



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

ANTONIA ISADORA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Anadenanthera*
macrocarpa (BENTH) BRENAN**

**SUMÉ – PB
2019**

ANTONIA ISADORA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Anadenanthera
macrocarpa* (BENTH) BRENAN**

**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 Bacharela
em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos.**

Orientador: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz

**SUMÉ – PB
2019**

F363a Fernandes, Antonia Isadora.
Avaliação da atividade antifúngica dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa* (Bnth) Brenan. / Antonia Isadora Fernandes. - Sumé - PB: [s.n], 2019.

56 f.

Orientador: Prof. 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. *Anadenanthera macrocarpa*. 2. Micologia. 3. Atividade antifúngica. 4. Fungos endofíticos I. Queiroz, Jean César Farias de. II. Título.

CDU: 632.4 (043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

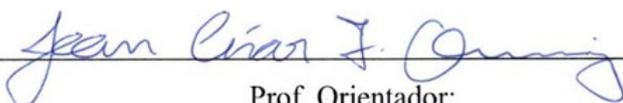
Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

ANTONIA ISADORA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Anadenanthera
macrocarpa* (BENTH) BRENAN**

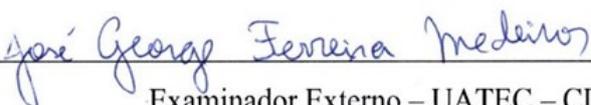
**Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento
Sustentável do Semiárido, da Universidade
Federal de Campina Grande, como requisito
parcial para a obtenção do título de
Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos.**

BANCA EXAMINADORA:



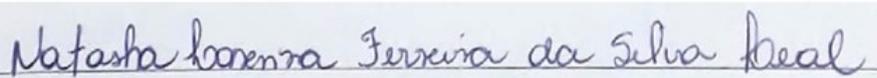
Prof. Orientador:

Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz



Examinador Externo – UATEC – CDSA:

Prof. Dr. José George Ferreira Medeiros



Examinador Externo:

Msc. Natasha Lorenna Ferreira da Silva Leal

Trabalho aprovado em: 28 de Junho de 2019.

**SUMÉ – PB
2019**

Ao meu pai, Antonio Fernandes (*in memoriam*) e
a minha avó, Antonia Fernandes (*in memoriam*),
anjos que me regem e guiam ao lado de Deus;

Aos meus sobrinhos, Karen e Arthur Fernandes,
por serem luz e direção na minha vida,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por infinitas razões que a razão não explica. Sua graça e misericórdia me fortaleceram e me fizeram sempre ir além.

Aos meus pais, Selma e Antonio Fernandes (*in memoriam*), pelo apoio, amor, paciência e ensinamentos de vida. Por ensinar a ser forte e serena em meio às adversidades e serem os melhores companheiros de vida. Devo tudo a vocês.

À minha irmã, Isabel Fernandes, pelo amor, conselhos e cuidados de toda uma vida. Por acreditar em mim e sempre sonhar comigo.

Aos meus sobrinhos, Karen e Arthur Fernandes, razões da minha vida e donos da minha saudade, por serem meu porto seguro e pelo amor ofertado a cada ligação diária. Meu mundo ficou melhor com vocês!

À Genildo Matias, pelo carinho e cuidado de toda a vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Queiroz, pelos ensinamentos, amizade, paciência, confiança e por sempre ser tão solícito durante toda a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. George Medeiros, pelo auxílio na identificação dos fungos.

Aos técnicos Adriano Marques, Paloma Tavares e Norma Lima, por todo o auxílio que precisei durante todo esse trabalho.

Aos meus melhores amigos e irmãos de vida, Bruno Moura, Carlos Magno e Danielle Marques que, mesmo com caminhos diferentes, se fazem presentes através do imenso apoio e de palavras de afeto e fortaleza sempre que preciso.

À Priscilla Kelly e Laís Vaz, irmãs de coração, por tanta lealdade, momentos compartilhados e por serem meu lar em Sumé.

À minha parceira de laboratório e grande amiga, Magna Lima, pelos momentos de descontração e pela alegria contagiante, mesmo com horas incessantes de experimentos.

À Dani Silva, Suelen Lins, Maxsuel Leal, Bárbara Lins e Mailson Filho, por tudo o que fizeram por mim. A vida pessoal e acadêmica tornou-se bem melhor graças a vocês!

Aos meus grandes amigos, “meus chegados” e presentes de Deus, Emanuel Rocha, Dany Silva, Humberto Carneiro, Luana Queiroz, Rita Angélica, Hugo Ézio, Rayane Farias, Amilton Souza, Carol Evangelista, Carol Sousa e Camila Joyce, pelo amor fraterno, pelos momentos felizes e por tornarem a vida longe de casa sempre mais leve.

Aos velhos amigos de longe, Yslane Liberalino, Alisson Luan, Iana Dara, Aline Barbosa e Ithiara Correia, pela torcida e amor, por se fazerem presentes diariamente e por não deixarem que o tempo ou a distância nos afaste.

Aos amigos do SintMed, Prof. Mauricio Santos, Bruna Valesca e Bruno Henrique, pelo convívio agradável, imensa paciência e momentos descontraídos durante o meu período como estagiária.

Ao meu grande amigo de Recife, Raphael Calábria, pelas orações, cuidado e receptividade nos últimos meses.

Aos amigos de Sumé, Pe. Claudeci Soares, Graça Gomes, Cleide Farias e da família Carneiro Monte, por me acolherem tão bem e serem minha família durante todos esses anos.

Aos colegas de curso, Suenia Nunes, Kátia Cristina, Elielson Rafael, Andreza Larissa e Sabrina Lima, por tornar os estresses de fim de período sempre mais leves.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse sonho.

RESUMO

Fungos endofíticos constituem uma vasta, promissora e inexplorada fonte de substâncias potencialmente bioativas. Diante a problemática de resistência dos patógenos aos antifúngicos já existentes no mercado, o presente trabalho consiste na avaliação antifúngica dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa* (Angico-Vermelho), árvore endêmica da Caatinga frequentemente utilizada na medicina popular. O trabalho foi desenvolvido nas estruturas laboratoriais do CDSA-UFCG, onde foram feitas coletas vegetais de partes aéreas, inóculos e isolamento de fungos endofíticos, além da indução de produção de metabólitos secundários por cultivo em meio de aveia, testes antibiogramas e purificação de extratos com maior atividade de inibição frente a cepas de *Candida* sp. e *Geotrichum* sp. Dentre os quarenta e um isolados obtidos, 90,24% apresentaram atividade de inibição para pelo menos uma das quatro leveduras testadas, com destaque para os isolados Fungo nº9 e Fungo nº12. Os isolados, ao terem seus metabólitos purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), apresentaram resultados de inibição com halos variáveis entre 8mm e 13mm para os tipos de *Candida* sp. e *Geotrichum* sp. No estudo de identificação, ambos fungos filamentosos foram caracterizados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Portanto, o presente estudo caracteriza os fungos endofíticos do angico como produtores de substâncias antifúngicas.

Palavras-chave: *Anadenanthera macrocarpa*. Caatinga. Metabólitos Secundários. *Aspergillus*. CLAE-FR.

ABSTRACT

Endophytic fungi constitute a vast, promising and unexplored source of potentially bioactive substances. In view of the problem of resistance of pathogens to antifungal agents already in the market, the present work consists in the antifungal evaluation of secondary metabolites produced by endophytic fungi of *Anadenanthera macrocarpa* (Angico-Vermelho), Endemic tree of the Caatinga often used in folk medicine. The work was developed in the laboratory structures of CDSA-UFCG, where plant collections of aerial parts, glasses and isolation of endophytic colonies were made, in addition to the induction of production of secondary metabolites by cultivation in oat medium, tests antibiograms and purification of extracts with higher inhibition activity against strains of *Candida* ssp. and *Geotrichum* sp. Among the 41 isolates obtained, 90.24% had inhibition activity for at least one of the four tested yeasts, with emphasis on the isolates Fungus N° 9 and Fungus N° 12. The isolates, when purified by high efficiency liquid chromatography in reverse phase (RP-HPLC), presented inhibition results with variable halos between 8mm and 13mm for the types of *Candida* ssp. and *Geotrichum* sp. In the identification study, both filamentous fungi were characterized as belonging to the genus *Aspergillus*. Therefore, the present study characterizes the endophytic fungi from Angico as producers of antifungal substances.

Keywords: *Anadenanthera macrocarpa*. Caatinga. Secondary Metabolites. *Aspergillus*. FR-HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química dos metabólitos (a) podofilotoxina; (b) azadiractina; (c) hiperina; (d) emodina e (e) taxol.....	20
Figura 2	Representação esquemática de diversos métodos cromatográficos utilizados. 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.....	23
Figura 3	<i>Anadenanthera macrocarpa</i> – Angico-Vermelho.....	25
Figura 4	Disposição dos discos antibiogramas contendo extratos fúngicos para testes em <i>Candidasp.</i>	33
Figura 5	Inóculo das partes vegetais em meio BSA após dois dias de incubação a 24°C.....	35
Figura 6	Fungos isolados em meio BSA após quatro dias de inóculo.....	36
Figura 7	Crescimento de um dos isolados após intervalo de sete dias.....	36
Figura 8	Halos inibitórios obtidos para as leveduras (A) <i>Geotricumsp.</i> e (B) <i>C. Albicans</i>	40
Figura 9	Cultivo dos Fungos (A) N°9 e (B)N°12, considerado melhores inibidores, respectivamente.....	43
Figura 10	Conidióforos do Fungo N°9.....	47
Figura 11	Conidióforos do Fungo N°12.....	47
Figura 12	Esporos de <i>Aspergillus sp.</i> – Fungo N° 9.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fungos identificados a partir da sua coloração e produção de conídios, em meio BSA.....	38
Tabela 2	Número de unidades formadoras de colônia, obtida por meio de cultivo em meio BSA, e volume equivalente a 1×10^7 da Solução Inicial utilizado para testes com extratos fúngicos brutos.....	39
Tabela 3	Diâmetro médio dos halos inibitórios obtidos pelos discos contendo extratos fúngicos para cada cepa utilizada.....	41
Tabela 4	Número de unidades formadoras de colônia obtida por meio de cultivo em meio BSA e volume utilizado correspondente a 1×10^7	43
Tabela 5	- Halos obtidos a partir das frações purificadas do Fungo N°9 para cepas de <i>Candidasp.</i> e <i>Geotrichumsp.</i>	45
Tabela 6	Halos obtidos a partir das frações purificadas do Fungo N°12 para cepas de <i>Candidasp.</i> e <i>Geotrichumsp.</i>	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS – AcquiredImmundeficiencySyndrome - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BSA – Batata Sacarose Ágar

BHIA – Brain Heart Infusion Agar

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia líquida de Alta Eficiência

CDSA – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE-FR – Cromatografia líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

DSTs – Doenças Sexualmente Transmissíveis

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

HIV – HumanImmundeficiencyVirus - Vírus da Imunodeficiência Humana

OMS – Organização Mundial da Saúde

Q.S.P. – Quantidade Suficiente Para

UBS – Unidade Básica de Saúde

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUS – Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	PLANTAS E PRODUTOS NATURAIS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS.....	15
2.2	FUNGOS.....	16
2.1.1	Fungos Endofíticos.....	17
2.3	METABÓLITOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS.....	21
2.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE.....	22
2.5	ANADENANTHERA MACROCARPA.....	24
2.6	LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO <i>Candidasp.</i>	26
2.7	LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO <i>Geotrichumsp.</i>	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	MEIO DE CULTURA.....	30
4.2	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	30
4.2.1	Coleta e esterilização das partes vegetais.....	30
4.2.2	Produção de conídios.....	31
4.3	PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	31
4.4	CULTIVO DOS FUNGOS PATOGÊNICOS.....	31
4.5	OBTENÇÃO DOS DISCOS ANTIBIOGRAMAS.....	32
4.6	PURIFICAÇÃO DOS MELHORES INIBIDORES.....	33
4.7	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1	ISOLAMENTO DAS PARTES VEGETAIS E FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	35
5.2	OBTENÇÃO DE HALOS INIBITÓRIOS.....	39
5.3	DEFINIÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS MELHORES INIBIDORES.....	42
5.4	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	46
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, utilizados desde tempos imemoráveis, constituem uma classe de pesquisa que requer processo de otimização contínua, em todas as etapas. Os primeiros registros da utilização de plantas para fins farmacêuticos foram relatados, pela primeira vez, por volta de 2600 a.C., em escrita Mesopotâmica. O uso de óleos oriundos de plantas como *Cedrus* (cedro), *Cupressus sempervirens* (cipreste) e *Commiphora* sp. (mirra), por exemplo, foram relatadas em placas de argila para a terapia de indisposição, mal-estar, doenças parasitológicas e infecções (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012; RODRIGUES, 2018). A partir da utilização empírica de plantas para fins terapêuticos, foram ocorrendo descobertas das propriedades medicinais e, conseqüentemente, a propagação do conhecimento popular entre gerações.

A pesquisa de novos agentes farmacologicamente ativos tem propiciado o desenvolvimento de fármacos potentes para o tratamento de doenças humanas (SHU, 1998). Newman e Cragg (2007), quando citados por Corrêa e colaboradores (2008), explica que, nos últimos 25 anos, cerca de 30% dos fármacos aprovados por órgãos fiscalizadores são de origem vegetal. Kinghorn et al. (2016), no trabalho de Rodrigues (2018) diz que, num total de 175 fármacos utilizados no tratamento de doenças humanas, como câncer, 49% deles foram obtidos a partir da síntese vegetal. Com a constante necessidade de novos modelos farmacológicos para o uso contra determinados alvos moleculares, a diversidade química dos produtos naturais continuará relevante no futuro da descoberta de novos fármacos (HARVEY, 2000).

Segundo Rodrigues (2018), essa diversidade química estrutural e funcional dos produtos vegetais são provenientes da flexibilidade metabólica necessária para que haja adaptação em diversas situações de estresse ambiental. Ademais, esses produtos ainda podem ser usados como estruturas-base de moléculas farmacologicamente ativas, sendo fundamentais para a síntese completa de novos compostos bioativos ou com objetivo de melhorar propriedades farmacológicas já conhecidas.

