



**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**

**CAMILA JOYCE FERREIRA DE LÓCIO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBIÓTICA E  
ANTIPARASITÁRIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Anadenanthera macrocarpa*.**

**SUMÉ - PB  
2019**

**CAMILA JOYCE FERREIRA DE LÓCIO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBIÓTICA E  
ANTIPARASITÁRIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Anadenanthera macrocarpa*.**

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

**Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.**

**SUMÉ - PB  
2019**

L432a Lócio, Camila Joyce Ferreira de.  
Avaliação das atividades antibióticas e antiparasitária de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*. / Camila Joyce Ferreira de Lócio. - Sumé - PB: [s.n], 2019.

48 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. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos secundários. 3. *Anadenanthera macrocarpa*. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. *Leishmania amazonensis*. 6. Ação antiparasitária. 7. Bactérias multirressistentes  
I. Queiroz, Jean César Farias de. II. Título.

CDU: 561.28(043.1)

**Elaboração da Ficha Catalográfica:**

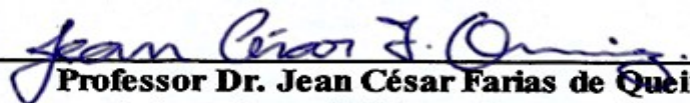
Johnny Rodrigues Barbosa  
Bibliotecário-Documentalista  
CRB-15/626

**CAMILA JOYCE FERREIRA DE LÓCIO**

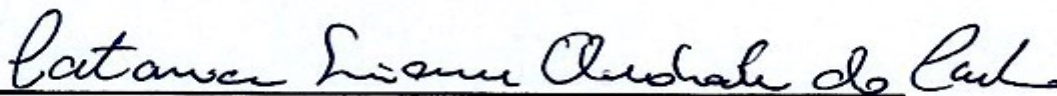
**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBIÓTICA E  
ANTIPARASITÁRIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Anadenanthera macrocarpa*.**

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

**BANCA EXAMINADORA:**



**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz**  
Orientador – (UAEBB/CDSA/UFCG)



**Professora Dra. Catarina Simone Andrade do Canto**  
Examinadora – (PPGCTA/UEPB)



**Professora Ma. Silvia Tavares Donato**  
Examinadora – UAMED/CCBS/UFCG

Trabalho aprovado em: 10 julho de 2019.

SUMÉ - PB

*Dedico este trabalho aos meus avós maternos, Francisca e Arodo (in memoriam), por serem meus maiores exemplos de determinação e força. Aos meus pais, Rita de Cássia e Geoston, por sempre acreditar e incentivar minhas escolhas, bem como aos meus irmãos, Marina e João Lucas, que são o meu abrigo de toda e qualquer hora.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e Nossa Senhora, os quais deposito a minha fé, por toda bondade e proteção o qual me envolveram em todos os dias de minha vida, por me fortalecer nos momentos em que foi difícil se reerguer e me dão a graça de concluir esse ciclo agora.

Aos meus pais, de modo especial a minha mãe, Rita de Cássia e minha avó Francisca Ferreira, por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços pra que eu pudesse concluir essa etapa, sendo sempre apoio e sustento nos momentos em que foi difícil perseguir. Essa conquista é tão minha quanto de vocês!

Aos meus irmãos, Marina e João Lucas, por todo o carinho e abrigo os quais representam. Todas as lutas enfrentadas sempre foram com a intenção de proporcionar o melhor pra vocês!

A minha família Ferreira por toda torcida, apoio e vibração a cada conquista alcançada, e Lócio, em especial aos meus avós paternos, por todo carinho e ajuda durante a graduação.

A minha família em Sumé, Janaina, Ailton e Ailton Júnior, por todo amor e zelo, carinho e proteção que representaram pra mim durante esses 5 anos de curso.

Ao professor Doutor Jean César Farias de Queiroz, pela orientação neste trabalho, pelos inúmeros ensinamentos durante anos de pesquisa, pela paciência e grandiosa contribuição para que esse trabalho fosse realizado, por toda confiança a mim depositada, lembrarei disso por toda a vida com carinho e gratidão.

Ao professor Dr. George Medeiros, pela disponibilidade em ajudar na identificação dos fungos.

Ao professor Dr. Marcelo Souza da Silva, pela oportunidade a mim concebida em realizar os testes antiparasitários no Departamento de Farmácia da UFRN.

Ao técnico Adriano Marques, por todo o auxílio dado em diversos momentos necessários para concretização deste trabalho.

A minha amiga Luana Queiroz, por todos os momentos compartilhados e por sempre ser ombro nos momentos conturbados em que precisei de um amigo, além das inúmeras vezes em que me ajudou no laboratório e por toda irmandade, a qual também incluo Eliélson, meus parceiros de projetos e de vida, cada momento vivido será sempre lembrado pelas boas risadas e momentos de superação.

A meu amigo que mora distante, Amilton, pelas inúmeras ajudas, pelos momentos de descontração em que faziam valer a pena cada encontro, eu amo você!

Aos amigos Mara, Kalem e Felipe, por toda torcida e troca de experiências, por toda alegria compartilhada com amor.

As minhas queridas colegas de graduação Kátia e Suênia, por cada momento compartilhado, estudos, risadas, por tornarem os anos que se passaram mais leves em meio a tantos momentos de aflição.

Aos meus amigos que foram verdadeiros presentes de Deus em Sumé, Humberto, Hugo, Emanuel, Rayane, Daniele, Pedro, Marcos, por serem o meu abrigo nessa cidade. Gratidão por toda doação, por me tornar família. Pra sempre lembrarei dessa cidade com carinho por vocês! Um obrigada especial a cada um!

A Isadora, por todos os anos de convívio, e tantos momentos compartilhados na graduação e na vida, bem como por tamanha contribuição nos dias de experimentos no laboratório, a qual também incluo Máгна Lima, querida colega, pela incondicional ajuda durante os experimentos.

Agradeço ao meu padrinho, Germano Filho, por todo o apoio enquanto pôde em me ajudar.

A Jonhy, por todo o conhecimento repassado, ajuda e disponibilidade, bem como a Joice, Aline, e Wendy por todo carinho e divertidos dias durante o estágio.

A Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade e experiência enriquecedora ao qual proporcionaram a minha formação acadêmica.

A todos que contribuíram direto ou indiretamente para realização desse trabalho e a minha formação.

Meu muito obrigada!

## RESUMO

Dentro da perspectiva de produção de novos fármacos que sejam mais eficazes do que os existentes, com o auxílio da biotecnologia, pesquisas realizadas com produtos naturais e seus derivados, têm se mostrado uma interessante alternativa na busca de novos medicamentos. Uma fonte inovadora para esse fim são os fungos, conhecidos por seu papel ambiental, por sua versatilidade na obtenção de metabólitos secundários e pela facilidade na reprodutibilidade de resultados. Nesse sentido, este trabalho objetivou analisar o efeito inibitório das frações purificadas de metabólitos secundários, de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*, por meio de atividade antibiótica e análise *in vitro* de ação antiparasitária em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. Para isso, foram realizadas coletas de amostras vegetais, isolamento de fungos endofíticos, produção de metabólitos secundários e purificação por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) dos melhores inibidores. O estudo da atividade antibacteriana foi realizado contra as estirpes bacterianas Gram-negativa, *Escherichia coli* e Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, a fim de identificar os melhores produtores de antimicrobianos. A atividade antiparasitária *in vitro* foi avaliada frente a cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* e a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. Dos 28 fungos obtidos, foram selecionados os isolados de N° 8 e N° 20 para purificação por meio de CLAE-FR, por apresentarem melhor atividade antimicrobiana contra ambas as bactérias. A partir desta purificação, foi novamente realizado o teste antibiograma sobre as mesmas condições, para ambas as bactérias com o extrato do Fungo de N°8 e o teste antiparasitário foi realizado com o extrato do Fungo de N° 20. Os resultados revelaram que todas as frações referentes ao extrato do Fungo N°8, identificado como *Fusarium* spp., contra bactérias, tiveram ação de amplo espectro, com inibição média das frações de 8,7mm para *E. coli* e 8,0mm de inibição para *S. aureus*, sendo possivelmente, que o extrato total apresente efeito sinérgico de vários antibióticos. Para os testes antiparasitários, as Frações 3 e 4 dos metabólitos secundários do Fungo N°20, identificado como *Aspergillus* spp., reduziram a mais de 50% a viabilidade do parasita *Leishmania*, causado pelo dano mitocondrial. A Fração 5, levou a morte de 100% dos dois parasitas em estudo, o que levanta a possibilidade de que alguns metabólitos secundários desse fungo possam ser definidos como antiparasitários.

**Palavras-chave:** CLAE-FR. *Fusarium* spp. *Aspergillus* spp. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania amazonensis*.



## ABSTRACT

In the perspective of producing new drugs that are more effective than the existing ones, with the aid of biotechnology, researches with natural products and their derivatives have been an interesting alternative in the search for new medicines. An innovative source for this purpose are fungi, known for their environmental role, their versatility in obtaining secondary metabolites and the ease of reproducibility of results. In this sense, this work aims to analyze the inhibitory effect of the purified fractions of secondary metabolites of endophytic fungi of *Anadenanthera macrocarpa*, through antibiotic activity and in vitro analysis of antiparasitic action in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. For this, plant samples were collected, endophytic fungi isolation, secondary metabolites production and purification by Reverse Phase in High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) of the best inhibitors. The study of antibacterial activity was performed against Gram-negative, *Escherichia coli* and Gram-positive, *Staphylococcus aureus*, bacterial strains in order to identify the best antimicrobial producers. In vitro antiparasitic activity was evaluated against *Trypanosoma cruzi* strain Dm28c and the *Leishmania* Amazonian promastigote form. Of the 28 fungi obtained, the isolates of N° 8 and N°20 were selected for purification by RP-HPLC, as they presented better antimicrobial activity against both bacteria. From this purification, the antibiogram test was again carried out on the same conditions, for both bacteria with the extract of Fungus N°8; the antiparasitic test was performed with the extract of Fungus N°20. The results revealed that all the fractions referring to the extract of Fungus N°8, identified as *Fusarium* spp., against bacteria, had a broad spectrum action, with a mean inhibition of the fractions of 8,7mm for *E. coli* and 8.0mm of inhibition for *S. aureus*, and possibly the total extract shows a synergistic effect of several antibiotics. For the antiparasitic tests, Fractions 3 and 4 of the secondary metabolites of Fungus N°20, identified as *Aspergillus* spp., reduced the viability of the *Leishmania* parasite caused by mitochondrial damage to more than 50%. Fraction 5 led to the death of 100% of the two parasites under study. Raising the possibility that some secondary metabolites of this fungus can be defined as antiparasitic.

