 15 mm de diâmetro.

5.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

Para estes ensaios, foram cultivados apenas dois dos seis isolados utilizados inicialmente em meio de Aveia, foi realizado um estudo da influência da temperatura na produção dos antibióticos, em que o experimento foi conduzido em quintuplicata para uma maior precisão nos resultados, e posterior purificação dos extratos. Os resultados mostraram que a temperatura em que há uma melhor produção de metabólitos secundários para o espécime CDSA71 e CDSA30, contra as duas linhagens bacterianas, em relação ao tamanho do halo em mm foi a de 45°C, embora a temperatura de 37°C foi à temperatura utilizada durante todo o estudo, a temperatura de 28°C também gerou extratos com bons halos de inibição, conforme demonstram os gráficos abaixo, (Gráficos 3 e 4).

Gráfico 3 - Gráfico da Média (\pm Erro) dos halos em antibiograma, a partir do extrato de clorofórmio do cultivo (n=5) do espécime CDSA71, contra *E. coli*. *Resultados significativos, considerando $p < 0,05$.

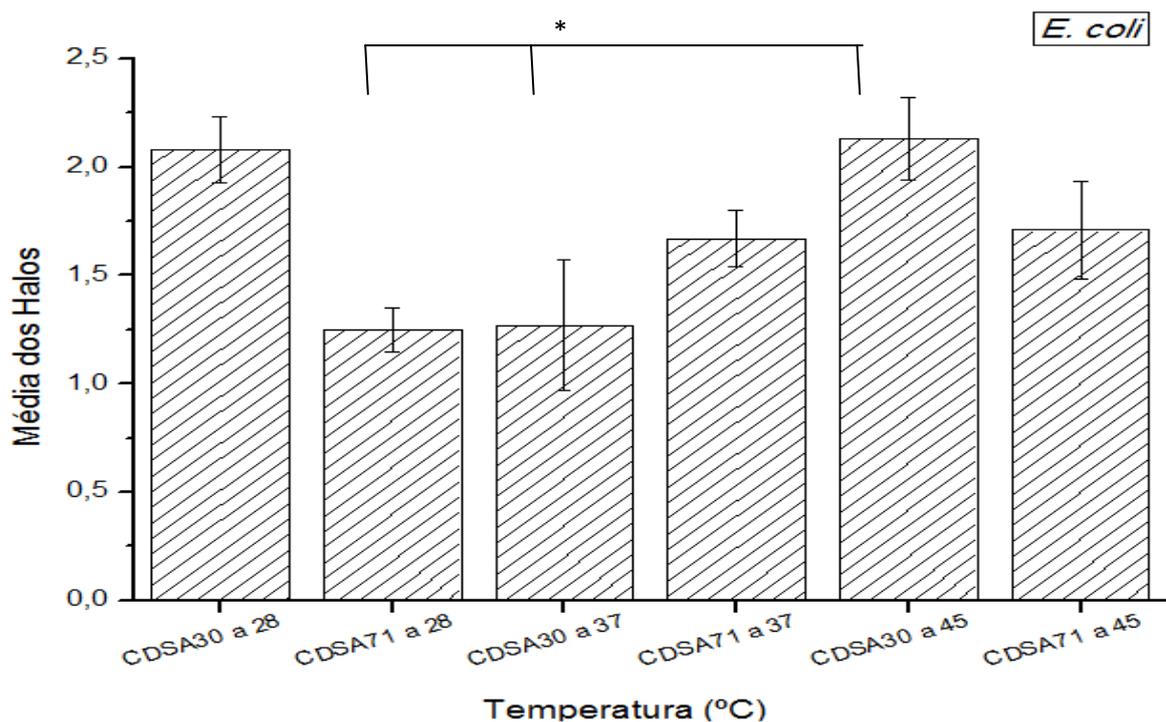
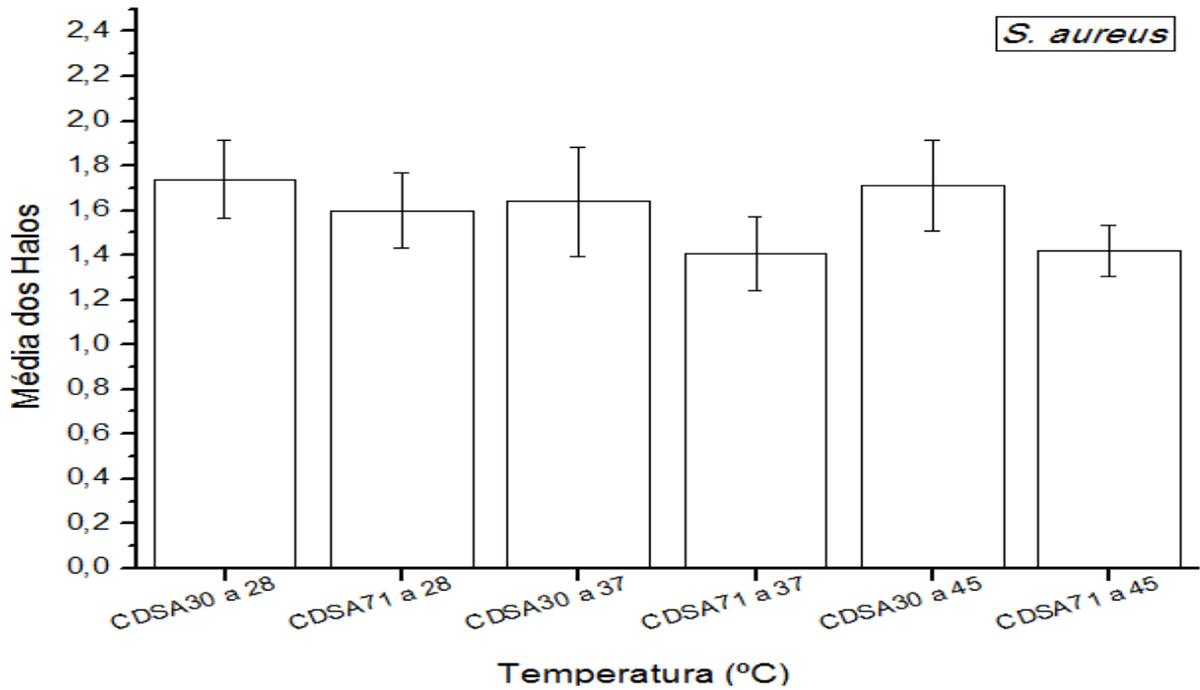