Os fungos formam uma fonte notavelmente rica em importantes fármacos, tais como antibacterianos, antibióticos antitumorais, agentes redutores de colesterol e imunossupressores (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003), além de propriedades antifúngicas. Cerca de 25% de produtos naturais são advindos de fungos. Para Pearce (1997), as vantagens de trabalhar com fungos são inúmeras: quando comparados com plantas, o crescimento fúngico demonstra-se mais rápido, em um curto tempo e espaço. Ademais, as condições de cultivo,

como pH, temperatura e meio de cultivo, podem ser modificadas, a fim de aumentar e/ou direcionar a produção de metabólitos de interesse.

Os microrganismos endofíticos podem ser definidos como organismos que vivem no interior de espécies vegetais e vivem em associação simbiótica favorável para ambos: os microrganismos garantem resistência, enquanto a planta hospedeira fornece nutrientes ao endofítico. Para Petrini (1991), os fungos endofíticos são responsáveis por colonizar os tecidos saudáveis de partes aéreas da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem que haja danos aparentes e transmitidos de uma geração para a outra. Carroll (1988), quando citado por Borges (2008), explica que, com exceção das gramíneas, a grande maioria são transmitidas de forma horizontal, por esporos e podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta hospedeira (PETRINI, 1991), habitando as partes superiores de plantas, como folhas, galhos, cascas e estruturas reprodutivas.

A versatilidade bioquímica e grande diversidade de fungos endofíticos proporcionar uma ampla variedade ainda desconhecida. Logo, o estudo e uso de fungos endofíticos garante uma nova exploração biotecnológica e garante o uso para controle biológico agrônomico e produção de agentes farmacológicos, representando uma fonte inexplorada de novos produtos naturais bioativos.

Praticamente todas as espécies vegetais já investigadas apresentaram microrganismos endofíticos, sendo estes fungos e bactérias, que estão presentes nos mais diferentes tecidos e órgãos vegetais (POLI *et al.*, 2012). Acredita-se que muitas das propriedades medicinais de certas plantas podem estar relacionadas com os metabólitos produzidos pelos endofíticos. Logo, surge o questionamento sobre as tais moléculas bioativas encontradas nas plantas, se são produzidas exclusivamente por estas ou como resultado da relação mutualística entre planta e microrganismo. Assim, sugere-se que as propriedades terapêuticas de uma planta medicinal podem estar na interação entre ambos (SPECIAN *et al.*, 2014).

A *Anadenanthera macrocarpa*, popularmente conhecida como angico, é uma planta encontrada com facilidade na Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, e sul do país, além de países como Argentina, Bolívia e Venezuela. Como sinônimas, é também conhecido como angico-branco e angico-preto, por exemplo. Além do seu uso antigo para terapia de doenças e infecções, há registros da utilização do angico como alucinógeno, em rituais religiosos de comunidades nativas da América Latina.

Segundo Agra e colaboradores (2007), o angico é a espécie botânica mais utilizada pela população residente em regiões onde a mesma pode ser encontrada. Seu uso pode ser de forma oral, por decocção, maceração, em “lambedor” e “garrafadas” (bebida preparada a

partir de raízes e caule de diversas plantas). De acordo com Cunha (2014), na medicina popular, o angico é utilizado como matéria-prima para a produção de xaropes para problemas como afecção pulmonar, coqueluche e asma, por exemplo. Sua casca possui propriedades adstringentes e depurativas, além de ser útil no tratamento de enfermidades, como candidíase, leucorreia, gonorreia, infecções nos ovários e candidíase, além de agir como cicatrizante (CUNHA, 2014; ARAÚJO, 2015). Graças a sua complexa composição química possui também potencial para o estudo de agentes antibacterianos, antifúngico e anti-inflamatória.

Nas últimas décadas, é perceptível o aumento gradativo do risco de infecções fúngicas, com destaque para o crescimento de indivíduos imunocomprometidos e imunossuprimidos, como pacientes transplantados e portadores do HIV (LOBO *et al.*, 2013). Cunha (2014) explica que, geralmente, os antifúngicos são considerados altamente tóxicos e de toxicidade não-seletiva, como é o caso de inibidores de ribossomos, que também são danosos aos ribossomos humanos. Para Catão (2007), fatores como estabilidade, solubilidade e absorção baixas, além da alta resistência medicamentosa e limitação no número de agentes terapêuticos para terapia de doenças fúngicas desperta gradualmente o interesse da comunidade científica para a produção de novos biofármacos.

Diante do exposto, o presente trabalho visa estudar a prospecção de um novo biofármaco antifúngico a partir dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS E PRODUTOS NATURAIS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS

O uso de plantas para fins terapêuticos surgiu a partir da percepção do homem sobre a possibilidade da modificação do meio ambiente para benefício próprio. Surgida de forma empírica, o uso medicinal das plantas fomentou para identificação de espécies e partes vegetais adequadas para cada uso. Em tempos passados, muitas pessoas perceberam que a mistura de folhas, raízes e hastes poderiam ser favoráveis a elas, aumentando a qualidade de vida, proporcionando alívios e minimizando dores (STROBEL e DAISY, 2003).

Segundo Strobel e Daisy (2003), em pequenas populações nativas e de lugares remotos, tais como grupos tribais da bacia amazônica e povos da Papua Nova Guiné, o uso de produtos naturais ainda é a única alternativa para o tratamento de patologias. Essa “única via” fomentou a descoberta de plantas medicinais e seus princípios ativos.

O uso de plantas como fonte medicinal, segundo Oliveira (2010), não se restringe a zonas rurais ou escassas de atendimentos médico e farmacêutico, sendo utilizados também como forma complementar aos fármacos industriais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população de alguns países asiáticos e africanos fazem uso de medicamentos oriundos de plantas para tratamento de algum aspecto de atenção primária a saúde.

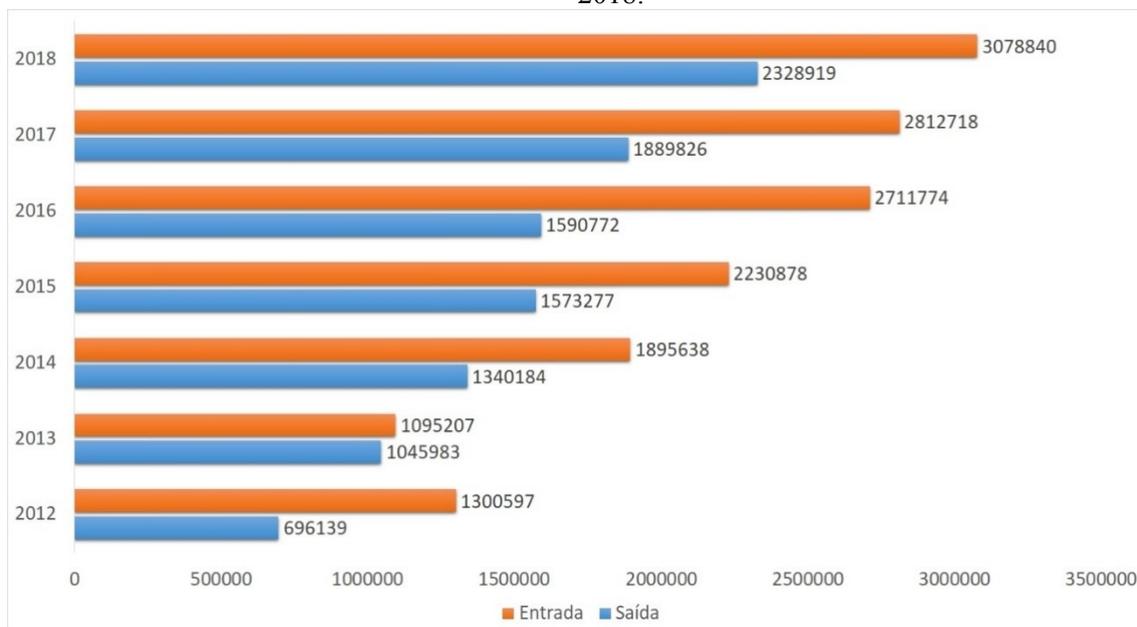
No Brasil, segundo Monteiro e Brandelli (2017), a utilização de plantas para esse fim possui fortes influências de culturas indígena e africana. Os povos indígenas utilizavam as ervas locais disponíveis a partir do conhecimento transmitido a cada geração, e aprimoradas de forma contínua, enquanto a contribuição africana se deu por meio da importação de plantas trazidas consigo, amplamente utilizadas em rituais religiosos e que apresentaram propriedades farmacológicas a partir do uso empírico.

Nas últimas décadas, o Brasil voltou a valorizar sua flora como fonte inestimável de novas moléculas com atividade biológica e medicamentos fitoterápicos. Atualmente, as plantas medicinais e os fitoterápicos não são mais considerados apenas terapia alternativa, mas uma forma sistêmica e racional de compreender e abordar os fenômenos envolvidos nas questões da saúde e da qualidade de vida (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

De acordo com o Ministério da Saúde (2018), atualmente, há registro de 2160 Unidades Básicas de Saúde (UBS) que promovem a utilização de plantas medicinais para terapia de doenças. Essa viabilização divide-se na distribuição de plantas *in natura*,

fitoterápicos manipulados e industrializados. Ademais, ainda há a implantação de Farmácias Vivas, projeto governamental instituído em 2010 que promove desde o cultivo até a distribuição de plantas medicinais. O Gráfico 1 indica as respectivas entradas e saídas de medicamentos de origem natural nas UBS brasileiras entre os anos de 2012 e 2018. Com isso, é possível concluir que a utilização de medicamentos oriundos dessa fonte vem ganhando visibilidade progressiva, graças ao investimento em pesquisa e inovação para esse fim.

Gráfico 1 - Entradas e saídas de medicamentos fitoterápicos em UBS entre os anos de 2012 e 2018.



Fonte: Ministério da Saúde, 2018.

Com recursos financeiros da união, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferta a população, medicamentos fitoterápicos para tratamento de problemas ginecológicos, queimaduras, gastrite, úlcera, artrite e osteoartrite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

2.2 FUNGOS

Segundo Lopes (2011), os fungos constituem o segundo grupo mais numeroso de seres vivos existentes, perdendo apenas para os insetos, com cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas já são conhecidas, mas apenas 74 mil foram descritos, e são reconhecidos em três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos.

A taxonomia clássica dos fungos se baseia na morfologia e método de produção dos esporos. Porém, características estruturais, bioquímicas e características moleculares são

aplicadas de forma crescente para identificação, resultando em modificações taxonômicas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Murray, Rosenthal e Pfäller (2009), explica que, no ponto de vista metabólico, os fungos são heterotróficos e de ampla versatilidade bioquímica, produzindo metabólitos primários e secundários. Seu crescimento, quando comparado a microrganismos bacterianos, é lento, tendo duplicação celular em horas, em vez de minutos.

Muitos dos fungos conhecidos possuem impactos negativos no bem-estar humano, sendo responsáveis por fitopatologias, produção de substâncias tóxicas e biodeterioração, por exemplo. Em contrapartida, fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces* são conhecidos por serem responsáveis pelo processo fermentativo de bebidas, como cerveja e *furu*, bebida asiática obtida a partir da fermentação da soja, desenvolvimento de sabores e aromas característicos de determinados queijos, como o *Camembert* e maturação de carnes (TAKAHASHI, 2017).

Os microrganismos, em especial os fungos, são conhecidos pela capacidade de produzir uma vasta diversidade de moléculas bioativas. Dentre essas substâncias, algumas podem ser altamente tóxicas, como as micotoxinas, ou serem bastante utilizadas para fins farmacêuticos. Essa divergência de funções pode ser explicada devido à grande diversidade de compostos químicos funcionais produzidos pelos mesmos (SANTOS, 2015).

A utilização de fungos como antimicrobianos vem desde 3000 a.C., onde povos chineses faziam uso de sapatos mofados para tratamento de feridas nos pés. No entanto, o primeiro antibiótico cuja eficácia fora comprovada foi a penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium* e descoberta acidentalmente por Fleming, em 1928. A descoberta da penicilina colaborou na cura de feridas de centenas de enfermos oriundos da guerra (MAMEDE, 2012).

2.2.1 Fungos Endofíticos

A busca incessante por drogas antifúngicas mais efetivas fez com que os estudos dos metabólitos oriundos de microrganismo ganhassem maior visibilidade. Segundo Silva e Souza (2016), esses compostos apresentam substâncias com significativa atividade farmacológica, das quais já foram base para a síntese de medicamentos. Para Bastos e colaboradores (2017), os microrganismos endófitos fornecem um reservatório abundante de metabólitos bioativos para a exploração medicinal, e um crescente número de moléculas bioativas com ações antimicrobianas, antioxidantes, anticolinérgicas, antivirais e imunossupressoras, por exemplo.

Os microrganismos endofíticos podem ser definidos como seres microscópicos que colonizam o interior das plantas e vivem em relações mutualística com seu hospedeiro. O termo “endofítico” foi mencionado pela primeira vez por De Barry, em 1866, a fim de distingui-los de microrganismos fitopatógenos (AMARAL, 2009). A definição de que fungos endofíticos eram considerados microrganismos que são isolados de tecidos vegetais desinfectados superficialmente ou do interior destes, e que não causam danos aparentes à planta hospedeira, foi proposta por Hallmann, em 1997 (OLIVEIRA, 2010).

De acordo com Strobel e Daisy (2003), cerca de 300.000 plantas já identificadas na Terra habitam, pelo menos, um tipo de fungo endofítico, o que corrobora a ampla gama de prospecção de novos endofíticos.

Os endófitos fúngicos são principalmente conhecidos por infectar as plantas sem que haja sintomas (MENÉNDEZ *et al.*, 2018), e vêm recebendo considerável atenção por serem fontes de materiais industriais e medicinais para uso humano, como borracha natural, corantes, aromas, suplementos naturais e fármacos (NOMURA; OGITA; KATO, 2018). Para Canuto e colaboradores (2012), explica que os fungos endofíticos apresentam grande importância no que diz respeito à adaptação das plantas em condições extremas, tais como estiagem, frio e fatores de estresse.

Fortkamp (2018) explica que a infecção por microrganismos endófitos podem ocorrer vertical ou horizontalmente. A infecção do tipo vertical ocorre a partir da semente do hospedeiro, mantendo-se por tempo indeterminado e predominando uma relação do tipo mutualística. Já a infecção do tipo horizontal ocorre por lesões naturais ou artificiais, com predominantes relações antagonistas.