**Keywords:** RP-HPLC. *Fusarium* spp. *Aspergillus* spp. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania amazonensis*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Meio de cultura Batata-Sacarose-Ágar com suas respectivas concentrações. ....	31
<b>Tabela 2</b> - Meio de cultura Ágar Mueller Hinton com suas respectivas concentrações. ....	36
<b>Tabela 3</b> - Quantidade de células viáveis obtidas pelo cultivo em meio Ágar Mueller Hinton, cultivadas por 12H. UFC: Unidades Formadoras de Colônia. ....	36
<b>Tabela 4</b> - Meio LIT com seus respectivos componentes e quantidades. ....	39
<b>Tabela 5</b> - Fungos que tiveram crescimento durante 7 dias, em meio BSA, com suas respectivas colorações e quantidade de conídios obtidos. ....	43
<b>Tabela 6</b> - Diâmetro dos halos inibitórios obtidos pelos discos contendo extratos dos fungos endofíticos, para cada cepa utilizada em estudo. ....	45
<b>Tabela 7</b> - Média $\pm$ Desvio Padrão dos diâmetros dos halos inibitórios, realizado em duplicata, obtidos através do extrato do cultivo do Fungo N° 8, purificado. ....	50
<b>Tabela 8</b> - Resultado da contagem referente ao efeito que as 4 frações analisadas, (1 - 0 a 5 mim, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), juntamente com o controle negativo, obtiveram contra os dois parasitas testados. ....	51
<b>Tabela 9</b> - Redução dos parasitas provocado pelo dano mitocondrial causada pelas frações testadas. As quatro frações do extrato de metabólitos secundários testadas (1 - 0 a 5 mim, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), e suas respectivas diluições (A – referente a 20 $\mu$ L e B – referente a 10 $\mu$ L), em triplicata contra o parasita <i>Leishmania</i> e suas respectivas porcentagens de inibição referente a Média $\pm$ Desvio Padrão. ....	53
<b>Tabela 10</b> - Resultado da contagem referente ao efeito que as 4 frações analisadas, (1 - 0 a 5 mim, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), juntamente com o controle negativo, obtiveram contra os dois parasitas testados. ....	55
<b>Tabela 11</b> - Redução dos parasitas provocado pelo dano mitocondrial causada pelas frações testadas. As quatro frações do extrato de metabólitos secundários testadas (1 - 0 a 5 mim, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), e suas respectivas diluições (A–referente a 20 $\mu$ L e B – referente a 10 $\mu$ L), em triplicata contra o parasita <i>T. cruzi</i> e suas respectivas porcentagens de inibição referente a Média $\pm$ Desvio Padrão. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. macrocarpa</i>	<i>Anadenanthera macrocarpa</i>
<b>BDA</b>	Batata-dextrose-ágar
<b>BSA</b>	Batata-sacarose-ágar
<b>BOD</b>	Biochemical Oxygen Demand
<b>CDSA</b>	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
<b>CLAE-FR</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
<b>CI50</b>	Concentração Inibitória de 50%
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>LIT</b>	<i>Liver infusion Tryptose</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>MS</b>	Metabólitos Secundários
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>UAEB</b>	Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos
<b>UAMED</b>	Unidade Acadêmica de Medicina
<b>UEPB</b>	Universidade Estadual da Paraíba
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UFCG</b>	Universidade Federal de Campina Grande
<b>UV</b>	Radiação Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>atm</b>	Atmosférico
<b>μL</b>	Microlitro
<b>min</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligramma
<b>L</b>	Litro
<b>g</b>	Gramma
<b>H</b>	Hora
<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>mM</b>	Milimolar
<b>t</b>	Tonelada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>144</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b> 7
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
3.1 BACTÉRIAS MULTIRRESSISTENTES E A NECESSIDADE DE NOVOS ANTIBIÓTICOS .....	218
3.2 DOENÇA DE CHAGAS .....	239
3.3 LEISHMANIOSE .....	23
3.5 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS .....	24
3.6 .....	<i>ANADENANTHERA</i>
<i>MACROCARPA</i> .....	274
3.7 FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	28
3.8 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	288
3.9 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA – (CLAE-FR) .....	178
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO .....	30
4.2 CONSTRUÇÃO DA COLEÇÃO DE FUNGOS DA <i>ANADENANTHERA MACROCARPA</i> .....	30
<b>4.2.1 Material botânico</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2.2 Isolamento dos fungos</b> .....	<b>30</b>
4.2.2.1 Meio BSA .....	31
<b>4.2.3 Seleção dos fungos</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.4 Coleta de conídios</b> .....	<b>322</b>
4.3 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	333

4.3.1	
<b>Cultivo.....</b>	<b>333</b>
4.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	355
<b>4.4.1 Preparo dos discos.....</b>	<b>355</b>
4.4.1.1 Meio de cultura.....	35
<b>4.4.2 Inóculo bacteriano.....</b>	<b>366</b>
<b>4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....</b>	<b>377</b>
<b>4.4.4 Coleta diferencial das frações eluídas em CLAE-FR.....</b>	<b>377</b>
<b>4.4.5 Liofilização .....</b>	<b>377</b>
<b>4.4.6 Atividade antibiograma .....</b>	<b>388</b>
<b>4.4.7 Confeção dos discos de antibiograma .....</b>	<b>388</b>
<b>4.4.8 Teste antibiograma.....</b>	<b>388</b>
4.5 CULTIVO DOS PARASITAS .....	39
4.6 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VITRO</i> .....	400
<b>4.6.1 Avaliação da viabilidade dos parasitas por ensaio colorimétrico .....</b>	<b>400</b>
4.7 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS .....	411
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>422</b>
5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA <i>ANADENANTHERA MACROCARPA</i> .....	42
2	
5.2 ENSAIO ANTIBACTERIANO COM EXTRATO BRUTO .....	444
5.3 PURIFICAÇÃO DOS MELHORES INIBIDORES .....	466
5.4 ENSAIO ANTIBACTERIANO COM AS FRAÇÕES PURIFICADAS DO FUNGO Nº8.....	49
49	
5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI- <i>LEISHMANIA</i> DAS FRAÇÕES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO FUNGO Nº20.....	51
<b>5.5.1 Análise da viabilidade de Leishmania pelo ensaio colorimétrico.....</b>	<b>522</b>

5.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI- <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> DAS FRAÇÕES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO FUNGO N°20.....	55
<b>5.6.1 Análise da viabilidade de <i>Trypanosoma cruzi</i> pelo ensaio colorimétrico.....</b>	<b>566</b>
5.7 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ENDOFÍTICOS TESTADOS.....	577
5.8 POTENCIAL FARMACÊUTICO DAS FRAÇÕES .....	59
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>600</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>611</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais fazem parte da vida humana desde a antiguidade, quando doenças e a cura das mesmas, eram tratadas com ervas a partir da cultura de comunidades tradicionais as quais viviam diretamente ligadas com a natureza.

O bioma Caatinga apresenta-se como uma fonte promissora para a descoberta de novos produtos naturais, visto que é um bioma exclusivamente brasileiro, ou seja, a maior parte do seu patrimônio biológico não é visto em nenhum outro lugar do planeta (SCHISTEK, 2012). A Caatinga é taxada como um ambiente pobre em espécies e com baixo grau de endemismo, o que certamente é reflexo do pouco conhecimento sobre a região (HAUFF, 2010). Esse bioma é imensamente heterogêneo, permitindo-nos assim desfrutar de uma vegetação bastante rica, com características únicas, capazes de possibilitar um grande avanço na ciência no país.

A *Anadenanthera macrocarpa* conhecida como Angico-Vermelho, está entre as espécies nativas mais importantes e mais exploradas na região da Caatinga, é uma árvore de porte médio a grande, sendo comum em todo o Nordeste, pode atingir de 10 a 15 metros de altura e 0,50 metros de diâmetro (DRUMOND et al., 1984). Na medicina popular, o extrato de *Anadenanthera macrocarpa* é utilizado por meio da preparação da casca para produção de soluções orais, como xaropes, usados para o tratamento de inflamações e doenças como coqueluche e bronquite, ambas causadas por bactérias que colonizam o trato respiratório (MATOS, 1997).

Praticamente todas as espécies vegetais já investigadas apresentaram microrganismos endofíticos, sendo estes fungos e bactérias, 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.

Os fungos endofíticos são frequentes fontes de produtos naturais que podem agir como antimicrobianos, inibindo ou matando uma variedade de agentes causadores de doenças nocivas, como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (STROBEL e DAISY, 2003). Além de antimicrobianos, diversos fármacos de alto valor agregado podem ser produzidos a partir de microrganismos endofíticos, extraídos de uma pequena porção de tecido vegetal, mantendo assim, a produção de compostos vitais para pessoas afetadas por inúmeras doenças (PEIXOTO et al., 2002; PRINCE, 2008).



Os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados em meio de cultura, durante o crescimento e diferenciação de um organismo vivo e têm sido isolados e caracterizados principalmente para fins industriais (DREYFUSS e CHAPELA, 1994; STROBEL, 2003). 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 possam estar na interação entre ambos (SPECIAN et al, 2014).

Os antimicrobianos são uma classe de fármacos indispensável. De fato, o aumento da resistência bacteriana, principalmente entre patógenos potencialmente perigosos, tem levado a um aumento na necessidade de novos fármacos e novas classes de antimicrobianos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade (BRITO; CORDEIRO, 2012).

As doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais pobres do planeta e representam uma crescente ameaça mundial. A malária, Doença de Chagas, tripanossomíase africana (Doença do Sono), leishmaniose e esquistossomose são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população de vários países em desenvolvimento, especialmente do continente africano (KETTER et al., 2004).

Visto essas doenças que assolam vários países do mundo, é notável a necessidade urgente e busca de novas alternativas terapêuticas no combate dessas doenças que são consideradas negligenciadas e são um problema de saúde pública nesses países.

Diante da diversidade de um bioma com características únicas, reconhecendo que possuem microrganismos com potencial para descoberta de novos compostos bioativos, faz-se necessário a busca por novas formulações e métodos que possam ser empregados para tratamento eficaz de doenças.

Dessa forma, resolvemos isolar fungos endofíticos do Angico Vermelho a fim de encontrar novos compostos bioativos, que sejam capazes de produzir efeito antibiótico de amplo espectro a fim de sanar problemas de saúde causadas por infecções bacterianas ou parasitárias, tendo em vista que se faz necessário a formulação contínua de novos medicamentos que possam oferecer um tratamento eficiente dessas infecções, visando obter extratos que

apresentem elevada eficácia, como expectativa para a produção de produtos biotecnológicos de síntese elevada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar *in vitro* o efeito inibitório das frações purificadas de metabólitos secundários, de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa*, por meio de atividade antibacteriana e atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir metabólitos secundários de fungos endofíticos, por cultivo em meio de aveia;
- Avaliar o potencial antibacteriano de extratos de metabólitos secundários, de fungos endofíticos contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, por meio de testes antibiogramas;
- Testar metabólitos fúngicos com ação antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*;
- Realizar identificação taxonômica dos melhores fungos produtores de antibióticos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E A NECESSIDADE DE NOVOS ANTIBIÓTICOS

Queiroz (2012), retrata que devido ao uso irracional de antimicrobianos e a administração empírica, vários problemas resultantes da resistência microbiana surgiram como um novo desafio para a terapêutica, causando elevados índices de mortalidade. Dentre os grupos de microrganismos relacionados a infecções resistentes destacam-se: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e a vancomicina, *Enterococcus spp.* resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e ainda as enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL).

Os organismos multirresistentes trouxeram grande preocupação para os profissionais de saúde, pois a assistência novamente está comprometida, gerando expectativas sombrias para o futuro se medidas urgentes não forem providenciadas (BRITO; CORDEIRO, 2012).

A resistência bacteriana é um problema que assola a atualidade. Há inúmeros casos na literatura que reportam a necessidade de novas classes de antibióticos que sejam capazes de solucionar essa problemática. Há décadas, o desenvolvimento de novos medicamentos ocasionou redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Mas, o uso indiscriminado de antibióticos fez com que as bactérias criassem resistência aos fármacos usados.

A elevada atividade metabólica e reprodutiva bacteriana associada a mecanismos de troca de material genético pode favorecer para que os microrganismos desenvolvam ao longo do tempo formas de resistência intrínsecas à estrutura física celular, relacionadas a eventos mutacionais e mesmo a transferência de genes de resistência aos antimicrobianos a outras bactérias (CLOETE, 2003).

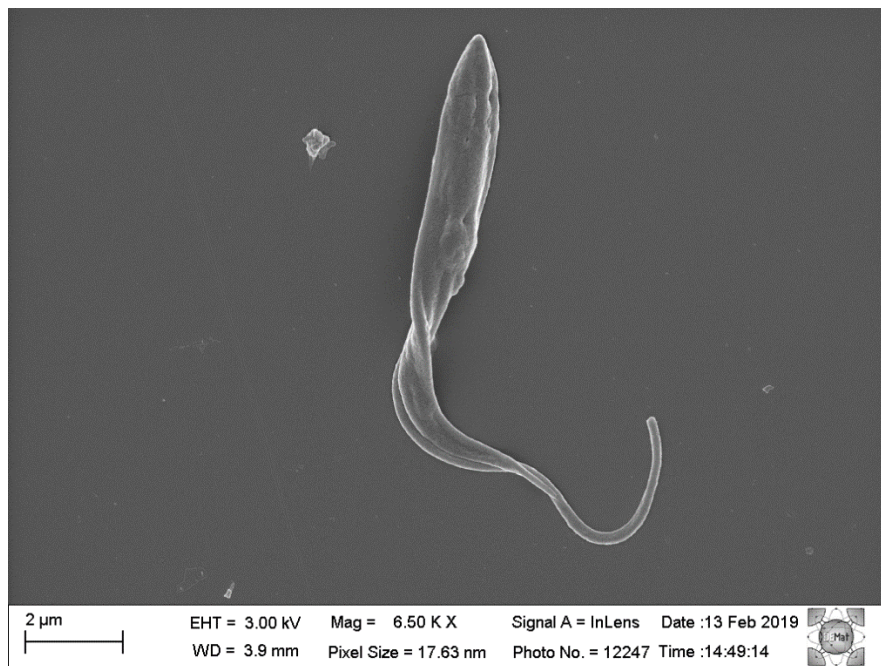
Dessa forma, a preocupação com a resistência dessas espécies aos medicamentos atualmente comercializados, faz com que novas pesquisas busquem alternativas para controlar estes microrganismos de uma forma mais eficiente e de certa forma mais econômica.