Gráfico 4 - Gráfico da Média (\pm Erro) dos halos em antibiograma, a partir do extrato de clorofórmio do cultivo (n=5) do espécime CDSA30, contra *S. aureus*.



5.4 PURIFICAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS CONTIDOS NOS EXTRATOS CLOROFÓRMICOS APÓS FERMENTAÇÃO

O resultado da CLAE-FR na forma de operação analítica mostrou que o composto obtido dos espécimes CDSA71 e CDSA30 mostrou 5 picos, ou seja, cinco possíveis compostos diferentes responsáveis por sua atividade antimicrobiana, como mostra os cromatogramas abaixo.

Gráfico 5 – Cromatograma em coluna analítica do extrato obtido do espécime CDSA71. Análise realizada em coluna ShimPak – Shimadzu, a um fluxo de 1mL/min, com gradiente crescente de metanol em 30min, de 5 a 35 min, indo de 5 a 95% de metanol, respectivamente.

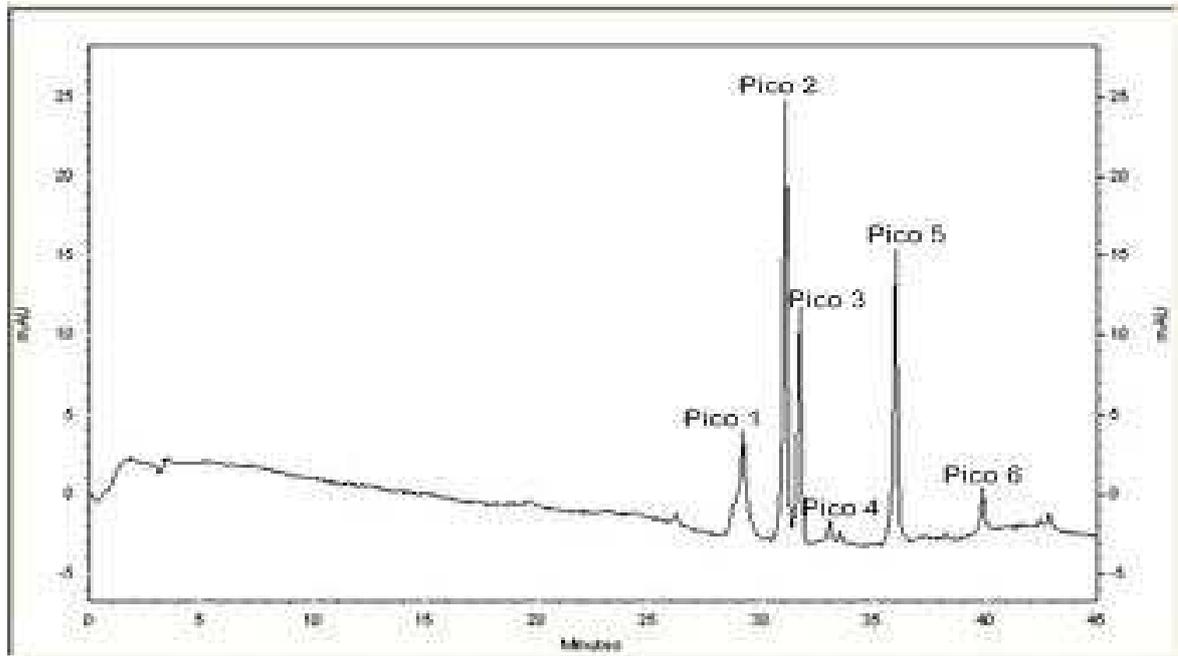
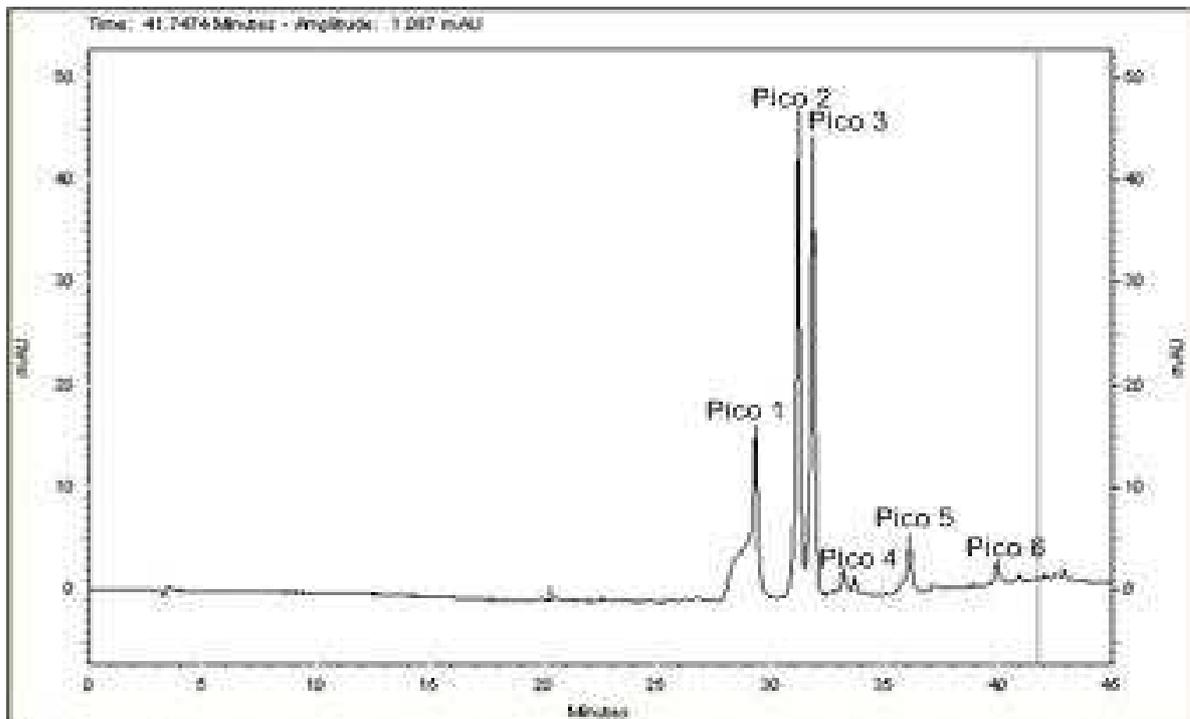