Oliveira (2010), em seus estudos, explica que a entrada de microrganismos endofíticos nas plantas pode ocorrer de diversas vias, sendo uma das principais através das raízes, devido a fissuras ocasionadas pelo atrito com o solo durante o processo de crescimento, causadas pelo atrito com o solo durante o crescimento. Outros endófitos iniciam seu ciclo de vida a partir da germinação de esporos, com posterior crescimento da hifa nas folhas ou superfície da raiz, ou através de aberturas naturais, como esporos.

Menéndez (2018) explica que os fungos endofíticos são detentores de uma das fontes mais promissoras de novos biofármacos, porém, fatores como baixos rendimentos de produção, tornam essa via como sendo fator limitante para a ampla exploração do mesmo.

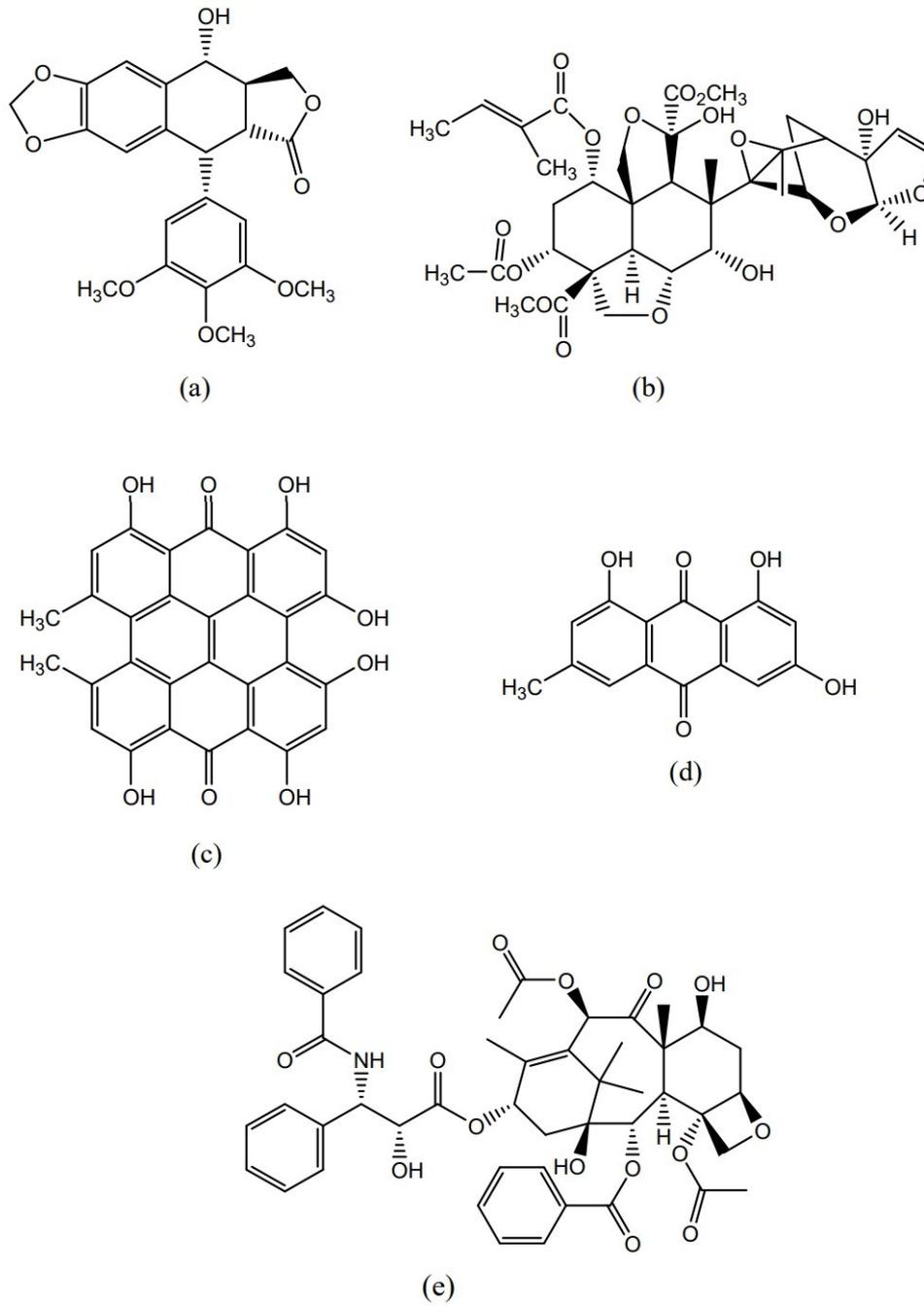
Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos podem ser idênticos ou semelhantes aos produzidos por plantas hospedeiras. Freire, Vasconcellos e Coutinho (2014) explica que esse fenômeno pode estar relacionado a genética recombinante existente entre o

fungo e o hospedeiro, a qual foi obtida ao longo de com evoluções. De acordo com Oliveira (2010), o que ganha maior destaque é o taxol, primeiro metabólito secundário fúngico, sintetizado a partir do endófito *Taxomycesandreaea*, utilizado para a terapia do câncer de mama e uterino, e a vincristina, substância produzida por um conjunto de fungos endofíticos da *Catharantusroseus*, que possui atividade anticancerígena. Em consequente, também foram isolados compostos como o anticancerígeno podofilotoxina, inseticida azadoractina e antidepressivos hiperina e emodina. A Figura 2, obtida nos estudos de Silva (2014), apresenta as estruturas químicas desses últimos cinco compostos citados.

Rodrigues (2010) explica que plantas lenhosas apresentam maior diversidade de fungos endofíticos, com maior produção quantitativo e qualitativo. Strobel (2003), ao ser citado nos estudos de Rodrigues (2010) também afirma que fungos endofíticos obtidos em hospedeiros de regiões tropicais produzem um maior número de metabólitos ativos, e explica esse fato como sendo consequência da exposição do hospedeiro à uma maior biodiversidade.

Dentre a grande variedade de fungos endofíticos já identificado em plantas, pode ser citado os fungos do gênero *Aspergillus*. O gênero *Aspergillus* pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eutrotiales, família Trichocomaceae e são comumente encontrados no ar, água, organismos vegetais, além de estarem ligados a deterioração de materiais vegetais e alimentos, em regiões de clima tropical e sub-tropical (ALVES, 2012). Esses fungos se reproduzem por meio de conídios, com micélios compostos por hifas septadas e ramificadas e podem apresentar conídios com colorações branca, amarela, amarela-esverdeada, amarronzada ou verde (SLIVINSKI, 2007).

Figura 1 - Estrutura química dos metabólitos (a) podofilotoxina; (b) azadiractina; (c) hiperina; (d) emodina e (e) taxol.



Fonte: SILVA (2014).

2.3 METABÓLITOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

Fortkamp (2018), ao citar Williams e colaboradores (1989), apresenta uma série de hipóteses possíveis para explicar as funções dos metabólitos secundários, como mutações neutras ou resíduos ou produtos de detoxificação celular.

De acordo com Amaral (2009), os fungos endófitos possuem fatores de virulência idênticos aos fungos patógenos. Os endófitos produzem exoenzimas capazes de infectar e colonizar o hospedeiro, sendo a maioria com potencial de produção de micotoxinas. Em contrapartida, a planta reage, produzindo metabólitos de defesas lentas e rápidas.

Volcy e Pardo (1994), quando citados por Valência (2011) definem micotoxinas como sendo metabólitos secundários formados por uma série de reações catalisadas por enzimas consecutivas de intermediários do metabolismo primário dos fungos, podendo provocar respostas tóxicas em diferentes organismos.

Os estudos toxicológicos da ação de micotoxinas datam dos anos 60, devido ao surgimento de casos de contaminação e morte de centenas de animais (OLIVEIRA, 2010). Entre as micotoxinas conhecidas, incluem-se as aflatoxinas, produzidos por certas cepas dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*; ocratoxinas compostos derivados da isocumarina com um grupo amida ligado ao grupo amino da fenilalanina, produzidos pelos fungos *Penicillium cyclopium*, *P. viridicatum*, *P. palitans* e algumas cepas de *Aspergillus* spp.; citreoviridinas, tricotecenos e fumonisinas, produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, além de uma variedade de derivados indólicos (OLIVEIRA, 2010).

Metabólitos fúngicos ainda pouco explorados são os produtores de pigmentos. Esses pigmentos são utilizados, frequentemente por povos asiáticos, como corante de alimentos. Entre os microrganismos produtores desses pigmentos, deve-se ressaltar os do gênero *Monascus*, cultivados em arroz e responsáveis pela produção do arroz vermelho ou Angka (LIMA, 2013). Ademais, ainda é encontrado registros da produção de corante azul a partir da bactéria rizosférica *Streptomyces caeruleatus*, encontrada em tomateiro em Guangzhou, China (ZHU et al., 2011), de corante vermelho a partir do fungo *Penicillium oxalicum*, utilizado na indústria alimentícia e cosmética, de corante laranja, obtido a partir de *Monascus* sp. e amarelo-alaranjado, produzido por *Blakesleatrispora*, *Fusarium sporotrichioideae* e *Neurospora crassa* (DUFOSSÉ, 2006), por exemplo.

A produção biotecnológica de corantes a partir de microrganismos apresenta vantagens como aprimoramento de produção, uso de substrato de baixo custo e ilimitações

ambientais, por exemplo. No entanto, a aprovação desses produtos é causadora de preocupações, devido a exigência de testes toxicológicos dos mesmos.

Além de pigmentos alimentícios, os fungos endofíticos também podem apresentar atividade produtiva de enzimas (proteases, lipases, amilases), atividades antimicrobiana, antioxidante, antimicóticas e citotóxicas a células tumorais. Alguns desses metabólitos ainda podem ser utilizados em processos de controles biológicos e biorremediação. (LOPES, 2011; SILVA, 2017).

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

Silva (2012) define a cromatografia como sendo um poderoso método de separação de moléculas desenvolvida e denominada no século XX, pelo botânico russo Mikhail Tswett. Sua primeira aplicação foi na separação de pigmentos vegetais como clorofila e xantofila, onde as soluções desses compostos atravessavam uma coluna de vidro empacotada com carbono e cálcio. Quando separadas, apareciam como bandas coloridas, dando origem, assim, ao nome do método (“*chroma*”: cor; *graphein*”: escrever).

Para Martins (2009), o processo cromatográfico se divide em cinco etapas essenciais: o ajuste das fases móveis e estacionária às condições de ligação, garantindo o equilíbrio necessário; aplicação da amostra; lavagem ou remoção do material não ligado; eluição da biomolécula, por alteração da força e/ou composição da fase móvel e regeneração/limpeza da coluna.

A cromatografia corresponde a um método de separação de componentes muito semelhantes de misturas complexas que, por sua vez, não seria possível por outros métodos. Silva (2012) explica que a amostra em questão é transportada em uma fase móvel gasosa ou líquida (FM) que é forçada através de uma fase estacionária (FE), colocada em uma coluna ou superfície sólida. A escolha das fases é feita de forma a garantir a distribuição entre a FM e a FE de forma isocrática – mesma composição da FM durante o escoamento da amostra na coluna – ou gradativa. Os componentes com maior grau de retenção na FE movem-se lentamente no fluxo da FM, enquanto os componentes que se ligam fracamente à FE movem-se rapidamente. O processo do escoamento na substância pela coluna na FM denomina-se eluição.

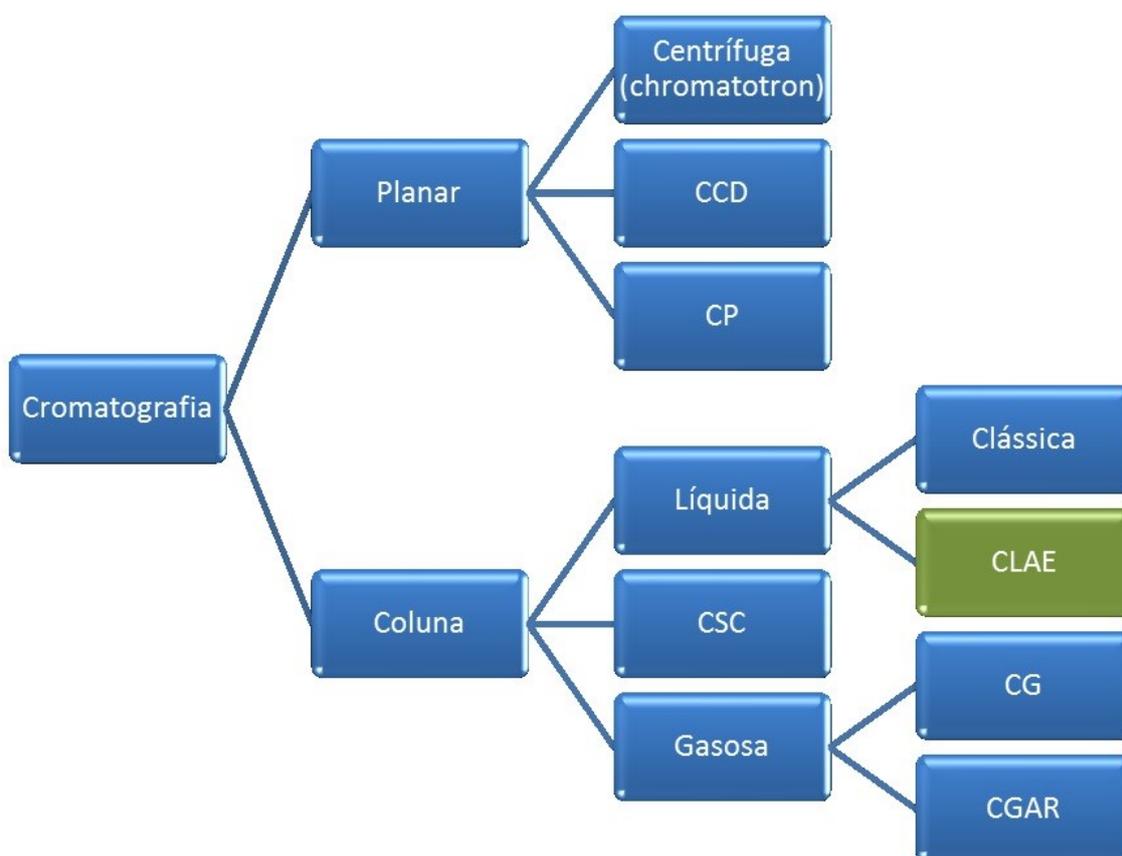
Através da escolha apropriada de uma fase móvel e/ou de uma fase estacionária, é possível obter separações efetivas de moléculas, mesmo que estas apresentem grandes semelhanças (MARTINS, 2009). Para Fonseca (2001), a separação dos componentes

presentes na amostra se dá pela diferença dos coeficientes de distribuição da amostra entre as fases móvel e estacionária.