### 3.2 DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas é uma doença tropical causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (Imagem 1) considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Sua transmissão para seres humanos e outros mamíferos ocorre principalmente pelo inseto vetor, o triatomíneo conhecido popularmente como barbeiro (DNDi, 2015).

A Doença de Chagas atingiu a marca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas ao redor do mundo, ademais calcula-se que cerca de 80 milhões de pessoas possuem o risco de contraí-la, com número de mortes anuais estimado em 7 mil. No Brasil, estima-se em mais de 1 milhão de casos de pessoas infectadas pela doença (WHO, 2016).

**Imagem 1** - Microscopia eletrônica de varredura de *Trypanosoma cruzi*.



**Fonte:** Oliveira, J. W. F, 2019.

Entre a quantidade de infectados, cerca de 5 milhões encontram-se na América Latina, sendo considerada a doença parasitária que apresenta maior número de óbitos, de modo que é crescente o número de casos em países desenvolvidos como Canadá, Japão e Estados Unidos

provocados por meio de transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos provenientes de imigrantes contaminados com o parasita (DNDi, 2015).

A doença se manifesta por meio de duas fases. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática, sendo a primeira mais frequente na infância e responsável pela morte de 5% das crianças infectadas, apresentando sintomas generalistas, como febre e dores (DNDi, 2010; LOZANO et al., 2011). A infecção tem seu início quando o parasita invade o hospedeiro vertebrado, caso a forma seja sintomática, a aparição dos sintomas ocorre em média de 8 a 10 dias após a entrada do parasita na corrente sanguínea, sendo que o hospedeiro pode apresentar como sinal de infecção a Romaña ou Chagoma (COLOSIO et al., 2007; SANTOS, 2012). Os sintomas causados na fase aguda caracterizam-se por febre, mal-estar, edema facial, linfadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia que na maioria dos casos desaparece espontaneamente em quatro a seis semanas (DNDi, 2010).

A fase crônica por sua vez também pode ser dividida em sintomática ou assintomática, nesta última os quadros clínicos apresentam pouca variação dos testes clínicos, sendo esta também a forma mais predominante da doença nas áreas endêmicas e entre os doadores de sangue (MEYER et al., 2006; BARBOSA, 2009). Já na fase sintomática, a qual ocorre entre 10% a 30% dos casos, é possível apresentar complicações cardiovasculares e gastrointestinais, devido as mudanças anatômicas que estes órgãos sofrem por conta da infecção, apresentando diversos processos inflamatórios (DNDi, 2010).

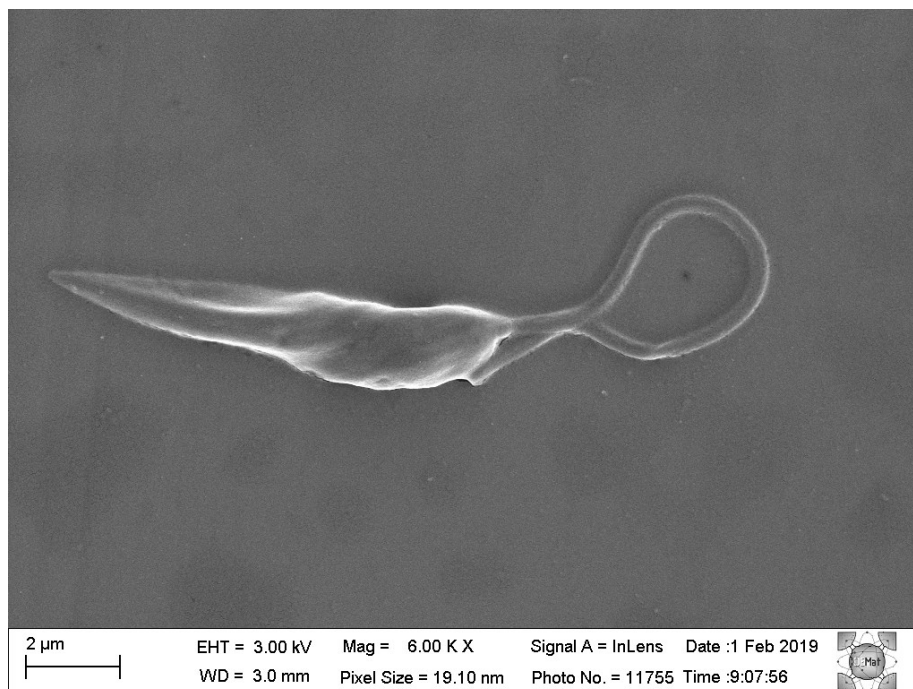
Os tratamentos empregados para a Doença de Chagas têm como base os fármacos Benzonidazol e Nifurtimox, contudo recomenda-se o tratamento para pacientes com infecção aguda ou inicial (DNDi, 2010). Apesar disso, para ambos os tratamentos existem estudos que demonstram a melhoria de qualidade de vida e prognóstico dos pacientes em fase crônica precoce e adultos infectados, especialmente aqueles sem sintomas (WHO, 2016). Contudo, as drogas possuem toxicidade dose-dependente, atingindo assim, células saudáveis, e tal fato faz com que o tratamento possua uma baixa taxa adesão dos pacientes. Além disso, a maioria das formulações são para uso pediátrico, necessitando de protocolos de adaptação (DNDi, 2010).

### 3.3 LEISHMANIOSE

Os protozoários do gênero *Leishmania* (Imagem 2), são os agentes etiológicos da leishmaniose, que incluem um amplo espectro de doenças em humanos caracterizados por lesões na pele, superfícies mucosas e em órgãos viscerais. Em todo o mundo, 10 milhões de pessoas são afetadas pela doença que causa morbidade e mortalidade significativas (MANSUETO *et al.*, 2007). *Leishmania amazonensis* é o agente causador da Leishmaniose Tegumentar Americana, com uma alta proporção de casos evoluindo para a leishmaniose cutânea difusa enérgica grave (LAISON *et al.*, 1987).

Os flebotomíneos (Diptera: *Phlebotominae*) são insetos hematófagos de importância médica e veterinária que transmitem parasitas do gênero *Leishmania*, que pertence a ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae*. Esses parasitas protozoários são os agentes causadores das leishmanioses, doenças negligenciadas que afetam as pessoas em 98 países. Eles se manifestam por diferentes sintomas clínicos, desde a forma cutânea e mucosal desfigurante até a forma visceral fatal, se não tratada. O resultado da infecção é influenciado pela virulência da cepa do parasita, mas também pelo histórico genético e estado imunológico do hospedeiro (ANTINORI *et al.*, 2012; SAVOIA, 2015).

**Imagem 2** - Microscopia eletrônica de varredura de *Leishmania*.



**Fonte:** Oliveira, J. W. F., 2019.

A incidência anual é estimada em aproximadamente 0,2-0,4 milhões e 0,7 a 1,2 milhão de casos para leishmaniose visceral e cutânea, respectivamente. Este fardo classifica a leishmaniose no nono lugar de todas as doenças infecciosas humanas, por exemplo (HOTEZ et al, 2004; ALVAR et al., 2012).

O sucesso da infecção por parasitas *Leishmania spp.* é resultado de um longo processo co-evolutivo parasita-hospedeiro e está ligado à capacidade do parasita de manipular o sistema imune do hospedeiro vertebrado em seu favor. A ação da resposta imune do hospedeiro ocorre não apenas por meio de moléculas produzidas por parasitas, mas também por moléculas de saliva do vetor, que são injetadas obrigatoriamente no local de alimentação de sangue durante a transmissão, bem como durante a alimentação não infecciosa (LESTINOVA et al., 2017).

Os medicamentos utilizados no tratamento atualmente apresentam sérios inconvenientes em termos de segurança, resistência, estabilidade e custo. Têm baixa tolerabilidade, longa duração de tratamento e são difíceis de administrar. Esses medicamentos são usados como monoterapia ou em combinação para as várias formas de leishmaniose. A exemplo, a paromomicina é uma formulação parenteral de baixo custo que requer três semanas de administração intramuscular dolorosa. Apesar de ser altamente eficaz na Ásia, está associada a algum grau de insuficiência renal e ototoxicidade (toxicidade para o ouvido); antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio – SSG – e antimoniato de meglumina) são utilizados para leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV) por mais de 60 anos. Tem sido relatada resistência adquirida, principalmente em áreas de alta prevalência e alta transmissão. Está bem documentada a cardiotoxicidade grave que leva à morte dos indivíduos (DNDi, 2018).



### 3.4 NECESSIDADE DE NOVOS ANTIPARASITÁRIOS

Há uma preocupação em buscar novos fármacos para o tratamento de doenças antiparasitárias, que se torna necessário cada vez mais, em virtude da toxicidade dos já existentes e do aumento da resistência do parasita, o que representa uma ameaça ao controle da doença.

É relatado que menos de 10% das pessoas com Doença de Chagas nas Américas são diagnosticadas, e somente cerca de 1% das que têm a doença recebe tratamento antiparasitário. Os medicamentos atuais, descobertos há meio século, são eficazes durante a fase aguda e o início da fase crônica da Doença de Chagas. Para *Leishmanias*, estima-se que a cada ano entre 50 mil e 90 mil pessoas são infectadas com LV (Leishmaniose visceral), a forma letal da doença, sendo mais de 90% no Brasil, Etiópia, entre outros países; entre 600 mil e 1 milhão de pessoas por ano são infectadas com LC (Leishmaniose cutânea), sendo 70% também no Brasil, Afeganistão, Irã, entre outros países. Os pacientes sentem os graves efeitos colaterais dos medicamentos, além de tolerar esquemas de tratamento que requerem hospitalização ou dolorosas injeções por vinte a trinta dias (DNDi, 2018).

É notável a real necessidade de novos compostos que possibilitem a descoberta de novos medicamentos, para que essas doenças não se tornem um problema ainda maior de saúde pública, visto que isso é um problema que preocupa de forma direta o mundo inteiro.

### 3.5 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

Produtos naturais são explorados há muitos anos e as plantas sempre representaram a principal fonte natural de produtos usados na medicina popular (STROBEL et al., 2004).

A utilização de produtos naturais pela humanidade remota às sagradas escrituras e ao Papiro de Ebers que enumera cerca de 100 doenças e descreve inúmeros fármacos de origem vegetal e animal (PINTO et al., 2002). Há diversos registros de espécies como, por exemplo, a papoula (*Papaver somniferum*) que tem importância comprovada como planta com poder analgésico com ação primária sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Seu princípio ativo é a morfina isolada pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm, em 1816, como sendo uma

substância cristalina e insolúvel em água (DUARTE, 2005). Posteriormente em 1923 teve sua estrutura determinada por Robinson e Gulland, sendo sintetizada somente em 1952, por Gates e Tschude. Depois de estabelecida a estrutura química dos derivados naturais do ópio, vários outros compostos farmacologicamente ativos foram descobertos, a saber, o derivado 4-fenilpiperidínicos como uma nova classe de hipnoanalgésicos de emprego mais efetivo e seguro (BARREIRO, 1990).