Gráfico 6 – Cromatograma em coluna analítica do extrato obtido do espécime CDSA30. Análise realizada em coluna ShimPak – Shimadzu, a um fluxo de 1mL/min, com gradiente crescente de metanol em 30min, de 5 a 35 min, indo de 5 a 95% de metanol, respectivamente.



Os cromatogramas dos dois espécimes possuem alta similaridade, o que confirma os testes prévios realizados, em que ambos apresentam grande atividade contra as duas cepas bacterianas testadas neste trabalho, onde os dois extratos possuem compostos antibacterianos semelhantes que conferem a ambos as mesmas atividades de inibição contra bactérias Gram positiva e Gram negativa. Após a purificação conseguiu-se testar apenas o material obtido do CDSA71 em que os picos 5 e 6 foram favoráveis a inibição parcial do crescimento bacteriano contra ambas linhagens, conforme mostra a Tabela 4 gerando halos de inibição de aproximadamente 2 mm. Entretanto, o Pico 1 foi favorável a inibição apenas da cepa bacteriana *E. coli* com halo de inibição de aproximadamente 2 mm também, os demais não apresentaram atividade contra as duas ou contra nenhuma cepa bacteriana. Isso implica dizer que ou o efeito sinérgico do extrato pode apresentar um maior efeito antibacteriano, ou a quantidade de composto isolado não é a suficiente para causar um efeito maior.

Tabela 4 – Resultado do teste antibiograma para compostos purificados do espécime CDSA 71

CDSA 71	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
Pico 1	-	-
Pico 2	-	-
Pico 3	-	-
Pico 4	-	-
Pico 5	+	+
Pico 6	+	+

+ Significa que a substância isolada apresentou atividade antibiótica, formando halo de inibição do crescimento bacteriano de até 2mm.

- Significa que a substância isolada não apresentou atividade antibiótica.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os fungos foram identificados segundo a comparação das imagens obtidas por microscópio óptico e as imagens encontradas na literatura especializada. Os resultados mostraram que tanto o isolado CDSA71 quanto o CDSA30 são espécies do gênero *Aspergillus*, comum nesta região com frequência significativa no solo e no ar (PEREIRA, *et*

al. 2010). Foi realizada a observação das lâminas em microscópio óptico com aumento de 40X. As características macro e microscópicas, bem como as estruturas reprodutivas (conidióforos - hifa especializada que origina os conídios) das culturas em meio BDA, foram comparadas com as descritas e ilustradas por Barnett e Hunter (1998), Vidotto (2004) e Quadros (2008).

Figura 9 - CDSA71, fungo do gênero *Aspergillus*. Na imagem A, colônia após 7 dias de crescimento, na imagem B, conídios e conidióforos.