A Figura 3 apresenta, de forma simplificada, os diversos métodos cromatográficos.

Quando a cromatografia é dita preparativa e aplicada em laboratórios, segundo Pessoa Jr e Kilikian (2005), objetiva a obtenção de frações volumétricas de eluente contendo apenas uma molécula, para posterior caracterização ou submissão a outros testes.

Figura 2 - Representação esquemática de diversos métodos cromatográficos utilizados. 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) por CLEMENTINO (2012).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE – iniciou-se na década de 60 e foi desenvolvida a partir de experiências práticas e teóricas da cromatografia de partição gás-líquido (LOPES, 2004). Sua classificação de maior popularidade refere-se a maneira de interação do analito com a FE e caracteriza-se pelo uso de colunas mais estreitas, com

diâmetro interno variável entre 2 e 5 mm (SANTOS, 2015). Além disso, uma das mais eminentes técnicas de instrumentação analítica na atualidade, graças a fatores como boa capacidade de analisar misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, iônicos e ionizáveis, de baixa ou alta massa molar, com boa detectabilidade e possibilidade de automatização (FONSECA, 2001). O uso de colunas metálicas e pressão de FM elevadas, obtidas por uma bomba de alta pressão, garantem a alta eficiência e fluxo da FM com vazão mais rápida (MORAIS, 2003).

A CLAE em Fase Reversa (CLAE-FR) foi desenvolvida por Kirkland, em 1971, e recebe essa denominação a partir do conceito de que cromatografia líquido-sólido é comum, usando FM não-polar, enquanto o inverso é dito “reversa”. (LOPES, 2004)

O princípio de retenção CLAE-FR é a hidrofobia, e a separação das substâncias nesse método ocorre a partir da interação entre a parte apolar do soluto e a fase estacionária, ou seja, a repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa (ALMEIDA, 2009).

2.5 ANADENANTHERA MACROCARPA

A *Anadenanthera macrocarpa*, popularmente conhecida como angico é uma das espécies que apresentam ampla distribuição no espaço da Caatinga (Figura 4). Pertencente à família *Fabaceae*, subfamília *Mimosoideae*, o angico ocorre, principalmente, em florestas estacionais, distribuídas no Nordeste brasileiro e Sul, em florestas sazonais, localizadas dentro das bacias do Paraná e Paraguai (MEDEIROS, 2016).

Apresenta reprodução vigorosa, rapidez na germinação, ausência de dormência nas sementes, alta germinabilidade em uma ampla faixa de temperatura, resistência das plântulas ao dessecamento por possuir um órgão de reserva de água e amido nas plantas estabelecidas. Segundo Pareyn, Araújo e Drummond (2018), são utilizados como sinônimos para *A. macrocarpa*: *Acaciacebil* Griseb., *Acaciacolumbrina* (Vell.) Mart., *Anadenanthera colubrina*, *Mimosa colubrina* Vell., *Piptadenia colubrina* (Vell.) Benth. e *Piptadenia macrocarpa* Benth.

Segundo Cunha, Medeiros e Santos (2014), o angico é amplamente explorado por causa da presença de taninos em sua casca, variável entre 15 e 32%, muito utilizado no processo de curtimento de couro. Para Pareyn, Araújo e Drummond (2018), o angico é uma espécie nativa brasileira, porém não endêmica, com ocorrências no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, além de ocorrências no sul da Bolívia ao Norte argentino. Por meio de cortes no tronco, também é possível obter goma-resina, que também é amplamente utilizada na medicina popular.

Ribeiro et al. (2014), em levantamentos etnobotânicos, concluiu que populações de pequenos distritos fazem uso da casca do angico para tratamento de problemas como dores, inflamações, gripes, sinusite, asma, bronquite, tosses e febre a partir da dedocção, molho e consumo em pó, por exemplo. Esse uso empírico foi corroborado por estudos e testes laboratoriais realizados por pesquisadores como Silva (2017), Marinho, Silva e Souza (2018) e Almeida e colaboradores (2017), por exemplo.

No que diz respeito ao paisagismo, é utilizada em arborização de ruas e parques, quebra-ventos, sombreamento em pastagens e atrativos de abelhas e outros insetos polinizadores (PAREYN; ARAÚJO; DRUMMOND, 2018).

Graças a sua frequente aparição nos biomas Caatinga e Cerrado, o angico não é dita como espécime em extinção e entende-se que sua população deve ser bem representada em Unidades de Conservação (PAREYN; ARAÚJO; DRUMMOND, 2018).

Figura 3 - *Anadenanthera macrocarpa* – Angico-Vermelho.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

2.6 LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GENERO *Candidassp*

Além da classificação formal taxonômica, as infecções fúngicas também podem ser classificadas de acordo com o parasitismo tecidual e características específicas dos grupos de organismos, sendo divididas em micoses superficiais, cutâneas e subcutâneas, endêmicas e oportunistas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

O tratamento de doenças causadas por fungos, além de ser uma questão explícita de saúde pública, é, simultaneamente, uma questão econômica nacional. Estudos estimam que o custo terapêutico para pacientes infectados pode ser equivalente a R\$ 400.000 (CTDS, 2018), ressaltando assim a importância do desenvolvimento de novas substâncias antifúngicas efetivas. Em contrapartida, estudos recentes apresentam grande negligência em relação a investimento para novas pesquisas e inovação na área de micoses humanas.

Doenças fúngicas causadas por *Candidassp*, para Vazquez (2010), tornaram-se as responsáveis por grandes causas de morte. A candidíase invasiva é responsável por cerca de 30% das doenças nosocomiais obtidas em leitos de UTI. A falta de diagnósticos rápidos e precisos dessas patologias acarretam em atrasos na terapia adequada. Vazquez (2010) ainda explica que, mesmo com novos antifúngicos com atividades antifúngicas de maior espectro, as doenças provocadas por *Candidassp* ainda são responsáveis por uma mortalidade global entre 30 e 50%.

Boni (2016) explica que as células de *Candidassp* apresentam-se em formatos arredondado e oval, com tamanho equivalente entre 2,0µm e 6,0 µm, com coloração branca ou creme, de superfícies lisas ou rugosas.

O gênero *Candida* engloba cerca de 160 espécies, das quais apenas cerca de 20 dessas possuem patologia comprovada, com destaque para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (ROCHA, 2014). No entanto, a lista de espécies consideradas não-patogênicas vem se expandindo. Paramythiotou et al. (2014) explica que esse fato se dá pelo aumento da população susceptível e pela capacidade de laboratórios isolarem novas espécies.

Murray, Rosenthal e Pfaller(2014) propõe que o aumento das infecções fúngicas pode ser atribuído ao crescente aumento no número de pacientes imunossuprimidos, incluindo transplantados, portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pacientes sob uso de quimioterapia ou portadores de doenças de base grave submetidos a procedimentos invasivos, como colocação de sondas ou cateteres.

Javis (1995), quando citado por Silva e colaboradores (2014), explica que as infecções hospitalares se apresentam nas mais variadas formas, tais como infecções do trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas e abscessos provenientes da inserção de cateter.

As micoses oportunistas apresentam um diagnóstico de complexidade igual para clínicos e micologistas devido à complexidade da população de pacientes susceptíveis a infecção.

Segundo Raimundo e Toledo (2017), atualmente, houve um crescimento das resistências das leveduras do tipo *Candida* frente aos antifúngicos já existentes no mercado, fazendo-se necessária a pesquisa por novos medicamentos. As leveduras do gênero *Candida* spp. apresentam enfermidades cutâneo-mucosas, sistêmicas e alérgicas, tais como candidíase oral, candidíase vulvovaginal, balanite, candidíase cutânea, onicomicose e paroníquia e outras infecções mistas. Segundo Costa (2015), as leveduras do gênero *Candida* infectam, geralmente, a pele e membranas mucosas, como as da boca e vagina, além de serem capazes de invadir tecidos mais profundos, como sangue.

A *Candida* spp. é um fungo dimórfico que pode se apresentar como leveduras esféricas ou na forma alongada, denominada "hifa" (MIOTTO et al., 2011). A identificação de *Candida* spp. se dá por diversos métodos. A escolha desse método depende de fatores como nível de identificação desejado, número de amostras disponíveis e recursos financeiros disponíveis.

Segundo Barbedo e Sgarbi (2010), a biologia de *C. albicans* apresenta a capacidade de apresentar-se de diversos aspectos morfológicos. A fase unicelular leveduriforme pode gerar um broto e formar hifas verdadeiras. Entre esses dois extremos, brotamento e filamentação, o fungo ainda pode exibir uma variedade de morfologias durante seu crescimento, formando assim as pseudo-hifas, que na realidade são leveduras alongadas unidas entre si. Ademais, *C. albicans* ainda é capaz de inibir o crescimento de outras leveduras patogênicas *in vitro*. Isso pode ser explicado pela liberação de dióxido de carbono pela *C. albicans* e produção de ácidos produzidos pelas leveduras (SOUSDALEFF, 2016).

As leveduras do gênero *Candida* spp. possui grande importância devido à frequência de infecção e colonização do organismo humano, fazendo parte da microbiota humana normal de indivíduos saudáveis. Para Barbedo e Sgarbi (2010), são encontradas espécies de *Candida* no trato gastrointestinal em cerca de 80% dos indivíduos adultos. Na população feminina, cerca de 20 a 30% apresentam colonização de *Candida* vaginal. Em hospitais, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas.

No entanto, quando ocorre situações em que há a perda homeostática, essas espécies apresentam comportamento agressivo e, conseqüentemente, patógenas. No que diz respeito à origem dessas infecções, podem ser de origem endógena, a partir da microbiota humana, ou exógena, provinda de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs).

Oliveira (2018), ao citar Hitchcock et al. (1993) e Geiger et al. (1995) explica que *C.glabrata* é dito como um saprófito da flora normal de indivíduos saudáveis que, quando há um uso prolongado de imunossupressores e antifúngicos de amplo espectro, é responsável pela causa de infecções graves no paciente. Ademais, são causadoras de infecções mucosas ou sistêmicas, ocorrendo com maior frequência em indivíduos imunocomprometidos ou portadores de Diabetes Mellitus. Devido à sua resistência intrínseca a agentes antifúngicos pertencentes a classe dos azóis, com destaque ao fluconazol, infecções provocadas por essa espécie são difíceis de tratar, respondendo assim por altas taxas de mortalidade em pacientes hospitalizados comprometidos.

Barbedo e Sgarbi (2010) descrevem *C. tropicalis* como a segunda ou terceira maior responsável por candidemias em indivíduos adultos, principalmente aqueles portadores de câncer e complicações hematológicas, por exemplo, além de seu poder de transmissão nosocomial significativo.

2.7 LEVEDURAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO *Geotrichum* sp.

Segundo Lima (2010), na sua forma teleomórfica, o fungo *Geotrichum* sp. apresenta 126 espécies distintas, 12 variedades e 2 formas especiais. Como sinônimas, pode ser descrito como *Fermentotrichon*, *Oosporoideae* *Polumorphomyces*. Suas características morfológicas e fisiológicas são muito semelhantes ao *Tricosporon* sp., mas difere-se pela apresentação de artrósporos (conídios formados a partir do desmembramento de hifas septadas) (OLIVEIRA, 2014).

Espécies de *Geotrichum* sp. são encontrados no solo, água, ar e esgoto, plantas, cereais, produtos lácteos e também na flora humana. Caracterizam-se pelo rápido crescimento, com colônias brancas e texturas cremosa ou cerosa (TOMÉ, 2018).

Ao infectar tecidos, *Geotrichum* sp. provocam leveduroses que são geralmente confundidas com leveduroses provocadas por *Candidae Cryptococcus neoformans* (OLIVEIRA, 2014). Algumas espécies, como *Geotrichum candidum*, destacam-se pela indução de problemas infecciosos do sistema respiratório, infecções alimentares e vaginais (ATLAS MICOLOGIA, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade antifúngica dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos coletados em Angico-Vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar partes aéreas da *A. macrocarpa* (Angico-vermelho) na cidade de Sumé-PB;
- Isolar os fungos endofíticos do Angico-vermelho em meio de cultura;
- Induzir a produção de metabólitos secundários dos fungos endofíticos, via cultivo em meio de aveia;
- Purificar e testar metabólitos purificados contra cepas de *Candidasp.* e *Geotrichumsp.*;
- Fazer identificação taxonômica, em nível de gênero, dos melhores produtores de substâncias antifúngicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi executado na cidade de Sumé, no Cariri Paraibano (7° 40' 19" S, 36° 52' 48" W).

Todos os procedimentos foram feitos sob condição asséptica e conduzidos nos Laboratórios de Biologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA-UFCG).

Foram definidas condições como meio de cultura e temperatura, além de procedimentos para isolamento dos fungos em estudo, produção dos conídios, produção e extração de metabólitos secundários, testes antibiogramas e purificação dos melhores inibidores.

4.1 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para a obtenção dos fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa* é composto por batata, sacarose e ágar (BSA), nas concentrações de 100g/L, 20g/L e 6g/L, respectivamente. A batata foi triturada em liquidificador com água destilada e, em seguida, filtrada e acrescida de sacarose e completada com água destilada (q.s.p. 1000mL). Por fim, a solução foi distribuída em Erlenmeyers, acrescentado o ágar e autoclavada, a 121°C e 1atm, por 15 minutos. O meio foi distribuído em placas de Petri, previamente autoclavadas.

4.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.2.1 Coleta e esterilização das partes vegetais

As partes das plantas foram coletadas, nas dependências do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande (CDSA-UFCG). Foram coletadas partes do caule da planta. As amostras foram desinfetadas com álcool 70%. Posteriormente, o material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos e inoculado em placas de Petri contendo meio e adicionado de antibiótico Amoxicilina (1g/L), a fim de inibir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 24°C, por 96h.