Moléculas como a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) extraídas da *Catharrantus roseus* e o taxol extraído da casca da *Taxus brevifolia*, são exemplos de fitoterápicos para o tratamento do câncer inseridos na fitoterapia nos últimos 20 anos. Estudos sobre a viabilidade econômica e sustentável de obtenção do taxol surgiram em decorrência da escassez da fonte natural, tendo em vista que, para produzir 1 kg de taxol seriam necessários 10 t de cascas de *T. brevifolia*, ou seja, 3000 árvores. Diante disso iniciou-se a busca por fontes alternativas e naturais para obtenção do taxol. Mais tarde surgiram os primeiros relatos de novas fontes de outros taxanos, como a Bacatina III encontrada em outra espécie de *Taxus* com concentrações 5 vezes maior que a encontrada inicialmente. Recentemente, um grupo da *Montana State University* obteve o taxol a partir de fungos endofíticos isolados das cascas da *T. brevifolia* (VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

Em um estudo realizado por Newman e Cragg (2016) analisando os agentes terapêuticos aprovados nos últimos 34 anos (1981 – 2014), observaram que aproximadamente 30% dos medicamentos utilizados em países industrializados são obtidos de plantas ou derivados dos metabólitos secundários das plantas. Na área do câncer, ao longo dos anos entre 1940 e 2014, das 175 pequenas moléculas aprovadas, 85 ou 49% dos medicamentos anticancerígenos são obtidos de produtos naturais ou derivados diretamente destes. Dessa forma, mesmo existindo outros métodos de descoberta de medicamentos, os produtos naturais ainda mostram serem bastante promissores na busca de novos fármacos.

### 3.6 ANADENANTHERA MACROCARPA

A *A. macrocarpa* conhecida como Angico Vermelho está entre as espécies nativas mais importantes e exploradas da Caatinga, é uma árvore de porte médio a grande, sendo comum em todo o Nordeste, podendo atingir de 10 a 15 metros de altura e 0,50 metros de

diâmetro (DRUMOND; PIRES; BRITO, 1984). Possui uma madeira de cor vermelha que apresenta alta densidade resistente ao esmagamento, copa ampla ou reduzida, tronco reto, e cascas marrom-claras, inflorescência alva, as flores são brancas e pequenas florescendo a partir de novembro até janeiro. Seus frutos são uma vagem comprida e estreita de superfície rugosa e cor castanho-avermelhada com maturação ocorrendo entre julho e agosto. Cada fruto possui de 8 a 15 sementes com cerca de 2 cm de diâmetro, com coloração castanho a pardo-avermelhadas, escuras, arredondadas, brilhantes e achatadas. É uma espécie com grande importância regional devido ao seu uso para a construção rural, de caibros, vigas, postes e ainda lenha e carvão de boa qualidade. Tais características fazem dela uma planta de uso intensivo e até industrial, colocando-a entre o grupo de espécies nativas do semiárido com risco de extinção, apesar da sua fácil adaptação a diversos ambientes (DRUMOND, 1982; SILVA, 2011).

O Angico Vermelho é uma espécie vegetal endêmica da Caatinga. A Caatinga apresenta uma área de aproximadamente 844,453 km<sup>2</sup> correspondendo a 11% do território Brasileiro, é o principal ecossistema existente no Nordeste com clima semiárido, ocupando 10 Estados: Bahia (54%), Ceará (100%), Piauí (63%), Pernambuco (83%), Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Sergipe (49%), Alagoas (48%), Maranhão (1%) e Minas Gerais (2%) (IBGE, 2004). O nome Caatinga originário do tupi-guarani, significa mata branca devido a sua paisagem esbranquiçada característica da vegetação durante a seca em que grande parte das plantas perdem suas folhagens e os seus troncos tornam-se esbranquiçados e secos. É um bioma exclusivamente brasileiro, ou seja, a maior parte do seu patrimônio biológico não é visto em nenhum outro lugar do planeta (SCHISTEK, 2012).

O gênero *Anadenanthera* pertence à família *Fabaceae* e a subfamília *Mimosoideae*. O gênero foi inicialmente proposto por Brenan (1955) e Reis Altschul (1964, 1967), e consistia de quatro espécies, anteriormente incluídas como seção *Niopa* do gênero *Piptadenia* devido as suas semelhanças morfológicas. Mais tarde em 1964, o pesquisador Siri Von Reis Altschul em sua revisão taxonômica do gênero considerou que este é composto de apenas duas espécies, *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, cada uma delas contendo duas variedades (WEBER et al, 2011). É conhecida popularmente como: Angico, Angico Branco, Angico Preto, Angico Vermelho, Angico de Casca, Arapiraca e Cambuí-Angico (SILVA, 2011).

O angico se tornou uma das plantas mais utilizadas em crenças nas tribos indígenas da América do Sul. No Brasil, a espécie era chamada de Kurupá pelos índios Tupí-Guaraní, Aimpê e Aimpã pelos índios da tribo Tupari. (SILVA, 2011). Tribos indígenas brasileiras utilizam o angico em suas cerimônias místico-religiosas, tal fato despertou a curiosidade de pesquisadores sobre os possíveis efeitos narcóticos relacionados a essa espécie vegetal. Os índios utilizavam as sementes torradas e pulverizadas, constatou-se que as sementes são ricas em alcaloides (TORRES; REPKE, 2006).

Dessa planta ainda é possível utilizar o exsudato gomoso, conhecido como “goma arábica”, a mesma é utilizada pela indústria e também contra infecções pulmonares. O exsudato gomoso consiste de um complexo heteropolissacarídeo composto principalmente por moléculas de galactose e arabinose, denominada de aragal. Estudos *in vitro* com macrófagos tratados por 18H com aragal na concentração de 100mg/kg foram capazes de destruir 180 células de Sarcoma (S-180), mostrando assim atividade antitumoral, com inibição tumoral de 63% para tumores sólidos (ARRUDA, 2008).

Espécies da Caatinga foram testadas quanto a suas atividades antimicrobianas, entre as espécies estudadas extratos da casca do caule da *Anadenanthera* mostraram ação contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para os extratos derivados do galho apresentaram ação contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e para os extratos da folha apresentaram ação contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os microrganismos sensíveis aos extratos vegetais testados apresentaram halos de pelo menos 10 mm de diâmetro em testes de difusão em disco (CABRAL, 2014).

Partindo desse pressuposto, podemos sugerir que estudos realizados com espécies vegetais de diferentes biomas, principalmente aqueles poucos explorados e que apresentem extremas condições ambientais, são promissores na busca por novas moléculas.

### 3.7 FUNGOS ENDOFÍTICOS

A descoberta acidental da penicilina a partir do fungo filamentosso *Penicillium notatum* se deu por Fleming, em 1929, dando início a diversos estudos com novos agentes bioativos como fonte promissora de produtos naturais.

Os microrganismos (fungos, bactérias entre outros) desempenham um papel fundamental na produção de novos produtos naturais. Os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de espécies vegetais habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas. Foram primeiramente descritos por De Bary (1866) distinguindo-os dos patógenos por serem assintomáticos, sem causar nenhum dano ao hospedeiro. Atualmente sabe-se que microrganismos endofíticos são capazes de produzir toxinas, antibióticos e muitos outros produtos de interesse biotecnológico, além de promover proteção à planta (AZEVEDO, 1998).

A colonização de espécies vegetais por fungos endofíticos pode ocorrer horizontalmente por meio de lesões naturais, como crescimento das raízes e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. Outro modo de infecção é a vertical que ocorre pelas sementes do hospedeiro. A maneira que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro, a interação mutualística é predominante na transmissão vertical, enquanto que a interação trófica (parasitismo) é predominante na transmissão horizontal (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

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 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 possam estar na interação entre ambos (SPECIAN et al, 2014).

### 3.8 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Um grupo de microrganismos que tem se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos é o dos endófitos, especialmente os fungos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia. Esses microrganismos têm estimulado o interesse da comunidade científica, devido à produção de metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia e farmacêutica (STROBEL et al., 2003).

As principais classes de compostos derivados do MS (metabolismo secundário) de plantas são: Taninos, Flavonoides, Óleos Essências, Alcaloides, Cumarinas, Antraquinonas e Saponinas (SIMÕES et al., 2010). Alcaloides produzidos por fungos endofíticos podem conferir resistência especialmente a espécie de gramíneas forrageiras contra animais herbívoros como também sintetizar substâncias tóxicas a mamíferos. Em alguns casos, plantas consideradas tóxicas são, na verdade, hospedeiras desses microrganismos produtores de alcaloides, sendo essas substâncias responsáveis por intoxicação em animais silvestres, que ingerem tais plantas, provocando anorexia e prejuízos para pecuaristas, pois provocam intoxicações em ruminantes afetando o seu desempenho e podendo levar até a morte destes (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002).

Devido a sua complexa estrutura química, os metabólitos secundários podem alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas (GOMES, 2014). Diversos metabólitos secundários de fungos produziram alguns dos mais importantes produtos da indústria farmacêutica, a exemplo de agentes antibacterianos como os das classes das penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, agentes imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina a partir de *Streptomyces sp.*, redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina a partir de *Penicillium sp.* e anti-helmínticos e antiparasitários, como ivermectinas a partir de *Streptomyces sp.* (CRAGG; NEWMAN, 2005).

### 3.9 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA – (CLAE-FR)

O nome Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi empregado para denominar novos procedimentos, que utilizavam equipamentos sofisticados a altas pressões

(SKOOG, 2002). As vantagens da CLAE, são a resolução e eficiência alcançadas; alta reprodutibilidade, possibilidade de automação, reutilização das colunas sem necessidade de regeneração e diminuição do tempo de análise (HAMILTON, 1978).

Um sistema de CLAE é composto por um sistema de reservatório de solvente, uma bomba, um injetor de amostra, uma coluna, um detector e um computador com software de aquisição e processamento de dados (CLEMENTINO, 2014).

Atualmente, a CLAE é considerada a técnica mais empregada na indústria química, mas suas aplicações se estendem a muitas outras áreas. Na indústria farmacêutica é indispensável no controle de qualidade desde a matéria-prima até o produto final. Em laboratórios de controle ambiental, é utilizada para monitorar e analisar pesticidas e outros contaminantes em água e solo. Na indústria alimentícia é usada para controle e determinação de toxinas e quantificação de nutrientes mesmo na presença de aditivos. Isso sem contar as suas aplicações na área médica, investigações forenses e, desde o final da década de 1980, na área esportiva em exames *anti-dopping* (CHAUDHRY, 2005). A CLAE é, portanto, um método bastante seletivo e requer tempos de análise curtos, pequena quantidade de amostra a ser analisada, apresentando também uma grande sensibilidade de detecção (GOMES, 2010).

Sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (EDIVAN et al., 2001).

As técnicas cromatográficas têm se mostrado de grande valor ao que se refere à separação, isolamento e purificação de compostos. Essa técnica possibilita purificar compostos os quais serão testados isoladamente contra bactérias e parasitas, com intenção de descobrir novos fármacos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Os experimentos iniciais até os testes antibiogramas, foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Unidade Acadêmica de Biotecnologia e Bioprocessos (UAEB), localizado no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, Paraíba. Os testes de ação antiparasitária foram realizados no Laboratório de Imunoparasitologia, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

### 4.2 CONSTRUÇÃO DA COLEÇÃO DE FUNGOS DA *ANADENANTHERA MACROCARPA*

#### 4.2.1 Material botânico

As coletas dos materiais vegetais da *Anadenanthera macrocarpa* foram realizadas nas mediações do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG/CDSA) – Sumé, região que envolve o bioma Caatinga (Imagem 3). As amostras vegetais coletadas foram levadas ao Laboratório de Biotecnologia, submergidas em álcool 70% para esterilização e limpeza.

#### 4.2.2 Isolamento dos fungos

As amostras vegetais coletadas foram cortadas em pequenos fragmentos e colocadas em placas de Petri (previamente autoclavadas), contendo meio ágar-sacarose-batata (BSA), para obtenção de fungos endofíticos. As placas de Petri contendo o meio BSA e as amostras, foram inoculadas e incubadas em estufa, por 96 horas, a 24°C.



**Imagem 3** - Localização da área do CDSA. As setas vermelhas representam o local de coleta das partes vegetais da planta.



**Fonte:** Geoprocessamento M.S., 2019.

#### 4.2.2.1 Meio ágar-sacarose-batata (BSA)

As partes vegetais coletadas foram inoculadas em meio ágar-sacarose-batata, nas proporções descritas na Tabela 1. O meio foi distribuído em frascos erlenmeyers de 500mL e autoclavados a 121°C e 1atm, por 20 minutos; logo após, foi adicionado antibiótico Amoxicilina (1g/L), a fim de inibir o crescimento bacteriano.