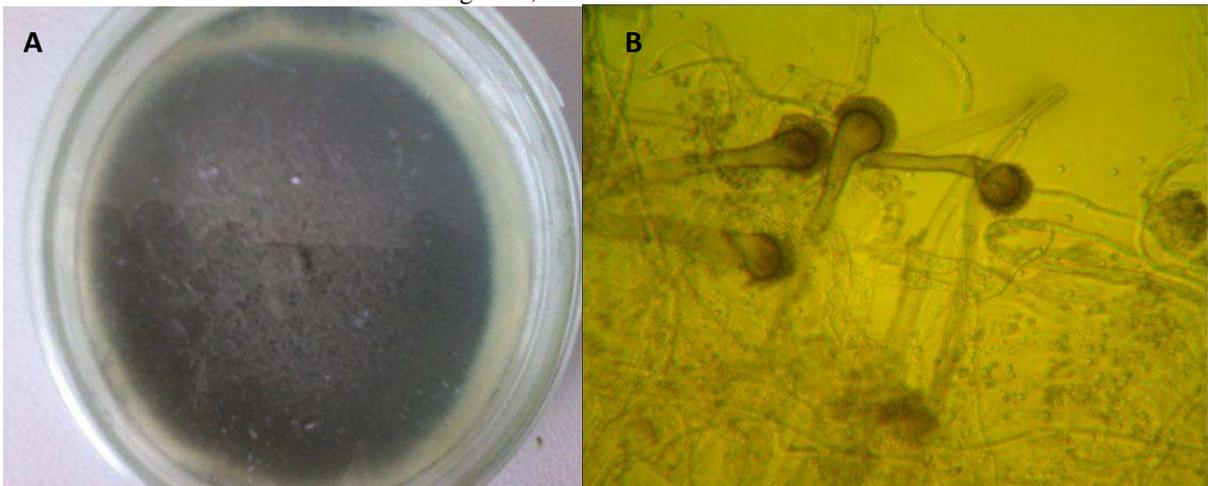
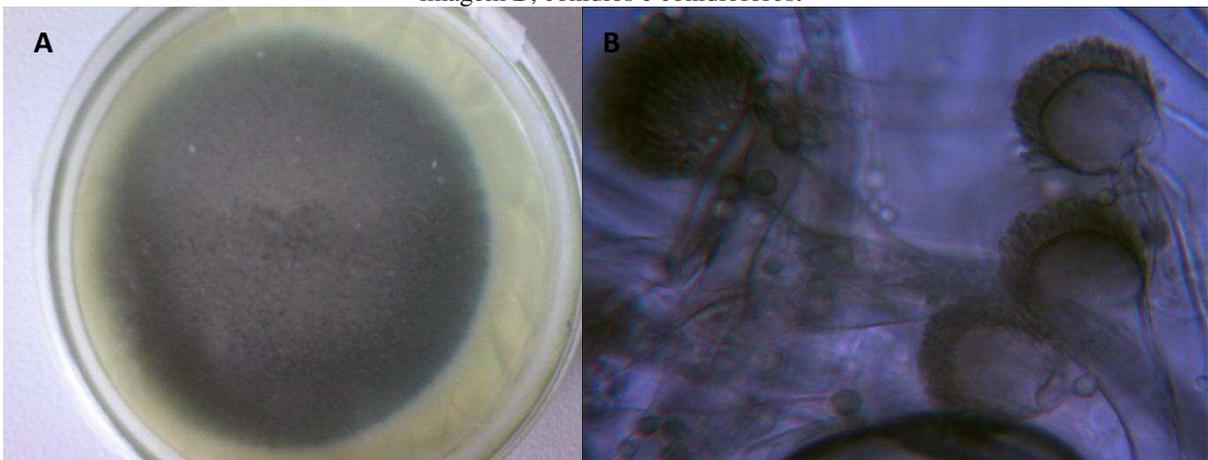


Figura 10 - CDSA30, fungo do gênero *Aspergillus*. Na imagem A, colônia com 7 dias de crescimento, na imagem B, conídios e conidióforos.



Características Macroscópicas – Ambos isolados apresentaram enquanto colônias jovens o micélio branco, com colônias filamentosas e com aspecto aveludado. Durante seu crescimento foram assumindo a cor verde, com bordas brancas e verso amarelado.

Características Microscópicas – Os dois isolados apresentam características semelhantes, possuem hifas septadas e hialinas. Apresentam conidióforos que se desenvolvem rapidamente.

Os microconídeos (blastoconídeos) são produzidos em série pelas fiálides (BISOGNIN, 2012), esta produção de blastoconídeos por um único conidióforo formam extremidades conídias volumosas, apresentando-se na forma de franja ou achatada.