Os microrganismos crescidos em placa foram recultivados por sete dias, a fim de estimular a produção de conídios e obtenção de colônias puras.

4.2.2 Produção de conídios

Após o crescimento das colônias puras, com auxílio bastão de vidro e uma solução formada por NaCl, detergente aniônico puro e água (4,5g, 500 μ L e 500mL, respectivamente), foi realizada a extração dos conídios. As soluções de conídios foram transferidas para tubos esterilizados etiquetados e armazenadas em geladeira. Posteriormente, essas amostras foram diluídas em uma proporção de 1:10 μ L de água destilada, e feitas as contagens de esporos, em câmara de Neubauer.

4.3 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Após a obtenção dos conídios e contagem em câmara de Neubauer, foram semeados 2 ml da solução de conídios em meio de aveia, composto por 5g de aveia comercial diluída em 15mL de água destilada por recipiente. O meio foi autoclavado a 121°C e 1atm, pelo período de 1h. Em seguida, os potes foram colocados em estufa a 37°C, pelo período de 7 dias, a fim de promover a produção de metabólitos secundários.

A extração dos metabólitos secundários foi feita pela adição de 15mL de clorofórmio 99,8% no meio de aveia. O composto formado por aveia e clorofórmio foi transferido para tubos plásticos cônicos e centrifugados a 2000Xg, por 15 minutos. Decorrido o tempo de centrifugação, o extrato foi removido e transferidos para frascos de vidro, para que houvesse a secagem por evaporação do solvente.

Após secagem, foi novamente adicionada uma quantidade mínima de clorofórmio sobre os extratos, transferidos para frascos esterilizados e identificados e armazenados em geladeira.

4.4 CULTIVO DOS FUNGOS PATOGÊNICOS

Os testes antifúngicos foram feitos para as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabratae* *Geotrichum* sp., mantidos em meio de cultura Infusão de Cérebro-Coração em Ágar (BHIA).

Primordialmente, foi preparada uma Solução Inicial, formada por uma pequena fração da cepa, retirada com auxílio de uma alça de platina flambada, e 2mL de solução salina 0,9%. Foi cultivado 1mL da Solução Inicial em meio BSA e acondicionado em estufa a 37°C, para que fosse feita a quantificação de células viáveis (Unidades Formadoras de Colônias – UFC).

De cada Solução Inicial, fora utilizado um volume de células equivalente à 1×10^7 e diluídos em Solução Salina em um volume q.s.p. 1mL. A padronização do volume de células viáveis em 1×10^7 pode ser explicado pelo fato de ser uma quantidade suficiente para crescer por toda a Placa de Petri num intervalo igual a 12h.

4.5 OBTENÇÃO DOS DISCOS ANTIBIOGRAMAS

Os discos antibiogramas para testes antifúngicos foram feitos de acordo com modelo descrito na Farmacopeia Brasileira (1988), com adaptações. Os discos foram confeccionados com papel filtro e furador de papel, esterilizados por radiação UV.

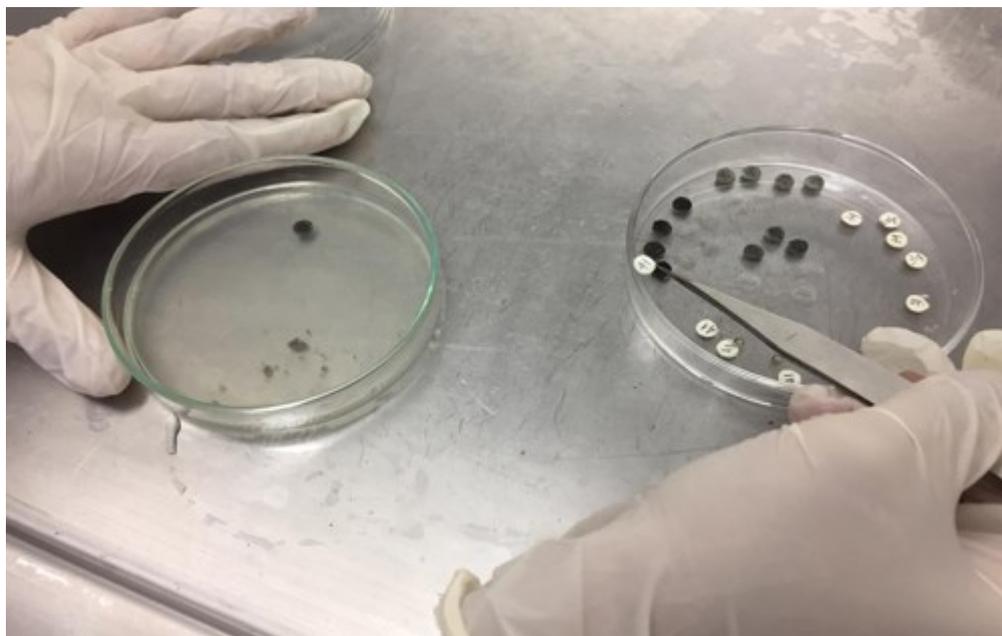
Foram adicionadas três alíquotas de 10 μ L de extrato em cada disco, de modo que a próxima fração de extrato era adicionada após a absorção completa. Os testes foram realizados em triplicatas, com testes positivo e negativo para cada ensaio.

O controle positivo foi feito com Cetoconazol 500mg macerado em graal com pistilo, e diluído em 3 mL de metanol, em quantidade de 50 μ L por discos, tendo, assim, cada disco contendo o equivalente a 8,3mg de Cetoconazol. Já o controle negativo foi formado apenas por metanol, na mesma quantidade.

Os discos foram adicionados nas placas contendo meio BSA e a Solução Diluída, obtida a partir do volume de células diluído em Solução Salina (Figura 5). Após a adição dos discos, as placas foram acondicionadas em estufa, a 37°C, pelo período de 12h. Decorrido esse tempo, foi analisada a atividade antifúngica, por meio da medição dos halos de inibição obtidos.

Por fim, foram feitas estimativas da eficiência de inibição equivalente dos extratos, obtida a partir da razão entre os diâmetros dos halos obtidos a partir dos extratos brutos e do controle positivo.

Figura 4 - Disposição dos discos antibiogramas contendo extratos fúngicos para testes em *Candidasp.*



Fonte: Dados da Pesquisa (2019)

4.6 PURIFICAÇÃO DOS MELHORES INIBIDORES

A partir da obtenção e análise dos halos, foi escolhido o extrato que apresentou melhor resultado de inibição. Com base na Tabela 3, foi selecionado os Fungos nº9 e nº12, os quais apresentaram bons resultados para as quatro leveduras em questão.

A purificação foi realizada em CLAE-FR, em coluna PelkinElmer C18 (150mm x 4.6mm), com gradiente de água e metanol, com fluxo igual a 1mL/min. Foi mantido água como solvente até o tempo de 5 minutos. O gradiente crescente até 100% de metanol, durante 20 minutos, seguida de uma lavagem da coluna por 1 minuto, com leitura do eluído a 230nm.

As amostras purificadas foram diluídas em uma proporção de 2:1 de água, a fim de acelerar o processo de congelamento, e congeladas a -50°C durante 16h, e liofilizadas por 72h. Após o período de liofilização, as amostras foram recuperadas com 2mL de solução 1:1 água e metanol, tornando-se, assim, mais concentradas. Foram novamente congeladas e liofilizadas por 24h.

Após a liofilização, as frações foram diluídas em 380µL de metanol, para a produção de discos antibiogramas, a fim de provocar a inibição das cepas a partir dos compostos purificados.

Os discos antibiogramas foram identificados como A (0-5min), B (10-15min), C (15-20min), D (20-25min), + (controle positivo) e – (controle negativo).

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

A identificação dos melhores produtores de substâncias fúngicas fora feito pelo método da fita adesiva, utilizada por autores como Bernardi, Caldeira e Nascimento (2005) e Pantoja (2008), onde pressionou-se, suave e firmemente, um fragmento de fita sobre a colônia fúngica esporulada e, em seguida, fixação em uma lâmina de microscopia, para análise. A partir da análise das estruturas morfológicas das colônias obtidas em microscópio óptico, foram feitas comparações com material disponível na literatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ISOLAMENTO DAS PARTES VEGETAIS E FUNGOS ENDOFÍTICOS

A partir das placas inoculadas com os galhos do angico, foram obtidos quarenta e um fungos diferentes. A princípio, foram analisados sua velocidade de crescimento em meio BSA e crescimento dos conídios em meio de aveia, além da coloração e quantidade de conídios produzidos por cada fungo.

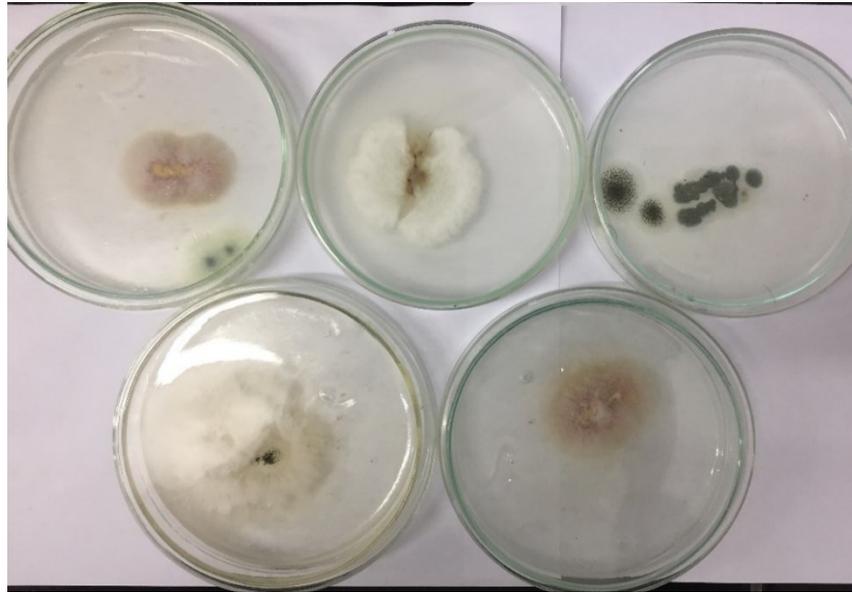
A Figura 6 apresenta o inóculo das partes vegetais cultivadas em BSA após dois dias, a 24°C, enquanto as Figuras 7 e 8 mostram os fungos isolados após quatro dias de crescimento em BSA e o crescimento de um dos isolados após o intervalo de sete dias, respectivamente. Os fungos de coloração branca (branco gelo e neve) demonstraram crescimento rápido em meio BSA, tomando cerca de 50% da placa em quatro dias. Os fungos pretos apresentaram crescimento moderado, enquanto os fungos verdes apresentaram lento, no mesmo intervalo de tempo.

Figura 5 - Inóculo das partes vegetais em meio BSA após dois dias de incubação a 24°C.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Figura 6 - Fungos isolados em meio BSA após quatro dias de inóculo.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Figura 7 - Crescimento de um dos isolados após intervalo de sete dias.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Ademais, fora observado que, quando submetidos a temperaturas entre 24°C e 30°C, os isolados fúngicos apresentam melhor crescimento e produção de conídios, enquanto temperaturas superiores a 30°C não apresenta crescimento na mesma velocidade que nas temperaturas citadas. Resultado semelhante a esse foi obtido por Poltronieri, Azevedo e Silva (2013), ao cultivar, em distintas temperaturas, fungos isolados de *C. gloeosporioidese* Zucchi

(2016), ao observar que isolados fúngicos de *Pisolithusmicrocarpus* apresentaram alteração na coloração e crescimento reduzido quando mantidos em temperatura igual a 37°C.

A Tabela 1 apresenta a quantidade de conídios produzidos por cada fungo, além de suas cores. Os fungos de coloração branca apresentaram maior produção de conídios, seguido pelos fungos verdes e pretos.

Para Faia (2011), existem características que podem descrever fungos que pertencem a mais do que um filo, sendo algumas específicas. Os fungos que são pertencentes aos *Zygomycota*, possuem características diferentes de outros filios, tais como, rápido crescimento, micélio não-septado e reprodução através de esporangióforos, os quais são produzidos numa estrutura reprodutora assexuada, o esporângio. A presença de micélio septado e reprodução sexuada são características específicas de filios mais desenvolvidas, como *Basidiomycota* e *Ascomycota*. Nestes dois filios, a reprodução sexuada ocorre através de ascósporos, produzidos em ascos (*Ascomycota*) e basidiósporos, produzidos em basídios (*Basidiomycota*).

Tabela 1 - Fungos identificados a partir da sua coloração e produção de conídios, em meio BSA.

FUNGO	COLORAÇÃO	QTE DE CONÍDIOS
1	Branco	8,39 x 10 ⁷
2	Branco	4,7 x 10 ⁷
3	Branco	9,0 x 10 ⁷
4	Branco	3,34 x 10 ⁷
5	Branco	3,89 x 10 ⁷
6	Branco gelo	1,25 x 10 ⁷
7	Branco gelo	6,30 x 10 ⁷
8	Vermelho	9,0 x 10 ⁷
9	Chartreuse	4,7 x 10 ⁷
10	Verde escuro	2,2 x 10 ⁷
11	Chartreuse	3,80 x 10 ⁷
12	Branco	1,38 x 10 ⁷
13	Chartreuse	6,93 x 10 ⁷
14	Branco gelo	2,4 x 10 ⁷
15	Chartreuse	1,1 x 10 ⁸
16	Branco gelo	6,07 x 10 ⁷
17	Preto	1,51 x 10 ⁷
18	Branco	5,0 x 10 ⁷
19	Verde água	7,8 x 10 ⁷
20	Verde	3,3 x 10 ⁷
21	Verde escuro	2,9 x 10 ⁷
22	Chartreuse	1,7 x 10 ⁷
23	Verde escuro	1,1 x 10 ⁷
24	Branco	1,7 x 10 ⁷
25	Verde	4,94 x 10 ⁷
26	Preto	1,18 x 10 ⁸
27	Verde	8,69 x 10 ⁷
28	Verde	6,17 x 10 ⁷
29	Verde	3,12 x 10 ⁷
30	Verde	2,74 x 10 ⁷
31	Chartreuse	7,92 x 10 ⁷
32	Chartreuse	1,46 x 10 ⁷
33	Branco	2,42 x 10 ⁷
34	Chartreuse	9,6 x 10 ⁷
35	Chartreuse	8,26 x 10 ⁷
36	Preto	2,16 x 10 ⁷
37	Chartreuse	8,70 x 10 ⁷
38	Branco	1,82 x 10 ⁷
39	Chartreuse	1,108 x 10 ⁸
40	Chartreuse	5,04 x 10 ⁷
41	Preto	7,58 x 10 ⁷

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Dias Neto et al. (2010), ao testar diferentes meios de cultivo para a esporulação de *M. grisea*, obteve melhores resultados quando cultivados em aveia, assim como Gomes e Pena (2016), que também obtiveram melhores resultados de esporulação com cultivo em meio de aveia, e Soares et al. (2009), que obtiveram bons resultados de esporulação em meios de farinha de aveia e aveia em flocos grossos.