**Tabela 1** - Meio de cultura Batata-Sacarose-Ágar com suas respectivas concentrações.

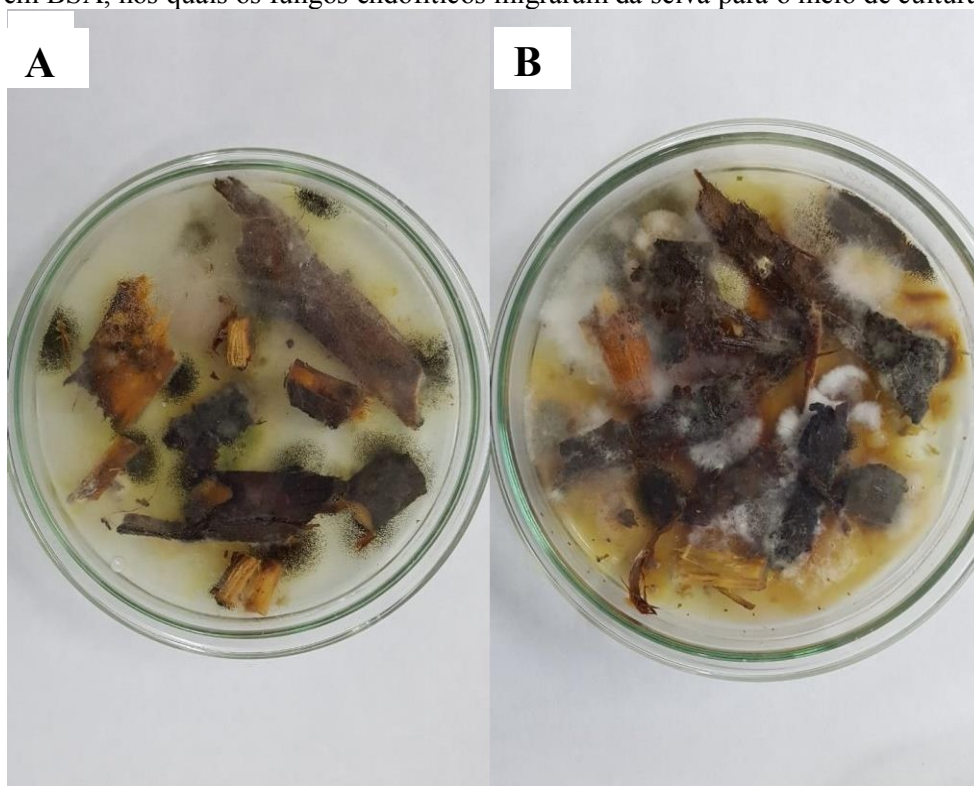
COMPONENTE	QUANTIDADE
Ágar	5g
Sacarose	20g
Batata	100g
Água destilada	q.s.p.* 1000 mL

**Fonte:** Autora, 2019.

### 4.2.3 Seleção dos fungos

Após o período de incubação, os fungos que cresceram na placa de Pétri (Imagem 4), em um total de 28 fungos fenotipicamente diferentes, foram isolados e recultivados a fim da obtenção de colônias puras, as quais foram consideradas como fungos endofíticos.

**Imagem 4** - Placas de Petri (A e B) contendo explantes dos galhos do Angico Vermelho, inoculados em BSA, nos quais os fungos endofíticos migraram da seiva para o meio de cultura.



**Fonte:** Autora, 2019.

### 4.2.4 Coleta de conídios

Nos fungos isolados, recultivados em BSA (Imagem 5), foram adicionados 3mL de solução, (4,5g de NaCl, 500 $\mu$ L de detergente aniônico puro, q.s.p. 500mL de água destilada), sobre a placa, seguido de uma leve raspagem no sobrenadante a fim de soltar os conídios. O líquido obtido foi armazenado em tubos plásticos cônicos estéreis e identificados por

etiquetas. A cada solução foi realizada diluição 1:10 (10uL + 90uL de água destilada) para posterior contagem de esporos na Câmara de Neubauer.

**Imagem 5** - Fungos endofíticos isolados crescendo em BSA.



**Fonte:** Autora, 2019.

### 4.3 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

#### 4.3.1 Cultivo

Para a obtenção de metabólitos secundários, foi semeado 2mL de uma solução contendo  $1 \times 10^7$  conídios em salina, em potes de vidro contendo meio de aveia, composto por 5g de aveia comercial, homogeneizado em 15 mL de água destilada, por recipiente, autoclavados por 1h, à 121°C, 1 atm, acondicionados em estufa de cultivo, a uma temperatura de 37°C, pelo período de 7 dias (Imagem 6).



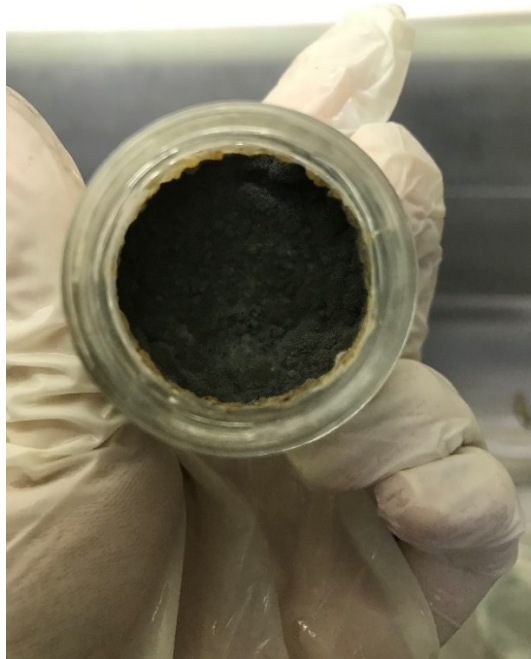
**Imagem 6** - Frascos com fungos endofíticos do Angico Vermelho isolados e inoculados no cultivo em meio de aveia, para produção de metabólitos secundários.



**Fonte:** Autora, 2019.

Após o período de sete dias (168h), foi adicionado a cultura em aveia (Imagem 7) 15 mL de clorofórmio 99,8% para extração dos metabólitos secundários destes fungos.

**Imagem 7** - Fungos cultivados em meio de aveia por 7 dias.



**Fonte:** Autora, 2019.

Todo o material coletado foi colocado em tubos plásticos cônicos, e centrifugado por 15 minutos, a 2000Xg, seguido de filtração dos compostos com o auxílio de uma bomba a vácuo. Passado esse processo, os extratos foram transferidos para potes de vidro e submetidos a secagem (em estufa a 27°C), do clorofórmio. Seguida a secagem, foi adicionado 1mL de clorofórmio nos extratos e armazenados em tubos plásticos cônicos de 1,5 mL (identificados) e colocados sob refrigeração.

#### 4.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

##### 4.4.1 Preparo dos discos

Os discos de papel de filtro foram confeccionados conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (1988), com algumas adaptações. Foram confeccionados com furador de papel e papel filtro devidamente esterilizados. Em cada disco de papel filtro foi adicionado três alíquotas de 10 µL do extrato obtido da extração por solvente, o processo era repetido após a absorção completa do extrato.

A fim de comparar o potencial antibacteriano dos metabólitos produzidos com um antibiótico de amplo espectro, foram adicionados nos discos de papel 50µL de amoxicilina 500mg (macerado em gral com pistilo e diluído em 3mL de metanol), resultando em discos para antibiograma contendo 8,3mg de amoxicilina para o teste antibacteriano como controles positivos e discos contendo apenas o metanol, adicionado em cada disco na mesma quantidade, como controle negativo.

##### 4.4.1.1 Meio de cultura

O teste de antibiograma é comumente utilizado para identificar substâncias com ação antimicrobiana. O meio de cultura usado no teste antibacteriano foi o Ágar Mueller-Hinton (Tabela 2), comumente utilizado em testes de suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos aeróbicos de rápido crescimento pela técnica de difusão em disco. O meio

(36g/L), foi distribuído em Erlenmeyers seguidos por autoclavagem durante 15 minutos, a 121°C, 1 atm, em seguida, vertido cerca de 20 mL em placas de Pétri (Tabela 2).

**Tabela 2** - Meio de cultura Ágar Mueller-Hinton com seus componentes e suas respectivas concentrações.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Infusão de carne	2,0 g/L
Ácidos casamínicos	17,5 g/L
Amido	1,5 g/L
Ágar	15,0 g/L
pH	7,03 a 25 °C
Água destilada	q.s.p 1L

**Fonte:** Autora, 2019.

#### 4.4.2 Inóculo bacteriano

Para o preparo da Solução Inicial, foi retirada uma pequena quantidade da cepa bacteriana com o auxílio de uma alça de platina, previamente flambada, e inseridas em 3mL de solução salina (0,9%). Inoculou-se em meio Ágar Mueller Hinton, 1mL da diluição ( $10^6$  células/mL), e incubou-as em estufa de crescimento BOD (Biochemical Oxygen Demand) por 12 horas a 37°C. Em seguida, procedeu-se à contagem das colônias a fim de quantificar as células viáveis (resultado disposto na Tabela 3).

**Tabela 3** - Quantidade de células viáveis obtidas pelo cultivo em meio Ágar Mueller Hinton, cultivadas por 12h.

CEPA	UFC/mL x $10^9$
<i>Escherichia coli</i>	8,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	24,6

UFC: Unidades Formadoras de Colônia. **Fonte:** Autora, 2019.

#### **4.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa**

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando coluna de Fase Reversa (CLAE-FR), foi realizada no laboratório de biotecnologia CDSA-UFCG.

A coluna utilizada foi a PerkinElmer C18 (150mm x 4.6mm) em um cromatógrafo PerkinElmer, modelo Série 140614P. Para isso, foi programado um gradiente de água deionizada (solvente A), e metanol (solvente B), a um fluxo de 1 mL/min, onde foi passado um Volume de Coluna (5 min) em 100% de A. O gradiente de Metanol, executado por bomba quaternária, foi crescente de 5 minutos (0%) até 100% de metanol, em 25 min, seguido de uma lavagem da coluna com 100% de metanol por 1min, com leitura do eluído em 280nm, em um detector UV-Vis.

#### **4.4.4 Coleta diferencial das frações eluídas em CLAE-FR**

As amostras utilizadas dos extratos em clorofórmio do Fungo N° 8 (utilizado no ensaio de atividade antimicrobiana) e do Fungo N° 20 (utilizada no ensaio de atividade antiparasitária), foram secas em estufa a 37°C, diluídas em Metanol e filtradas em filtro de seringa em nylon, com poro de 0,22 µm.

As frações foram estabelecidas por períodos de tempos fixos determinado de 0 a 5min, 5 a 10min, 10 a 15min, 15 a 20min e 20 a 25min, analisadas no processo de purificação, foram coletadas separadamente e, em seguida congeladas por um período de 10 horas em ultrafreezer a -50°C. A fração 20 a 25min, foi diluída na proporção 2:1 com água destilada, pois apresentou alto teor de metanol, impossibilitando o congelamento da amostra a -50°C.

#### **4.4.5 Liofilização**

O material previamente solidificado foi submetido a condições de pressões muito baixas, pela técnica de liofilização, que se utiliza da remoção de água através da sublimação para secagem das amostras purificadas. Passadas 72H, os frascos foram retirados e as

amostras foram recuperadas com 2 mL de metanol e água em uma diluição 1:1, submetidas a congelamento -50°C e posterior liofilização por 12h.

#### **4.4.6 Atividade antibiograma**

Os testes antibacterianos foram realizados com duas linhagens de cepas bacterianas, uma Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e a outra Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922). As linhagens bacterianas foram conservadas em meio de cultura Infusão de Cérebro Coração em Ágar (BHIA).

As frações purificadas foram enumerados por 1, 2, 3, 4, e 5 (frações de 0 a 5min, 5 a 10min, 10 a 15min, 15 a 20min e 20 a 25min, respectivamente) e ressuspensas em 120 µL de metanol.

#### **4.4.7 Confeção dos discos de antibiograma**

Os discos foram confeccionados com furador de papel e papel filtro (todos esterilizados). Em cada disco de papel filtro foi adicionado um total de 30 µL do extrato do Fungo de N°8 purificado. Para comparação do potencial antibacteriano dos metabólitos produzidos, foram adicionados 50µL do antibiótico amoxicilina 500mg (macerado em graal com pistilo e diluído em 3mL de metanol), resultando em discos para antibiograma contendo 8,3mg de amoxicilina para o teste antibacteriano como controles positivos e discos contendo apenas o metanol, adicionado em cada disco na mesma quantidade, como controle negativo.