Com esta informação sobre a identificação dos fungos pode-se afirmar que apesar dos isolados serem do mesmo gênero, foi possível observar que estes produziram metabólitos secundários em quantidades diferenciadas quando cultivados em meio de aveia, o que induz ao raciocínio de que apesar de serem do mesmo gênero e com características morfológicas bastante semelhantes podemos ter duas espécies diferentes do gênero *Aspergillus*, fato comum observado por Pereira *et al* (2010), que ao isolar fungos da região da Borborema e do Cariri paraibano para identificá-los e quantificá-los, catalogaram quatro espécies deste gênero, o *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. ochraceos*.

Esta pesquisa apesar de preliminar mostra o potencial que a microbiota fúngica da Caatinga na região do Cariri paraibano, Semiárido brasileiro, possui em gerar novos antibióticos para a indústria farmacêutica, explorando fontes naturais renováveis, de simples manuseio e com grande potencial não só para a produção de antibióticos, como também para a produção de enzimas de interesse industrial como celulasas e proteases, ou até mesmo biossurfactantes, que são outras linhas de pesquisa que estão em desenvolvimento utilizando os fungos da coleção formada.

As perspectivas futuras são de continuar a purificação dos extratos obtidos dos espécimes que apresentaram atividade antibiótica, buscar novas formas de obtenção dos extratos de forma que facilite a etapa de purificação. Posteriormente realizar os testes para descobrir que substâncias estão sendo responsáveis pelo efeito antibiótico, e como elas se comportam em relação ao efeito apresentado nos testes antibiograma, conseguinte pretende-se também verificar a dose-dependência destas substâncias.

6 CONCLUSÕES

- Fungos da Caatinga sob condições favoráveis de cultivo produzem antibióticos contra bactérias Gram positiva e /ou Gram negativa;
- O cultivo em meio de aveia favoreceu a produção de antibióticos;
- A temperatura de cultivo que proporcionou um maior rendimento na produção de extratos com atividade antibiótica foi a temperatura de 45°C;
- A purificação dos metabólitos secundários via CLAE-FR, resultou em compostos com atividade antibacteriana;
- A identificação por microcultivo mostrou-se favorável na caracterização dos dois isolados estudados na purificação, em que ficou nítido que ambos são fungos do gênero *Aspergillus*.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ARCHER, D. B.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 111 p. 99-147, 2008.
- AZEVEDO, C. M. A. **Bioprospecção – Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, Caderno nº 17, São Paulo, 2003.
- BACHIEGA, G. L.; VILEGAS, W.; UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 1, p. 29-37, 2005. ISSN 1808-4532.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. p. 218., 1998.
- BERDY, J. The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification. **Bioactive metabolites from microorganisms**, 27. ed., Elsevier: Londres, 1989.
- BISOGNIN, R. P. **Análise do Potencial Microbiano de uma Biopilha na Biorremediação de solos contaminados por Hidrocarbonetos**. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental), Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. **Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters**. Fungal Genetics and Biology, DOI: 10.1016/j.fgb.2010.04.004,2010.
- CALVO, A. M., WILSON, R. A., BOK, J. W., KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.
- CARDOSO, A. L. **Prospecção de fungos filamentosos produtores de xilanases e/ou celulases para realização de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Engenharia Ambiental. Faculdades COC de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2011.
- DEGANI, A. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.
- Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Brasília. p. 27, 2004.
- DIX, N.I.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology**. Chapman & Hall, London, 1995.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. São Paulo: Ind. Gráfica Siqueira, p.1-17, 1988.

FORZZA, R. C., org., *et al.* Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 871 p. v. 1. ISBN 978-85-8874-242-0.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPOA, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPOA, V.; DUARTEB, M. C. T.; BASTOS, J. K.; J. **Braz. Chem. Soc.**, p.1448, v. 16, 2005.

GOMES, S. M. C. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Eletroquímica.** Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade e Ambiente) - Universidade de Coimbra, Portugal, 2010.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação.** 2004. Acesso em 09 Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>.