Calvo e colaboradores (2002) explica que a produção dos metabólitos secundários ocorre durante o processo de esporulação dos microrganismos. Em meio um meio desfavorável, como meio de aveia, os metabólitos secundários são sintetizados por reações químicas seriadas ocorrentes nas células, resultando na síntese de um produto favorável a sobrevivência (NASCIMENTO et al., 2014). Sendo a aveia a única fonte nutritiva do meio, o microrganismo será induzido a produzir substâncias de defesa que faça com que vença a concorrência por alimento.

5.2 OBTENÇÃO DE HALOS INIBITÓRIOS

A Tabela 2 apresenta o número de UFC da Solução Inicial quando cultivada em meio BSA pelo período de 12h, a 37°C. As leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans* apresentaram crescimento superior as demais. Isso pode ser explicado pelo fato das duas leveduras em questão indica bom crescimento em temperaturas elevadas, característica peculiar dos fungos dimórficos. Em contrapartida, como a *C. glabrata* não se caracteriza como fungo dimórfico, não apresenta crescimento tão elevado quando comparada à outras espécies de *Candida* (BARBEDO e SGARBI, 2010). O dimorfismo em fungos patogênicos é dependente da temperatura, apresentando crescimento semelhante a uma levedura quando cultivados a temperatura equivalente a 37°C e forma de levedura a 25°C (TORTORA, 2005; MURRAY et al., 2009).

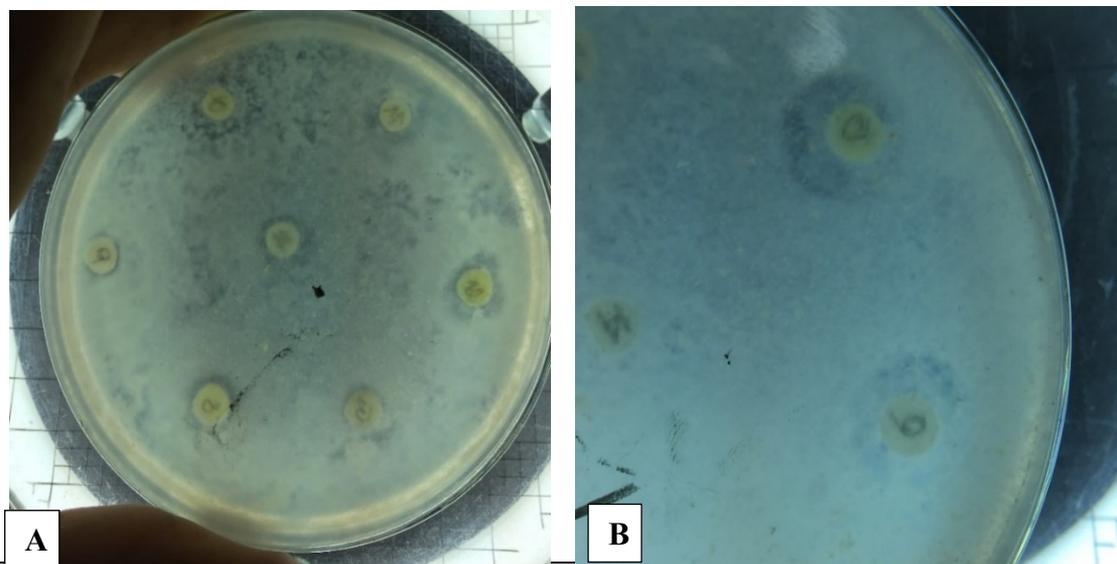
Tabela 2 - Número de unidades formadoras de colônia, obtida por meio de cultivo em meio BSA, e volume equivalente a 1×10^7 da Solução Inicial utilizado para testes com extratos fúngicos brutos.

Cepa	UFC/mL x 10 ⁸	Volume Utilizado (µL)
<i>C. Tropicallis</i>	4,88	20,49
<i>Geotrichum</i> sp.	1,56	64,10
<i>C. Glabrata</i>	2,92	34,25
<i>C. Albicans</i>	4,52	22,13

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

A Figura 8 apresenta os halos de inibição obtidos com os extratos fúngicos obtidos para as leveduras *Geotrichum* sp., *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* após 12h, em meio BSA, a 37°C. Dentre todos os extratos brutos testados, os halos de inibição foram mais efetivos para a espécie de *Candida glabratae Geotrichum* sp. utilizadas no teste. A Tabela 3 relata o diâmetro médio de halos obtido por todos os extratos para as quatro leveduras em questão.

Figura 8 - Halos inibitórios obtidos para as leveduras (A) *Geotrichum* sp. e (B) *C. Albicans*.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Ao analisar os halos produzidos pelos extratos brutos dos fungos, foi perceptível que o extrato do Fungo nº9 obteve maior destaque de inibição, sendo eficaz para as quatro leveduras testadas. Ao fazer a estimativa de eficiência de inibição equivalente dos extratos brutos em relação ao controle positivo utilizado, com eficiência equivalente entre 88,89% e 166,67% da concentração de cetoconazol testado.

O extrato bruto do Fungo nº12 apresentou eficiência de inibição equivalente entre 77,78% e 100% do cetoconazol, frente as leveduras testadas. De todos os extratos testados, o Fungo nº12 apresentou segundo maior resultado de inibição, com inibição para três das leveduras.

Tabela 3 - Diâmetro médio dos halos inibitórios obtidos pelos discos contendo extratos fúngicos para cada cepa utilizada.

	<i>C. tropicalis</i>	<i>Geotrichumsp.</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>
1	-	10 mm	-	-
2	-	9 mm	-	8mm
3	10mm	-	11 mm	-
4	-	8 mm	9mm	-
5	10 mm	-	-	11mm
6	-	10 mm	10mm	-
7	-	9 mm	15 mm	-
8	7mm	8 mm	-	9mm
9	8 mm	9 mm	15 mm	9mm
10	-	-	13 mm	-
11	8mm	13 mm	-	9mm
12	-	10 mm	7mm	9mm
13	9 mm	-	-	-
14	8 mm	9 mm	-	9mm
15	-	-	7 mm	-
16	-	-	8mm	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	8 mm	-
21	8 mm	-	-	-
22	-	-	7 mm	7mm
23	-	-	9 mm	-
24	-	-	-	-
25	12 mm	-	10mm	-
26	-	-	12mm	-
27	-	11mm	9mm	-
28	12mm	-	-	-
29	11mm	-	-	8mm
30	-	10mm	12mm	-
31	10mm	9mm	9mm	-
32	-	-	15mm	11mm
33	10mm	-	-	8mm
34	-	13mm	-	8mm
35	-	7mm	-	9mm
36	-	7mm	-	8mm
37	11mm	-	8mm	-
38	10mm	10mm	-	-
39	11mm	-	11mm	-
40	-	8mm	7mm	9mm
41	-	10mm	-	8mm
CTRL +	9 mm	10mm	9mm	9mm
CTRL -	-	-	-	-

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Romminger (2008), ao avaliar o potencial metabólico de fungos isolados a partir de uma espécie de alga marinha, explica que a atividade inibitória dos extratos pode ser explicada pelo fenômeno da alelopatia, que pode ser definido como o processo no qual os organismos produzem compostos químicos que podem influenciar de forma favorável ou desfavoravelmente no desenvolvimento de outras espécies. Nesse caso, como fungos e bactérias são ditos competidores naturais, os compostos produzidos pelos fungos se sobressaem em relação ao desenvolvimento de outras espécies de fungos e bactérias, o que aconteceu nesse presente trabalho.

Muitos estudos comprovam a utilização de extratos puros de metabólitos de fungos e óleos essenciais de plantas. Como exemplo, tem-se Jayanthie Shahapurkar (2011) que, ao estudar o fungo endofítico *Phomopsis* sp., isolado de *Mesua férrea*, para inibição de microrganismos e leveduras patogênicos, obteve halos inibitórios de $12 \pm 0,2$ mm para *C. albicans*; Almeida et al. (2017) que, ao testar óleos essenciais de abacate, canela e citronela para *C. glabrata*, obteve halos inibitórios variáveis entre 0 e 9,2mm; Dong-Huie colaboradores (2018) que, em seus estudos, testou compostos voláteis extraídos de metabólitos secundários de *Catharanthus roseus* contra patógenos de fungos de plantas e *C. albicans*, obtendo resultados para a inibição funcional do crescimento de um determinado número de patógenos; e Laska et al. (2017), que analisou, com sucesso, os extratos de folhas e raízes de *Pulsatillapatens*, planta nativa da Europa, a fim de inibir o crescimento de cepas como *C. albicans* e *C. glabrata*, obtendo resultados a partir de uma CIM equivalente a $9,37 \mu\text{g/ml}$.

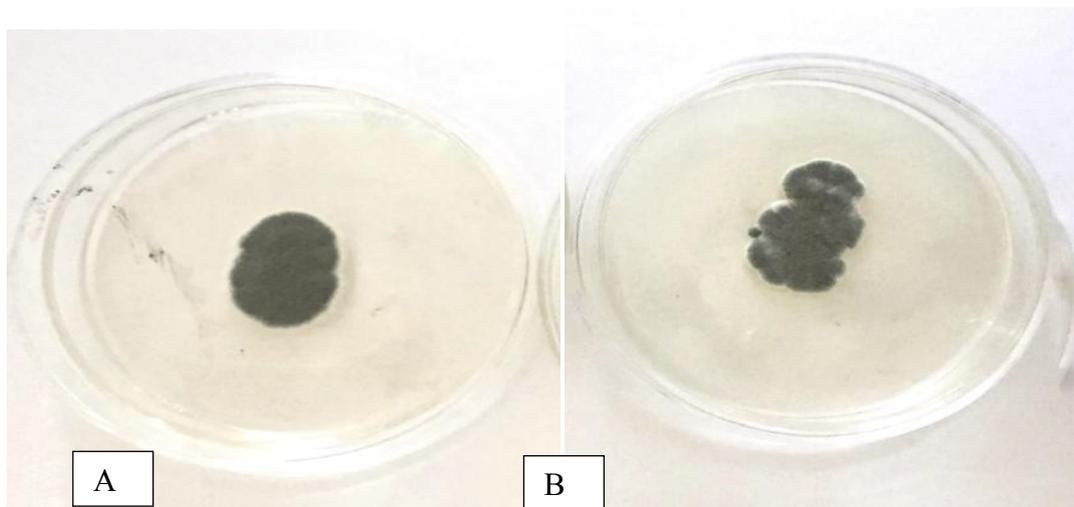
Diversos autores, como Lima (2013), Rocha (2014), Silva (2017) e Marinho, Silva e Souza (2018), também observaram o potencial antifúngico de extratos brutos de *A. macrocarpa*, obtendo resultados inibitórios iguais ou superiores aos controles positivos e com Concentração Inibitória Mínima (CIM) igual ou menor a 1mg/mL . No entanto, além de testes com extratos brutos, o presente trabalho teve, como diferencial, testar frações purificadas de metabólitos secundários de fungos endofíticos.

5.3 DEFINIÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS MELHORES INIBIDORES

A Figura 9 demonstra os Fungos 9 e 12, nessa ordem, os melhores inibidores para as leveduras em questão. Os testes das substâncias purificadas foram feitos sob mesmas condições.

A Tabela 4 apresenta o número de UFC obtidas para os testes das frações purificadas e os volumes correspondentes a 1×10^7 utilizados, enquanto as Tabelas 5 e 6 mostram os diâmetros dos halos obtidos a partir das frações purificadas dos Fungos N°9 e N°12 para as leveduras em questão.

Figura 9 - Cultivo dos Fungos (A) N°9 e (B) N°12, considerado melhores inibidores, respectivamente.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

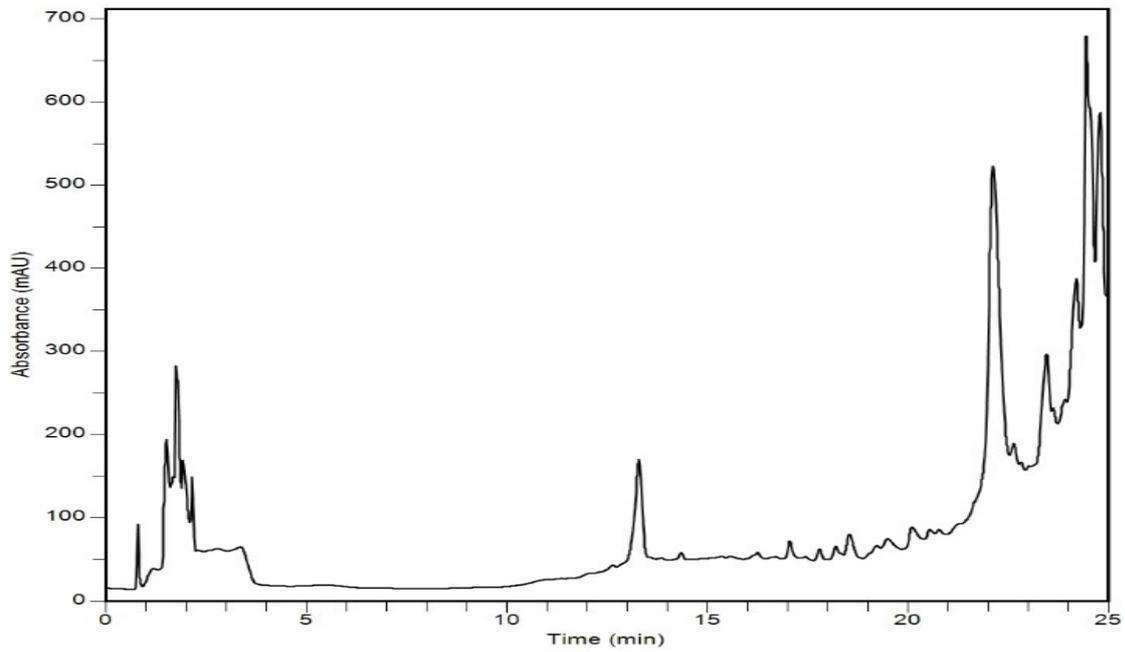
Tabela 4 - Número de unidades formadoras de colônia obtida por meio de cultivo em meio BSA e volume utilizado correspondente a 1×10^7 .