#### **4.4.8 Teste antibiograma**

O teste antibacteriano foi realizado em triplicata para cada cepa de microrganismo testado, com controle positivo e negativo em cada ensaio. Para utilização de  $1 \times 10^7$  de Unidade Formadora de Colônia (UFC), foi retirado 40,65µL da Solução Inicial de *S. aureus* e 113,63µL da Solução Inicial de *E. coli*, diluídos em 959,35µL e 888,37µL de solução



salina, respectivamente. Foi semeado 1 mL de cada solução (diluição realizada anteriormente), em meio ágar Mueller Hinton aguardando a secagem pra posterior adição dos discos. Após adição dos discos contendo os extratos obtidos, as placas foram identificadas e incubadas em estufa, a 37°C, por 12 horas.

#### 4.5 CULTIVO DOS PARASITAS

Os parasitas foram obtidos juntos a Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A cepa Dm28c de *Trypanosoma cruzi* foi cultivada em meio LIT (*Liver infusion Tryptose*), (Tabela 4), em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (v/v) e 5% de antibiótico streptomomicina/penicilina 100UI/mL. Foram utilizadas as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

**Tabela 4** - Meio LIT com suas respectivas quantidades e componentes.

COMPONENTE	QUANTIDADE
NaCl	0,4g
KCl	0,04g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8g
Dextrose	0,2g
Tryptose	0,5g
Caldo de fígado	0,3g
Hemina	1 mL (1% de hemina [ 2,5mg/mL])
SFB	10mL (10%)
Água destilada	completar o volume para 100 mL

**Fonte:** Autora, 2019.

Já a *Leishmania amazonensis*, na forma promastigota, foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (v/v) e 5% de antibiótico streptomomicina/penicilina.

Ambos os cultivos foram mantidos à 27°C. Os parasitas utilizados ficaram em cultivo no período de 5 a 7 dias para obtenção da fase log promovendo uma alta concentração de parasitas para os testes ( $1 \times 10^7$  ou  $1 \times 10^8$  células) a realizar.

#### 4.6 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VITRO*

Para o ensaio de atividade antiparasitária, foram testadas 4 Frações do extrato de metabólitos secundários, descritos como Fração 1 (0 a 5 min), Fração 3 (10 a 15 min), Fração 4 (15 a 20 min) e Fração 5 (20 a 25 min), purificados em HPLC (High Performance Liquid Chromatography), correspondente ao Fungo N° 20, solubilizados em 200µL de meio de cultura para os testes.

Para tal atividade, como os parasitas se encontram com concentração elevada, é realizada a diluição (cada parasita com o meio de cultura adequado) 1:10 para facilitar na realização de contagem na câmara de Neubauer, sendo os parasitas utilizados na concentração de  $1 \times 10^7$ . Essa diluição, utilizando apenas meio de cultura, ou seja, sem tratamento, foi usada como controle negativo.

Foram utilizadas placas de 96 poços, cada poço com um total de 200µL do tratamento aplicado, em um sistema de triplicata. Foi adicionado aos poços da primeira triplicata, 20µL das frações dos metabólitos secundários a serem testados, e 10µL das frações nos poços abaixo (foram utilizadas duas diluições por não sabermos a concentração exata do composto testado). Em seguida, foram analisadas a viabilidade dos parasitas no período de 24 horas, após o tratamento.

##### 4.6.1 Avaliação da viabilidade dos parasitas por ensaio colorimétrico

Para avaliar a viabilidade dos parasitas foi realizado o ensaio de redução da resazurina (Sigma-Aldrich), em microplacas de 96 poços, que consistiu na aplicação de 20 µL de resazurina na concentração de 3mM para *Leishmania amazonensis* e 1mM para *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28c, em todos os poços para o período de testes das frações. Este processo de redução da resazurina é feito incubando por 24 horas após aplicação e em seguida foi

realizado a leitura no leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) utilizando os comprimentos de onda 570 e 600nm (CORRAL *et al.*, 2013). O cálculo do percentual de inibição se deu a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - ((A570t - (A600t \times RO)) / (A570c - (A600c \times RO))) * 100$$

A570t = Absorção do tratamento no comprimento de onda 570nm.

A600t = Absorção do tratamento no comprimento de onda 600nm.

A570c = Absorção do controle no comprimento de onda 570nm.

A600c = Absorção do controle no comprimento de onda 600nm.

RO = Fator de correção do Meio interagindo com a resazurina, sendo obtido pela seguinte fórmula:

$$RO = C_{meio570nm} / C_{meio600nm}$$

Cmeio570nm = Absorbância do meio no comprimento de onda de 570 nm.

Cmeio600nm = Absorbância do meio no comprimento de onda de 600 nm.

#### 4.7 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS

A identificação das duas espécies fúngicas que se apresentaram como melhores produtores de atividade antimicrobiana, foi realizada pelo método da fita adesiva, que se utiliza de um fragmento de fita adesiva fixado sobre a colônia esporulada (do fungo cultivado por 7 dias) e, após fixação em uma lâmina de microscopia, ocorre análise em microscópio óptico. Realizada a análise morfológica das colônias, houve comparação das imagens obtidas com a literatura especializada.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *ANADENANTHERA MACROCARPA*

Foram obtidos vinte e quatro fungos fenotipicamente diferentes, a partir das placas inoculadas com os fragmentos dos galhos do Angico Vermelho. A partir disso, foram realizadas análise de sua velocidade de crescimento em meio BSA, além da coloração e quantidade de conídios produzidos, dispostos na Tabela 5.

Os fungos de coloração branca (branco gelo e branco neve) demonstraram crescimento rápido em meio BSA, tomando cerca de 50% da placa em quatro dias. Os fungos pretos apresentaram crescimento pouco inferior ao branco, enquanto os de coloração verde apresentaram crescimento lento, visto que não tomaram toda a placa durante os 7 dias de cultivo.

Os trabalhos envolvendo endofíticos da *A. macrocarpa* são escassos, mas não inexistentes. Dentre esses podemos citar Silva et al (2018), que coletou fungos endofíticos de algumas espécies vegetais da Caatinga e testou suas atividades antimicrobianas. E também Cavalcanti (2017), que coletou no Cariri Paraibano, cascas de diversas espécies de plantas, incluindo a *Anadenanthera colubrina* Vell., conseguindo isolar um total de 16 fungos endofíticos, sendo que 5 dessas linhagens foram isoladas do Angico, para produção de tanase. O fungo associado ao Angico foi identificado como *Aspergillus niger* ANG18 (sigla indica a linhagem específica) sendo um dos responsáveis por apresentar maior produção de tanase.

**Tabela 5** - Fungos que tiveram crescimento durante 7 dias, em meio BSA, com suas respectivas colorações e quantidade de conídios obtidos.

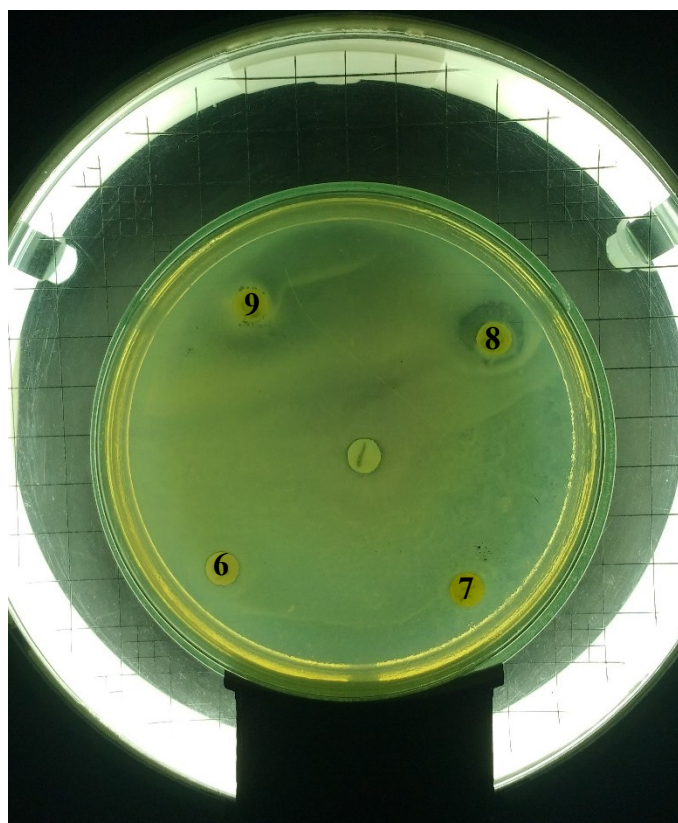
FUNGO	COLORAÇÃO	QUANT. DE CONÍDIOS
1	Branco	$8,4 \times 10^7$
2	Branco	$4,7 \times 10^7$
3	Branco	$9,0 \times 10^7$
4	Branco	$3,3 \times 10^7$
5	Branco	$3,9 \times 10^7$
6	Branco gelo	$1,2 \times 10^7$
7	Branco gelo	$6,3 \times 10^7$
8	Vermelho	$9,0 \times 10^7$
9	Chartreuse	$4,7 \times 10^7$
10	Verde escuro	$2,2 \times 10^7$
11	Chartreuse	$3,8 \times 10^7$
12	Branco	$1,4 \times 10^7$
13	Chartreuse	$6,9 \times 10^7$
14	Branco gelo	$2,4 \times 10^7$
15	Chartreuse	$1,1 \times 10^8$
16	Branco gelo	$6,0 \times 10^7$
17	Preto	$1,5 \times 10^7$
18	Branco	$5,0 \times 10^7$
19	Verde água	$7,8 \times 10^7$
20	Chartreuse	$3,3 \times 10^7$
21	Verde escuro	$2,9 \times 10^7$
22	Chartreuse	$1,7 \times 10^7$
23	Verde escuro	$1,1 \times 10^7$
24	Branco	$1,7 \times 10^7$
25	Verde	$4,9 \times 10^7$
26	Preto	$1,2 \times 10^8$
27	Verde	$8,7 \times 10^7$
28	Verde	$6,2 \times 10^7$

**Fonte:** Autora, 2019.

## 5.2 ENSAIO ANTIBACTERIANO COM EXTRATO BRUTO

A atividade antimicrobiana dos extratos foi efetuada por meio de medições dos halos de inibição dos crescimentos bacterianos com o auxílio de uma régua milimetrada e comparados com o controle positivo. A Imagem 8 mostra os halos de inibição do controle (central) e dos extratos.

**Imagem 8** - Halos de inibição para a cepa *S. aureus*, correspondente aos extratos dos fungos endofíticos de numeração 6, 7, 8 e 9, juntamente com o disco de controle negativo.



**Fonte:** Autora, 2019.

Os respectivos diâmetros obtidos de cada halo, de cada extrato fúngico, para ambas bactérias, estão dispostos na Tabela 6.

Segundo Duffy (2001), a menor atividade observada em bactérias Gram-negativas seria pelo fato dessas bactérias apresentarem em sua parede celular uma membrana mais externa, que estaria impedindo a entrada de numerosas moléculas de antibióticos e o espaço

periplasmático conter enzimas, que são capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas no meio.

**Tabela 6** - Diâmetro dos halos inibitórios obtidos pelos discos contendo extratos dos fungos endofíticos, para cada cepa utilizada em estudo.

ESPÉCIME FÚNGICA	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
1	-	6 mm
2	4 mm	-
3	4 mm	6 mm
4	7 mm	-
5	4 mm	7 mm
6	-	7 mm
7	-	7 mm
<b>8</b>	<b>13 mm</b>	<b>9 mm</b>
9	-	5 mm
10	4 mm	4 mm
11	-	3 mm
12	4 mm	-
13	-	11 mm
14	5 mm	7 mm
15	-	-
16	10 mm	4 mm
17	11 mm	7 mm
18	7 mm	7 mm
19	8 mm	4 mm
<b>20</b>	<b>14 mm</b>	<b>8 mm</b>
21	6 mm	4 mm
22	3 mm	-
23	10 mm	-
24	-	-

O símbolo - significa que os extratos fúngicos não apresentaram formação de halo contra a cepa testada. Estão destacados, em negrito, os diâmetros dos halos de inibição dos fungos que apresentaram melhor resultado. **Fonte:** Autora, 2019.