JANG, K. H; NAM, S.; LOCKE, J. B.; KAUFFMAN, C. A.; BEATTY, D. S.; PAUL, L. A.; FENICAL, W. Anthracimycin, a Potent Anthrax Antibiotic from a Marine-Derived Actinomycete. **Natural Products**, Angewandte communications. DOI: 10.1002/anie.201302749. 2013.

JIANG, Z.D; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p. 245-272, 2000.

KALDHI, N.; SEIFUDDIN, F.T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W.C.; WOLFE, K.H.; FEDOROVA, N.D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 736-741, 2010.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TABARELLI, M; SILVA, J.M.C.(orgs.). **Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco.**v.1. Recife: Editora Massangana. p. 15-50.

MELO, F. M. P. **Bioprospecção de Actinobactérias rizosféricas de Milho (*Zea mays L.*) com atividade antifúngica.** Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. Instituto Butantan. São Paulo, 2009.

MOMESSO, L. S. **Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* e *Chaetomium globosum*.** Tese (Doutorado). 126 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi.** Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey,1996.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; J. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Natural Products**. p.461-477, v. 70, 2007.

OKAFOR, N. Modern industrial microbiology and biotechnology. **Science Publishers**, Enfield, NH, USA. cap. 5 e 9, 2007.

OVERY, D. P.; PHIPPIS, R. K.; FRYDENVANG, K.; LARSEM, T. O.; **Biochem. Syst. Ecol.** 345.p, v. 34, 2006.

PEREIRA, E. G., SIQUEIRA, J. O., CURI, N., MOREIRA, F. M. S., PURCINO, A. A. C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** p. 59-65, v. 8, n. 1, 1996.

PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O.; FIGUEIREDO, K. R. L.; BRITO, L. L.; MEIRA, A. S Microbiota fúngica do solo e ar atmosférico na região da Borborema, estado da Paraíba, Brasil*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** v, 42, n. 2, p. 123-126, 2010.

PPB – **Programa de Pesquisa em Biodiversidade do Semiárido.** Relatório Técnico. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2006.

PRADO, D. **As caatingas da América do Sul.** In: I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga.* Recife, Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, p. 3-73. 2003.

PRICHARD E.; MACKAY G. M.; POINTS J. **Trace analysis: a structured approach to obtaining reliable results.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1996.

QUADROS, Marina. **Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos.** 2008. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SANTOS, S. N. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* do bioma Caatinga.** Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2012.

SCHUBER, L. C. P. Isolamento e Seleção de Fungos produtores de β -Galactosidase. **Evidência.** Joaçaba, v. 12, n. 1, p. 19-40, janeiro/junho 2012.

SCHWEDT G. **The Essential Guide to Analytical Chemistry.** 2. ed. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.; 1997.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

SILVA, F. D.; QUEIROZ, J. C. **Bioprospecção de Antibióticos produzidos por fungos da Caatinga.** In: IX Congresso de Iniciação Científica da UFCG. Campina Grande 2012.

SILVA, M. S.. **Fungos Endofíticos: Fontes promissoras de novas substâncias com atividades Antioxidante e Antiviral.** Monografia de Especialização, Curso de Especialização em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D.; **Fungos Principais grupos e Aplicações Biotecnológicas.** Instituto de Botânica. São Paulo, 2006.

STROBEL G, DAISY B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their natural productis. **Microbiology and Molecular Biology Review.** v. 67, p. 491-502. 2003.

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

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. Ocorrência e Diversidade Estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

VIALI – Professor Dr. Lori Viali. Testes Não Paramétricos – Departamento de Matemática UFRGS. Disponível em: <http://www.mat.ufrgs.br/~viali/estatistica/mat2282/material/laminaspi/Mat2282_2_Ind.pdf>. Acesso em: Junho 2014.

VIDOTTO, Valerio. **Manual de micologia médica**. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd, 1. ed., 204

VINOKUROVA, N. G.; IVANUSHKINA, N. E.; KOCHIKINA, G. A.; ARIBASAROV, M. U.; OZERSKAYA, S. M.; **Appl. Biochem. Microbiol.** v. 41, p.83, 2005.