Cepa	UFC/mL x 10^8	Volume Utilizado (μ L)
<i>C. Tropicallis</i>	3,84	26,04
<i>Geotrichum</i> sp.	2,47	28,57
<i>C. Glabrata</i>	3,50	40,0
<i>C. Albicans</i>	2,50	41,67

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

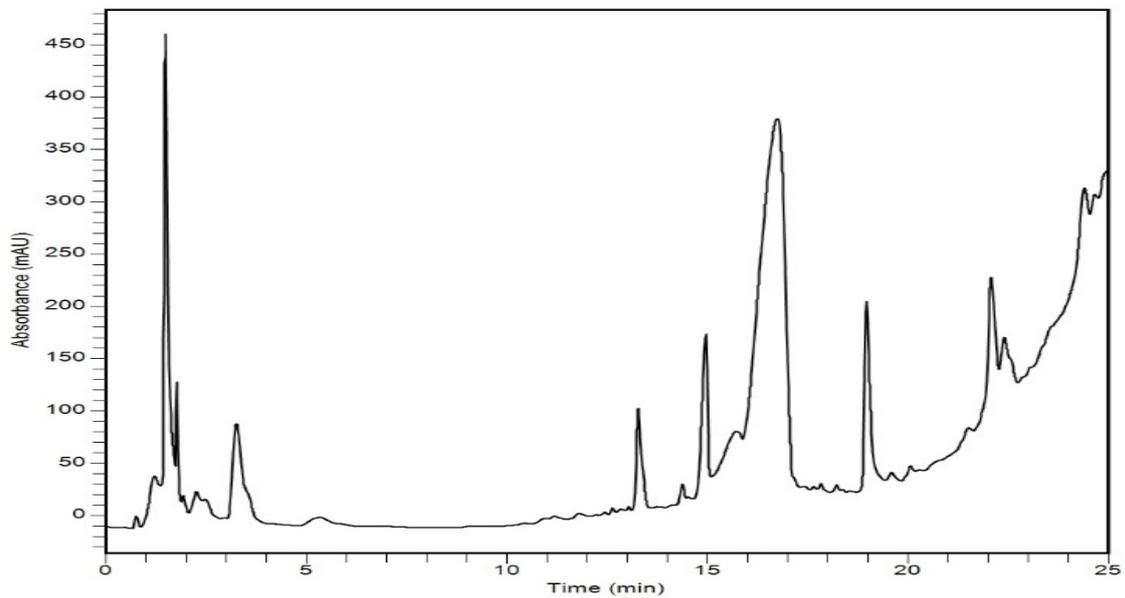
O Gráfico 2 apresenta o cromatograma obtido a partir da purificação do extrato puro do Fungo N°9, enquanto o Gráfico 3 apresenta a purificação do extrato puro do Fungo N°12. Observa-se que há um número maior de substâncias nos intervalos C (10-15min), D (15-20min) e E (20-25min), quando a porcentagem do solvente Metanol é cada vez maior, sendo possível perceber que as moléculas com maior potencial inibitório são de natureza hidrofóbica.

Gráfico 2 - Cromatograma obtido a partir da purificação do extrato do Fungo nº9.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Gráfico 3 - Cromatograma obtido a partir da purificação do extrato do Fungo nº12.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Tabela 5 - Halos obtidos a partir das frações purificadas do Fungo N°9 para cepas de *Candidasp.* e *Geotrichumsp.*

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>Geotrichumsp.</i>
A (0-5min)	-	8mm	-	-
B (5-10min)	-	8mm	8mm	-
C (10-15min)	-	8,3mm	-	7mm
D (15-20min)	9mm	-	-	-
E (20-25min)	-	8mm	-	-
Cetoconazol 8,3mg	9mm	9mm	9mm	10mm
Metanol	-	-	-	-

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

*- : não apresentou halos de inibição.

Tabela 6 - Halos obtidos a partir das frações purificadas do Fungo N°12 para cepas de *Candidasp.* e *Geotrichumsp.*

	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>Geotrichumsp.</i>
A (0-5min)	-	10mm	-	10mm
B (5-10min)	-	10mm	-	-
C (10-15min)	-	8mm	9mm	11,5mm
D (15-20min)	-	9mm	11mm	8,5mm
E (20-25min)	10mm	11mm	13mm	-
Cetoconazol 8,3mg	9mm	9mm	9mm	10mm
Metanol	-	-	-	-

Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

-: não apresentou halos de inibição.

A partir da observação dos diâmetros dos halos de inibição obtidos por meio das frações purificadas, observou melhor inibição para *C. tropicalis*. As frações C, D e E do Fungo N°12 apresentou amplo espectro, com halos maiores ou iguais ao controle positivo.

Ao observar as Tabelas 5 e 6 e compará-las com a Tabela 3, é perceptível que as inibições ocorrem com maior efetividade quando as leveduras estão frente aos extratos purificados, com maior destaque para *C. tropicalis*. Resultados semelhantes pode ser encontrado no trabalho de Faladee colaboradores (2017), que, ao testar extratos de *Rigidoporus microporosa* (SW), cogumelo selvagem não comestível encontrado na Nigéria, purificados por métodos cromatográficos, obteve halos de até 32,32mm para *C. albicans*, superiores aos halos obtidos com o extrato bruto.

Moraes (2011) apresentou bons resultados de inibição de leveduras *C. glabrata* e *C. parapsilosis* com CIM entre 7,81 e 15,62 µg/mL de extratos e frações purificadas a partir de fracionamento em fase sólida, obtidos a partir da casca de *Uncaria tomentosa*.

Peixoto (2010), ao purificar extratos de óleos essenciais de *Menthasuavelons* e *Menthaspicata* em cromatografia em camada delgada (CCD), obteve frações de inibição de biofilmes produzidos por *C. albicans* em baixas concentrações, com inibições de 49% e 38%, apresentando inibição superior ao controle Fluconazol (<40%) e inferior ao controle Anfotericina B (62%), em CIM de 1µg/mL.

Em seus estudos, Machado (2015) obteve bons resultados antifúngicos frente a isolados de *C. parapsilosis*, *C. famata*, *C. glabratae* e *C. kruseia* partir extratos vegetais de *Accasellowian* purificados em CLAE.

Silva e Souza (2016), ao induzirem a produção de metabólitos secundários de microrganismos presentes em solo rizosférico, testaram poder de antifúngico para *C. albicans*, obtendo halo de inibição equivalente a 26mm. Ao purificar o extrato por meio de CCD, obtiveram três frações com poder de inibição, com fator de retardamento (Rf) igual a 0,43.

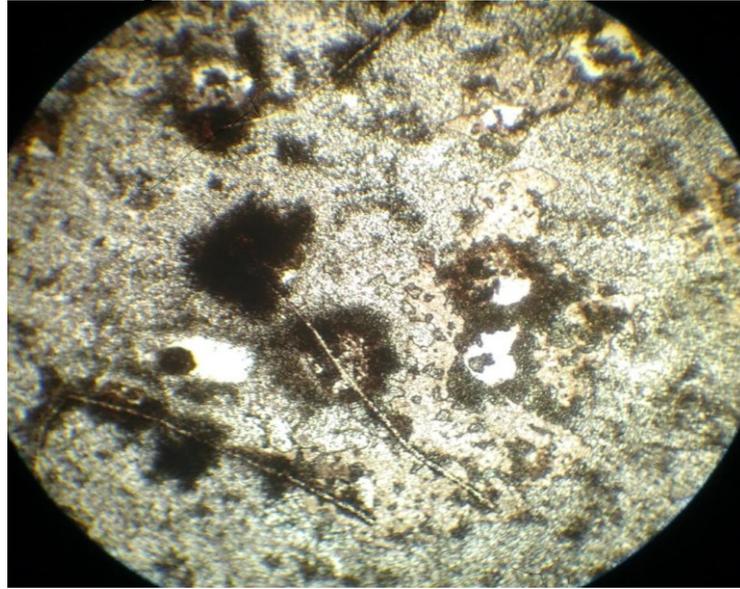
Farias (2014), ao testar frações purificadas por CLAE de metabólitos secundários do fungo marinho *Paecilomyces lilacinus*, obteve inibição de até 90,3% frente a linhagem tumoral HCT – 116, células responsáveis pelo câncer de cólon.

Como os melhores resultados de inibição foram obtidos pelas frações purificadas mais hidrofóbicas, acredita-se que, devido à hidrofobicidade do meio utilizado, houve a impossibilidade de uma melhor difusão das frações testadas. Seguramente, essas substâncias podem ser mais eficientes em meios de cultura que permitam a melhor difusão das substâncias e sejam favoráveis ao crescimento das leveduras a serem testadas, respectivamente.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

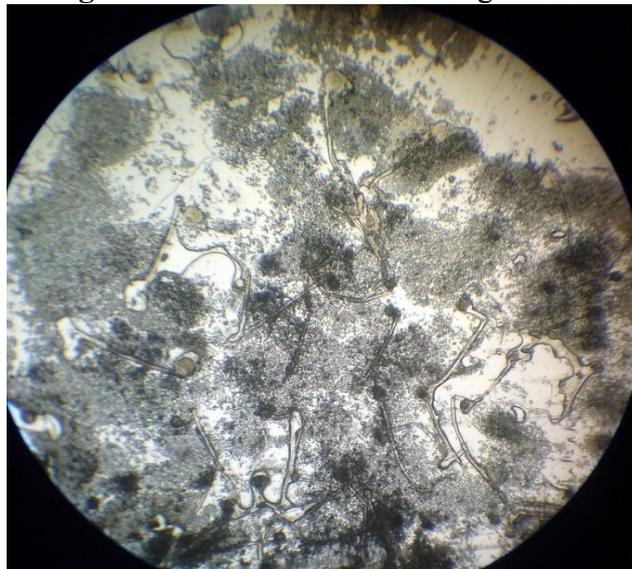
A partir de análises microscópicas com aumento de 40x, os fungos foram identificados a partir de comparações das imagens obtidas e imagens encontradas na literatura, como no trabalho de Vidotto (2004), Carvalho (2013) e Quadros (2008). As Figuras 10 e 11 mostram que os Fungos N°9 e N°12 são do gênero *Aspergillus*.

Figura 10 - Conidióforos do Fungo N°9.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

Figura 11 - Conidióforos do Fungo N°12.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

De acordo com Andrade (2016), a morfologia dos conídios é importante para a identificação de fungos, os quais podem assumir formatos globoides, ovoides, espiralados, romboides, cilíndricos e clavados, por exemplo, além de serem claros, de cores vivas ou transparentes ou de pigmentação escura. A Figura 15 apresenta a morfologia dos conídios do Fungo N°9.

Figura 12 - Esporos de *Aspergillus* sp. – Fungo N° 9.



Fonte: Dados da Pesquisa (2019).

No que diz respeito a características macroscópicas, ambas as colônias apresentaram aspecto macio e coloração semelhante, após crescimento. Segundo suas características microscópicas, as colônias apresentam conídios e conidióforos, de rápido desenvolvimento. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Clementino (2012), ao estudar atividade antibiótica de amostras de solos e plantas obtidas na região do Cariri Paraibano.

De acordo com Clementino (2012), mesmo que os fungos isolados sejam do mesmo gênero e cultivados sob mesmas condições, os mesmos ainda podem produzir metabólitos distintos e em quantidades também diferentes quando cultivados em meio de aveia. Isso pode ser explicado pela existência de espécies diferentes em um mesmo gênero, o que pode ser corroborado por Lira (2014), ao identificar vinte e três espécies de *Aspergillus* diferentes.

Mesmo que de modo introdutório, o presente trabalho confirma a eficácia do uso do angico vermelho para tratamento de doenças fúngicas, o qual sempre fora utilizado de modo empírico. Os metabólitos secundários dos fungos endofíticos do angico mostraram-se, de modo geral, bons inibidores de *Candida* spp que, atualmente, apresentam resistência a diversos fármacos antifúngicos.

Como perspectiva futura, objetiva-se a continuação da purificação dos extratos obtidos, para que sejam conhecidas as substâncias que garantem a resposta inibitória frente a leveduras testadas, com testes que permitam a maior difusão das substâncias em meio.