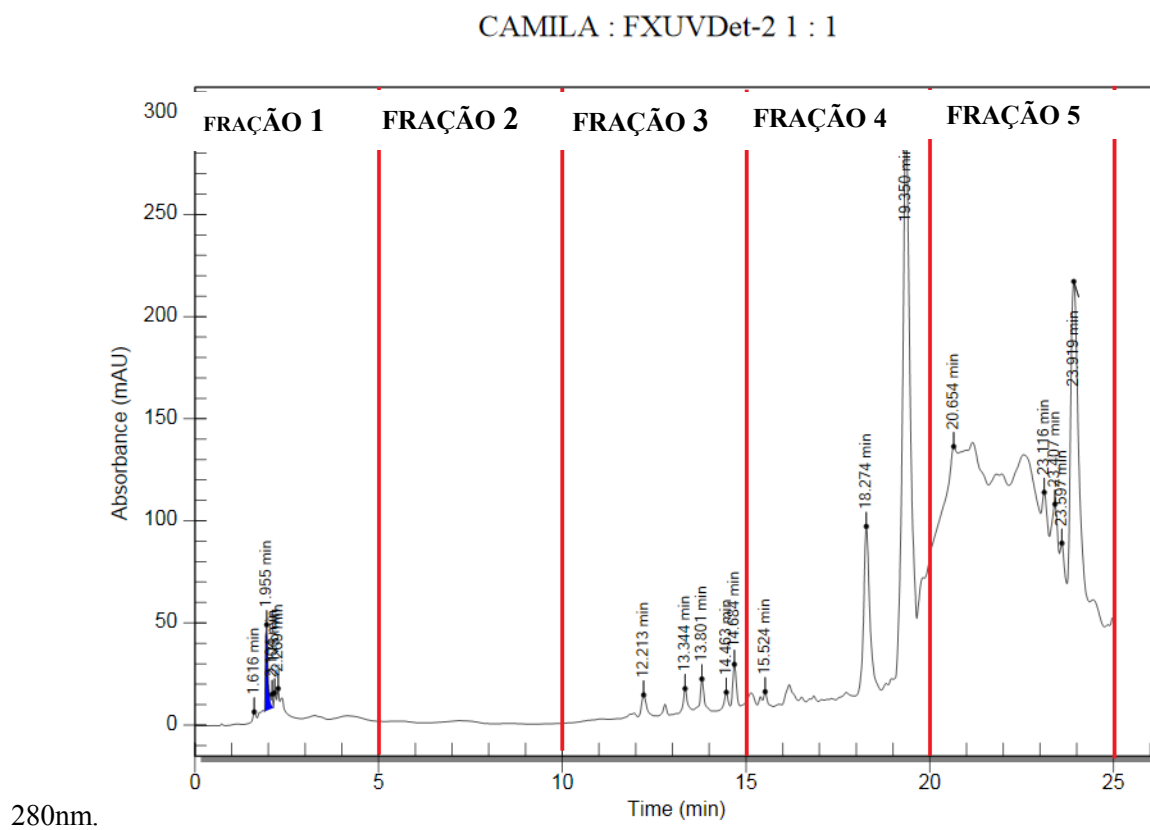
Silva *et al.* (2018), isolou fungos endofíticos de plantas do semiárido alagoano, dentre essas, da *Anadenanthera colubrina*, que apresentou halo de inibição de 3,4 mm frente a bactéria patogênica *P. aeruginosa*, mas não apresentou inibição em *E. coli* e *S. aureus*, diferente da *Baraúna* com eficiência antagônica apresentando um halo de inibição de 4,5 mm para *E. coli*, 4,7 mm para *P. aeruginosa*, e 5,1 para *S. aureus*, confirmando assim, o potencial de fungos endofíticos isolados de plantas do semiárido alagoano como produtores de compostos com atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

### 5.3 PURIFICAÇÃO DOS MELHORES INIBIDORES

Os resultados do CLAE-FR mostraram que os compostos obtidos de metabólitos secundários (MS) dos fungos endofíticos de numeração 8 e 20, possuem mais de 15 picos, aos quais consideramos possíveis quantidades de compostos diferentes que são responsáveis pelas atividades antibiograma e antiparasitária. A Figura 9 corresponde ao cromatograma gerado a partir da purificação do extrato de MS obtido do fungo N°8; foram coletados 5 Frações em intervalos de tempo diferentes, conforme Cromatograma 1 a seguir.



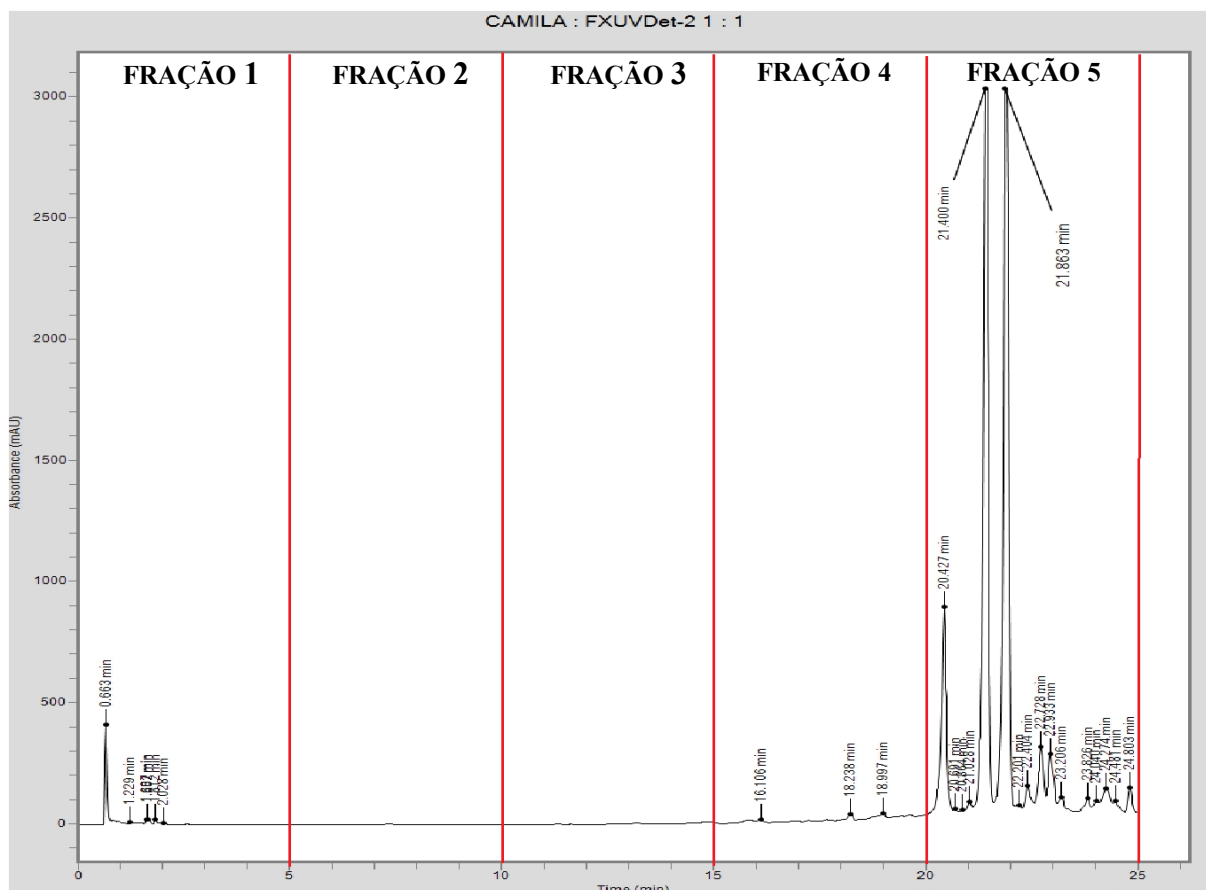
**Cromatograma 1** - Obtido a partir da purificação do extrato de metabólitos secundários do Fungo N°8, por CLAE-FR, e suas respectivas Frações 1, 2, 3, 4 e 5 que correspondem ao intervalo de tempo de 0 a 5 min, 5 a 10 min, 10 a 15 min, 15 a 20 min, e 20 a 25, em um comprimento de onda de



Fonte: Autora, 2019.

A purificação dos extratos de metabólitos secundários foi realizada de acordo com o tempo de retenção do extrato na coluna. Para o extrato de MS do Fungo N°20, foram testadas as Frações 1, 3, 4, e 5 relacionadas ao intervalo de tempo de 0 a 5 min, 10 a 15 min, 15 a 20 min e 20 a 25 min, respectivamente, conforme Cromatograma 2.

**Cromatograma 2** - Cromatograma obtido a partir da purificação do extrato de metabólitos secundários do Fungo N°20, por CLAE-FR, e as respectivas Frações 1, 3, 4 e 5 (que foram usadas no teste antiparasitário) que correspondem ao intervalo de tempo de 0 a 5 min, 10 a 15 min, 15 a 20 min e 20 a 25 min, em um comprimento de onda de 280 nm.



Fonte: Autora, 2019.

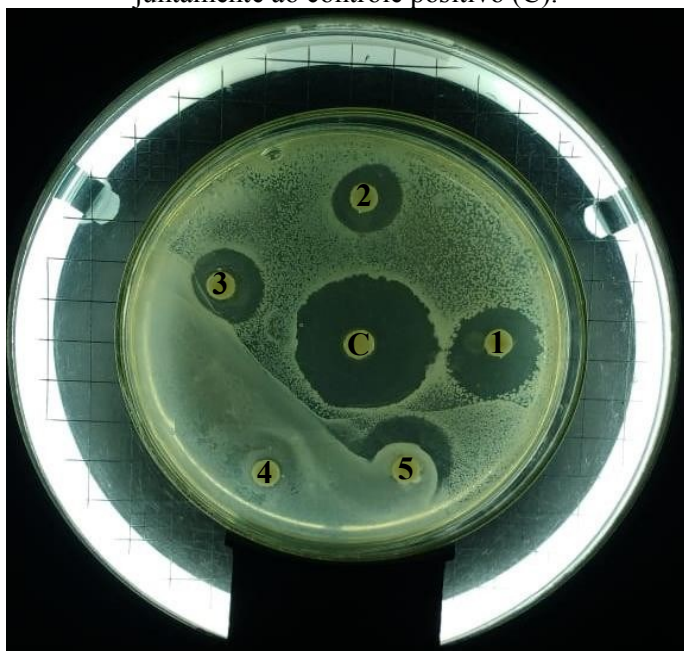
Após análise em vários comprimentos de onda ( $\lambda = 200, 250$  e  $280\text{nm}$ ), verificamos que a Fração 2 não apresenta MS. Portanto, esta fração foi descartada nos testes de antibiograma. Por mais que a Fração 3 não apresente formação de picos na Figura 10, em algumas das cromatografias realizadas para obtenção do extrato purificado, foi visualizado a presença de alguns picos discretos, o que nos sugeriu que há compostos na referida Fração e não deixar de testá-la.

É possível identificar com clareza pelo cromatograma da Figura 10, que a Fração 5 possui 16 picos num intervalo de tempo de 20 a 25 min, o que indica que essa área possui diversos compostos que apresentam algum tipo de atividade capaz de gerar um novo fármaco de amplo espectro.

#### 5.4 ENSAIO ANTIBACTERIANO COM AS FRAÇÕES PURIFICADAS DO FUNGO N°8

Realizado o teste antibiograma a partir da purificação do extrato de metabólitos secundários do Fungo N° 8, foi analisado os halos inibitórios formados, como demonstrado na Imagem 9, assim como, os resultados métricos (diâmetros dos halos), dispostos na Tabela 7.

**Imagem 9** - Teste antibacteriano do extrato do fungo de numeração 8, purificado, referente às 5 frações analisadas 1 (0 a 5 min), 2 (5 a 10 min), 3 (10 a 15 min), 4 (15 a 20 min), e 5 (20 a 25 min), juntamente ao controle positivo (C).



Fonte: Autora, 2019.

**Tabela 7** - Média  $\pm$  Desvio Padrão dos diâmetros dos halos inibitórios, realizado em duplicata, obtidos através do extrato do cultivo do Fungo N° 8, purificado.