6 CONCLUSÃO

- 90,24% dos fungos isolados testados produzem substâncias antifúngicas, alguns deles sendo capazes de produzir halos de inibição para as quatro cepas de leveduras patogênicas;
- Os fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*, sob as condições testadas, mostraram-se efetivos produtores de substâncias contra leveduras, com destaque para as leveduras *C. glabrata* e *Geotrichum* sp;
- Após a purificação dos extratos obtidos nos Fungos N°9 e N°12, foram encontradas substâncias com atividade antifúngica, com capacidade de inibição igual ou superior a concentração de Cetoconazol, utilizada no controle positivo;
- Os halos de inibição obtidos a partir dos extratos brutos dos Fungos N°9 e N°12, quando comparados aos halos obtidos por meio do controle positivo, apresentaram eficiência entre 70% e 122,2%, enquanto os extratos purificados apresentaram inibição entre e 94,7% e 112,7% quando comparadas ao Cetoconazol;
- A identificação taxonômica mostrou que os Fungos N°9 e N°12 pertencem ao gênero *Aspergillus*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Erika Vieira de. **Desenvolvimento e validação de metodologia para radio fármacos de Tecnécio-99 m empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2009.
- ALMEIDA, Leopoldina de Fátima Dantas; PAULA, Jacqueline Felipe de; ALMEIDA-MARQUES, Rossana Vanessa Dantas de; CAVALCANTI, Yuri Wanderley.; HEBLING, Josimeri. **Atividade inibitória de óleos essenciais vegetais frente à *Candidaglabrata*, resistente a fluconazol**. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. v. 21. n. 2. p. 133-138. 2017.
- ALVES, Glaicon Florisbello. **Solubilização do fosfato de rocha por *Aspergillus niger***. 2012. 146f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2012.
- AMARAL, Luciana da Silva. **Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitânica***. 2009. 184f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2009.
- ANDRADE, Kerly Martinez. **Caracterização de fungos cercosporóides associados à vegetação de Mata Atlântica e Cercanias, no estado do Rio de Janeiro**. 2016. 137f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2016.
- ARAÚJO, Edilane Rodrigues Dantas; OLIVEIRA, Damiris Campelo; SOARES, Thaciane da Cunha.; LANGASSNER, Silvana Maria Zucolotto.; TAVARES, Joana Cristina Medeiros.; CAVALCANTI E SILVA, Dany Geraldo Kramer. **Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente à bactérias gram negativa e gram positiva**. Biota Amazônia. Macapá, v. 5, n. 3, p. 66-71, ago/2015.
- BARBEDO, Leonardo. S.; SGARBI, Diana Bridon da Graça. **Candidíase. DST – Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010, ISSN: 0103-4065, ISSN on-line: 2177-8264.
- BERNARDI, Eduardo; CALDEIRA, Marina Feijó; NASCIMENTO, José Soares do. **Identificação de fungos filamentosos em Erva-mate (*Ilexparaguariensis* ST Hil.)** Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, v. 72, n. 4, p. 489-493, out/dez, 2005.
- BONI, Giovana Cláudia. **Avaliação da atividade anti-Candidade compostos purificados isolados de diferentes espécies de *Mentha***. 2016. 66f. Dissertação (Mestrado em Biologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2016.
- BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família as ter a ceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformação**. 40f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP. 2008.

CANUTO, Kirley Marques; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares.; OLIVEIRA, Francisca Samara Assunção de.; GONÇALVES, Francisco José Teixeira. **Fungos Endofíticos: perspectivas de descobertas e aplicações de compostos bioativos na agricultura.** EMBRAPA Agroindústria Tropical. Brasília – DF, dez. 2012. ISSN 2179-8184.

CARVALHO, Luísa Isabel Correia. **Aspergillus e aspergilose: desafios no combate da doença.** 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal. 2013.

CATÃO, Rayssa Mayer Ramalho. **Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leve duriformes.** 2017. 126f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2007.

CDTS – Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde. **Doenças causadas por fungos: um problema brasileiro de saúde pública.** 2018. Disponível em: <http://www.cdts.fiocruz.br/opiniaode-especialistas/doencas-causadas-por-fungos-um-problema-brasileiro-de-saude-publica>. Acesso em 14.mar.2019.

CLEMENTINO, Leandro da Costa. **Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga.** 2014. 52f. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Universidade Federal de Campina Grande. Sumé – PB, 2014.

CORRÊA, Maria Fernanda P.; MELO, Giany O. de; COSTA, Sônia S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 18. p. 785-797. Dez/2008.

COSTA, Aratã Oliveira Cortez. **Perfil epidemiológico das micoses superficiais causadas por leveduras do gênero *Candida* em laboratório de João Pessoa-PB.** 2015. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2015.

CUNHA, Vannuty Dorneles de Sena. **Avaliação do efeito *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Anadenathera colubrina* (VELLOZO) Brenan frente à *Candidaalbicans*.** 2014. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e de Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande – PB, 2014.

DIAS NETO, Justino José; SANTOS, Gil Rodrigues dos; CASTRO NETO, Manoel Delinto de; ANJOS, Liamar Maria dos.; CUNHA, Azelma Correa Fontana.; IGNÁCIO, Maíra. **Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe griseae* da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz.** Bioscience Journal. Uberlândia – MG. v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

FAIA, Ana Margarida. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos e leveduras em alguns pontos de uma rede de distribuição de água.** 2011. 52f. (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Universidade de Lisboa, 2011.

FARIAS, Emanuela Ximenes. **Estudo do potencial citotóxico dos metabólitos secundários isolados do fungo marinho *Paecilomyces lilacinus* recuperado de sedimentos da costa cearense.** 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE, 2014.

FONSECA, Dania Alvarez. **Desenvolvimento de um novo procedimento de avaliação da estabilidade de fases estacionárias para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** 2001. 112f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas Campinas - SP. 2001.

FORTKAMP, Diana. **Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthuriumalcatrazense* e *Begoniassp.*** 2018. 185f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP, 2018. 185p.

FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira.; VASCONCELOS, Fábio Roger.; COUTINHO, Ingrid Bernardo de Lima. **Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade.** *Essentia*. Sobral, CE. v. 16, n.1, p. 61-102. jun/nov. 2014.

GOMES, Ediellen Mayara Corrêa.; PENA, Rosângela da Conceição Marques. **Isolamento, caracterização morfológica e avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura de cepas do fungo *Quambalaria sp.*** *Biota Amazônia*. Macapá, v. 6, n. 4, p. 59-63, 2016. ISSN: 2179-5746.

LIMA, Alita Moura. **Potencial de substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos amazônicos para o diagnóstico baciloscópico da tuberculose.** 2013. 109f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM, 2013.

LIMA, Milton Luiz Paz. **Estudos em Doenças de Plantas.** Disponível em: https://fitopatologia1.blogspot.com/2010/11/aspectos-gerais-e-morfologicos-de_481.html. Acesso em: 16 mar 2019.

LIMA, Renally Freitas de. **Potencial antimicrobiano e antiproliferativo da *Anadenanthera columbina* (Vell.) Brenan.** 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2013.

LIRA, Diana Duarte de. **Caracterização de *Aspergillus sp.* Quanto a capacidade de degradação de óleo diesel.** Dissertação (Mestrado em Biologia dos Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2014.

LOBO, Marco Antonio.; SILVA, Marcos Paulo de Oliveira.; YAMAMOTO, Nathália Sayuri.; GUIMARÃES, Luciana Lopes. **Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typhadomingensis* Pers(*typhaceae*).** *UNISANTA BioScience*.v.1, n.2, p. 42-51. 2013.

LOPES, Fernanda Cortez. **Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos.** 2011. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2011.

LOPES, Nilva Pereira. **Fases estacionárias de sílica e polibutadieno para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2004.

MACHADO, Gabriella da Rosa Monte. **Determinação da atividade antifúngica de *Accasellowiana*.** 2015. 108f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2015.

MAMEDE, Ana Carolina Peixoto Baidarian. **Avaliação da atividade antibacteriana de fungos do filo *ascomycota* e *basidiomycota* sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2012.

MARTINS, Ana Rita Nunes. **Purificação de RNA por cromatografia de afinidade com histidina imobilizada**. 2009. 97f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2009.

MEDEIROS, José George Ferreira de. **Qualidade de sementes de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan) com uso da termoterapia**. 2016. 91f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia – PB, 2016.

Ministério da Saúde. **Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS**. 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnpmf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus>. Acesso em: 16 de mar. 2019

MIOTTO, Nadiesca Maria Lazzari.; YURGEL, Liliane Soares.; CHERUBINI, Karen.; CAZANOVA, Ricardo Flores. **Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida sp.*** Revista da Faculdade de Odontologia – UPF. v. 9, n. 1, p. 27-33. abr. 2011. DOI: 10.5335/rfo.v9i1.1652.

MONTEIRO, Siomara da Cruz.; BRANDELLI, Clara Lia Costa. Farmacobotânica: **aspectos Teóricos e Aplicação**. Ed. Artmed, 2017. 172p.

MORAES, Renata Cougo. **Investigação *in vitro* da atividade antifúngica de *Uncaria tomentosa* (WILLD) D.C. frente a leveduras patogênicas**. 2011. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2011.

MORAIS, L. S. R. **Preparação de fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir de silicatitanizada e polibutadieno**. 2003. 111f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2003.

MURRAY, Patrick.; R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

MURRAY, Patrick.; R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NASCIMENTO, Rhayanne F. de Queiroz.; SOUSA, Breno Lino Pinheiro.; BEZERRA, RaíssaMayane S.; CAVALCANTI, RayzaMorganna Farias.; SILVA, Renally Barbosa da.; QUEIROZ, Jean César Farias de. **Prospecção de fungos da caatinga produtores de antibióticos**. Revista Saúde e Ciência *Online*. v. 3, n. 3, p.76-85, 2014.

OLIVEIRA, Jeferson Carvalho de. **Tópicos em Micologia Médica**. 4 ed. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2014, 230p.

OLIVEIRA, Priscila dos Santos. **Avaliação da atividade antifúngica do Cloridrato de Verapamil frente a leveduras do gênero *Candida***. 2018. 42f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia) – Instituto de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José dos Campos – SP, 2018.

OLIVEIRA, Rafael Lopes e. **Isolamento e avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Piper hispidum***. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – AM, 2010.

PANTOJA, Lydia Dayanne Maia. **Identificação de fungos carregados por formigas em hospitais terciários do município de Fortaleza – CE**. 2008. 162f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2008.

PAREYN, Frans Germain Corneel.; ARAUJO, Elcida de Lima.; DRUMMOND, Marcos Antonio. ***Anadenanthera colubrina***. In: Plantas para o futuro – Região Nordeste. 2018. p. 740-745. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190109/1/Livro-Nordeste-740-745.2018.pdf>. Acesso em: 17 mar 2019.

PEIXOTO, I. T. A. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de diferentes acessos de *Mentha spp.* contra *Candidaalbicans* e *Candidadubliniensis***. 2010. 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP. 2010.

PESSOA JR, Adalberto.; KILIKIAN, Beatriz. **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1ed. Barueri, SP: Manole. 2005.

POLI, Anderson.; DAS NEVES, Andrea F.; GALO, Fabiano R.; GAZARINI, Janaina.; RHODEN, Sandro A.; PAMPHILE, João A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. SaBios: **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p.82-89, 2012.

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

RAIMUNDO, Jéssica da Silva.; TOLEDO, Cleyton Eduardo Mendes de. Plantas com atividade antifúngica no tratamento da candidíase: uma revisão bibliográfica. **Revista UningáReview**. v. 29, n. 2, p. 75-80. jan/mar, 2017. ISSN: 2178-2571.

RIBEIRO, Daiany Alves; MACÊDO, Delmácia Gonçalves de.; OLIVEIRA, Liana Geraldo Souza de.; SARAIVA, Manuele Eufrásio.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, Irwin Rose Alencar. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

ROCHA, Eveline Angélica Lira de Souza Sales. **Atividade antifúngica, caracterização fitoquímica e perfil térmico da *Anadenanthera columbrina* (Vell.) Brenan**. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – Paraíba, 2014.

RODRIGUES, Rogério Leonardo. **Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ExSchult. F. (*Velloziaceae*) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins.** 2010. 73f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG, 2010.

ROMMINGER, Stelamar. **Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum*.** 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2008.

SANTOS, Rogério Pitanga. **Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de *Arrabidaea chica*.** 2015. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2015.

SILVA, Alan Garcia Cardoso da.; SOUZA, Tatiane Dias de. **Atividade antifúngica *in vitro* de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus cereus*.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, v. 14, n. 2, p. 522-529, ago./dez. 2016.

SILVA, Diego Romário da. **Potencial antifúngico e antibiofilme contra espécies de *Candida* e toxicidade da *Anadenanthera colubrinavell. Brenan*.** 2017. 72f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, 2017.

SILVA, Igor Pereira da. **Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas.** Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer. Goiânia – GO. v.10, n.18; p. 3888-3905, 2014.

SILVA, Matheus Henrique Reis da. **Fungos endofíticos associados a *Passiflora incarnata* avaliação de seu potencial biotecnológico.** 2017. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Rio Claro – SP, 2017.

SILVA, Patrícia Damasceno. **Determinação de compostos fenólicos por HPLC.** 2012. 136f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

SLIVINSKI, Christiane Trevisan. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido.** 2007. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR.

SOARES, Pedro Luiz Martins.; NOZAKI, Márcia de Holanda.; BARBOSA, Bruno Flávio F.; SANTOS, Jaime Maia dos.; BARBOSA, José Carlos. **Crescimento e esporulação de duas espécies de *Arthrobotryscorda* em diferentes meios de cultura e dois ambientes.** BioscienceJournal.Uberlândia – MG. v. 25, n. 2, p. 63-74, 2009.

SOUSDALEFF, Martha. **Caracterização de fungos de ar indoor e ar outdoor dos laboratórios da UTFPR Campus Campo Mourão-PR.** 2016. 81f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão – PR. 2016.

SOUZA, Gustavo Henrique Bicanco de.; MELLO, João Carlos Palazzo de.; LOPES, NobertoPeporine. FARMACOGNOSIA: **Coleção Científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012. 372p.

SPECIAN, Vânia.; ORLANDELLI, Ravelly Casarotti.; FELBER, Aretusa Cristina.; AZEVEDO, João Lúcio.; PAMPHILE, João Alencar. **Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos**. UNOPAR Científica CiênciasBiológicas e da Saúde. Londrina, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STROBEL, Gary.; DAISY, Bryn. **Bioprospecting for Microbial EndophytesandTheir Natural Products**. Microbiologyand Molecular BiologyReviews. v. 67, n. 4, p. 491-502. dez/2003. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.491–502.

TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida; LIMA, Gesiane da Silva.; SANTOS, Gabriel Ferreira dos.; LYRA, Fernanda Henrique.; HUGHES, Alice Ferreira da Silva.; GONÇALVES, Flávia Augusta Guilherme. Fungos filamentosos e química: **velhos conhecidos, novos aliados**. Revista Virtual de Química. v. 9, n. 6, p. 2351-2382. Set/2017.

TOMÉ, Rui. **Geotrichumcandidum**. Atlas Micologia. Universidade de Coimbra. Disponível em: <https://atlasmicologia.blogspot.com/2018/01/geotrichum-candidum.html>. Acesso em: 19 mar 2019.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VALENCIA, Jorge William Arboleda. Metabólitos de origem fúngica: **aplicações potenciais em processos biotecnológicos**. 2011. 117f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília– DF, 2011.

VIDOTTO, Valerio. **Manual de micologia médica**. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd, 1. ed., 2004.

ZUCCHI, Mariana Cristina. **Estudo da atividade antibacteriana de isolados do gênero *Pisolithusmicrocarpus***. 2016. 61f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2016.