FRAÇÕES	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
1	<b>11,5<math>\pm</math>3,5mm</b>	<b>10,5<math>\pm</math>0,5 mm</b>
2	7,5 $\pm$ 7,5 mm	4,5 $\pm$ 4,5 mm
3	5 $\pm$ 5 mm	10 $\pm$ 1 mm
4	10 $\pm$ 10 mm	8 $\pm$ 8 mm
5	6 $\pm$ 6 mm	<b>10,5<math>\pm</math>0,5 mm</b>

Estão destacados, em negrito, os diâmetros dos halos de inibição das Frações que apresentaram melhor resultado. **Fonte:** Autora, 2019.

A Fração 1 (referente ao intervalo de tempo de 0 a 5 min), do fungo endofítico N°8, apresentou maior halo de inibição para ambas as bactérias testadas, Gram-positiva e Gram-negativa. Essa fração corresponde aos compostos que não adsorveram à coluna, por serem totalmente hidrofílicos.

As Frações 1 e 5 atingiram igualmente diâmetros com média de 10,5 mm, já a Fração 3 apresentou média de 10 mm, testada contra a bactéria *Escherichia coli*. Logo, essas Frações citadas tiveram halos de inibição entre 10 mm e 10,5 mm, que comparados ao controle positivo (Amoxicilina 8,3mg), com halo de inibição de 30 mm, obteve atividade antibiótica equivalente a 2,77mg de Amoxicilina.

De maneira geral, os resultados obtidos mostram que, as frações testadas contra ambas bactérias testadas, apresentaram atividade de inibição. Estes dados demonstram que o Fungo N°8 produz diversas moléculas antimicrobianas de amplo espectro. Provavelmente, o efeito antimicrobiano do extrato total possui efeito sinérgico dos vários antibióticos fracionados por cromatografia.

Extratos obtidos de alguns fungos endofíticos de *Piper glabratum*, foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em mais de um solvente testado como, por exemplo, P1Pg1 (extratos caracterizados e enumerados com código referente ao ponto de coleta (P1), a espécie (Pg), seguidos de algarismos arábicos crescentes, de acordo com a ordem de isolamento), com halo de inibição de 8,99 mm para *E. coli* e 12,50 mm para *S. aureus*, P1Pg11 (halo de inibição de 6,87 para *E. coli* e 10,67 mm para *S. aureus*) que apresentaram atividade antimicrobiana quando obtidos a partir do meio fermentado e acetato de etila, P1Pg8 em

acetato de etila e clorofórmio (halo de inibição para *E.colli* de 7,66 mm e 8,60 mm, e para *S. aureus* 9,30 mm e 7,33 mm, respectivamente), o que indica que um mesmo fungo endofítico pode produzir diferentes tipos de compostos com atividade antimicrobiana (OLIVEIRA, 2015).

### 5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DAS FRAÇÕES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO FUNGO N°20

A partir da análise em microscopia de campo claro, utilizando como critério a cinética/movimento do parasita, foi possível pela técnica de contagem utilizando câmara de Neubauer, identificar o efeito que o extrato de metabólitos secundários do Fungo N°20 obteve frente aos parasitas testados, conforme dados quantificados na Tabela 8. Os extratos foram testados em duas diluições diferentes, 20  $\mu$ L (referente a letra A) e 10  $\mu$ L (referente a letra B).

**Tabela 8** - Resultado da contagem referente ao efeito que as 4 frações analisadas, (1 - 0 a 5 mim, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), juntamente com o controle negativo, obtiveram contra o parasita testado.

FRAÇÕES	Contagem de <i>Leishmania</i>	% Viabilidade
1 A	348	85,5
3 A	313	76,9
3 B	324	79,6
4 A	289	71,0
4 B	249	61,2
5 A	0	0
5 B	0	0
Controle Negativo	407	100

A: 20  $\mu$ L da Fração; B: 10  $\mu$ L da Fração. \*0: eliminação total dos parasitas. **Fonte:** Autora, 2019.

O efeito do extrato em *Leishmania* ocasionou significativa redução (morte) dos parasitas. Observou-se que a Fração 5, nas duas diluições para o tratamento, mostrou-se eficiente, sendo caracterizado pela morte total do parasita *in vitro*.

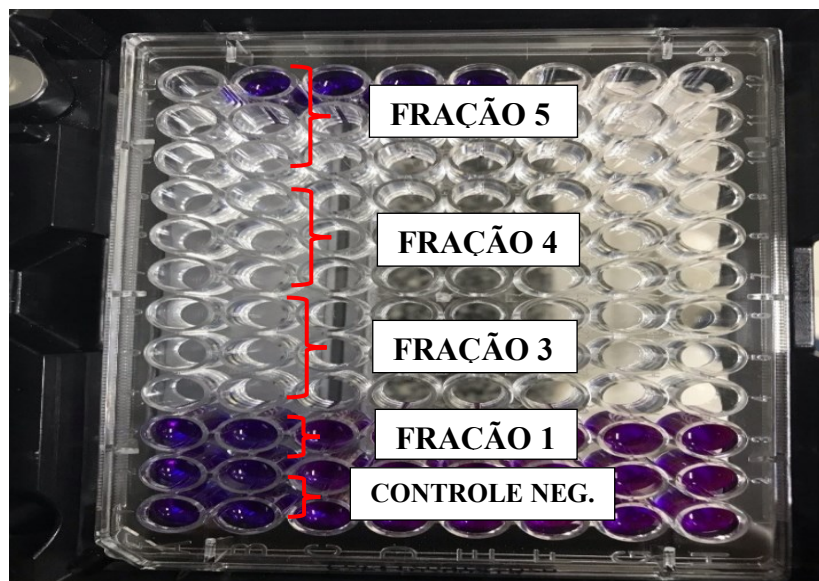
A Fração 4 obteve uma redução de 33,9% de parasitas viáveis, sendo a Fração (dentro a Fração 1 e 3) que possuiu maior efeito de eliminação do parasita.

Metabólitos vegetais incluindo 4-hidroxil- nilocarruga (2), 6,8 - (di-3-metil-but-2-enil) eriodictyol (4) e buesgenina (6), foram avaliadas quanto às suas atividades leishmanicidas contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*. A atividade leishmanicida de 6 foi expressa com o IC50 mais baixo (5,70 µg / mL). Além disso, o efeito leishmanicida de 4 contra *L. amazonensis* aumentou na mistura 6/4 (1: 3) (SANDJO, 2016).

### **5.5.1 Análise da viabilidade de Leishmania pelo ensaio colorimétrico**

No ensaio colorimétrico onde a resazurina (de cor azul e não fluorescente), é reduzida a resofurin (de cor rosa e fluorescente), foi possível visualizar de acordo com a mudança de cor do composto, as frações que apresentaram mudança na coloração de acordo com a inibição. A coloração lilás nas Frações 1 e 3, indica que houve pouca inibição do parasita; na Fração 4 observa-se um tom mais forte de rosa com o fundo do poço azulado, que permiti-nos certificar que há uma significativa inibição referente a Fração testada; já na Fração 5, observa-se claramente a coloração azul, indicando assim que a Fração 5 foi capaz de inibir totalmente os parasitas testados, conforme Imagem 10.

**Imagem 10** - Ensaio colorimétrico contra *Leishmania*, com aplicação de resazurina às Frações 1, 3, 4 e 5 em teste, junto com o controle negativo (sem tratamento) na fileira H.



Fonte: Autora, 2019.

A resazurina é uma técnica colorimétrica específica reagente na mitocôndria, logo, ela quantifica o dano mitocondrial que é gerado a partir do extrato que está sendo testado. Após 24 horas da aplicação da resazurina foi realizado a leitura no leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), utilizando os comprimentos de onda 570nm e 600nm (CORRAL *et al.*, 2013). A partir disso, foi calculado o percentual de inibição das Frações de metabólitos secundários, os quais estão quantificados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Redução dos parasitas provocado pelo dano mitocondrial causada pelas frações testadas. As quatro frações do extrato de metabólitos secundários testadas (1 - 0 a 5 min, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), e suas respectivas diluições (A – referente a 20 $\mu$ L e B – referente a 10 $\mu$ L), em triplicata contra o parasita *Leishmania* e suas respectivas porcentagens de inibição referente a Média  $\pm$  Desvio Padrão.

FRAÇÕES	<i>Leishmania</i>
1 A	32,28 $\pm$ 4,69
3 A	51,64 $\pm$ 2,64
3 B	37,96 $\pm$ 1,53
4 A	83,96 $\pm$ 1,47
4 B	79,27 $\pm$ 2,58
5 A	100 $\pm$ 0
5 B	100 $\pm$ 0

Fonte: Autora, 2019.

Para o teste com *Leishmania*, as Frações 3 A, 4 e 5 obtiveram porcentagem de inibição acima de 50%, caracterizando-as como ativas contra *Leishmania in vitro*.

A Fração 5 obteve inibição total dos parasitas, atingindo um percentual de inibição de 100%. A Fração 4 também resultou em grande eficiência na eliminação do parasita, atingindo um fator de inibição praticamente de 80% nas duas diluições testadas; contudo, a Fração 4 e 5 necessitam de novos testes de diluição a fim de encontrarmos a dose mínima inibitória do extrato, fazendo-se necessário a identificação da concentração em que o extrato reage. A Fração 3A chegou a atingir um fator de inibição de 50%, reduzindo pela metade a quantidade de parasitas, com isso, essa Fração é claramente dose dependente e está no limiar da atividade antiparasitária. A Fração 1 apresentou um percentual de apenas 30% de atividade frente ao parasita testado.

Maneguetti (2015), demonstrou que das espécies vegetais estudadas contra *Leishmania amazonensis*, os extratos com melhor ação foram o hexânico e o metanólico das folhas da espécie *Lactarius pubescens*, com IC<sub>50</sub> de 3,5 µL e 3,9 µL respectivamente. Estes extratos também demonstraram ação contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Enterococcus faecalis* (SILVA et al., 2014).

Além disso, os metabólitos casearinas isolados de *Casearia sylvestris* tem demonstrado uma boa ação contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania spp.* (BOU et al., 2014), provavelmente por provocarem o rompimento da membrana plasmática do parasita. Isso ocasiona esgotamento dos gradientes iônicos, efluxo de nutrientes e outros componentes citoplasmáticos, provocando a lise osmótica e, conseqüentemente, a morte celular (MARR et al., 2012).

Em virtude da toxicidade dos fármacos existentes e também da resistência do parasito, há uma certa preocupação e urgência na busca de novos medicamentos capazes de sanar esse problema. Na busca por novas alternativas para o tratamento da leishmaniose, estudos têm direcionado esforços em prol de pesquisas sobre compostos naturais extraídos de plantas que são eficazes contra *Leishmania spp.* e têm reduzida toxicidade para hospedeiros humanos (CALDERON et al., 2009; FERREIRA et al., 2010).



Os tratamentos atuais contra a Leishmaniose, advêm em sua maioria, de medicamentos que ainda não apresentam resistência e segurança necessária aos portadores da doença, a exemplo da Anfotericina B desoxicolato que faz parte de um tratamento alternativo de Leishmaniose visceral (LV), em áreas onde há baixa resposta aos antimoniais, onde não há outras opções disponíveis. São notáveis inconvenientes a necessidade de hospitalização, de monitoramento renal constante dos pacientes, a duração de 28 dias do tratamento e eventos adversos relacionados à infusão. A anfotericina B apresenta toxicidade de acordo com a dose (DNDi, 2018)

#### 5.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI* DAS FRAÇÕES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO FUNGO N°20

Pela técnica de contagem, com o auxílio da câmara de Neubauer, foi possível identificar o efeito que o extrato de metabólitos secundários do Fungo N°20 obteve frente ao parasita em teste. A partir da análise em microscopia de campo claro, utilizando como critério a movimentação do parasita, foi possível identificar a viabilidade do parasita conforme dados quantificados na Tabela 10. Os extratos foram testados nas diluições de 20 µL (referente a letra A) e 10 µL (referente a letra B).

**Tabela 10** - Resultado da contagem referente ao efeito que as 4 frações analisadas, (1 - 0 a 5 min, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), juntamente com o controle negativo, obtiveram contra o parasita testado.

FRAÇÕES	<i>T. cruzi</i>	% Viabilidade
1 A	500	108,7
3 A	498	108,3
3 B	480	104,3
4 A	500	108,7
4 B	510	110,9
5 A	0	0
5 B	0	0
Controle Negativo	460	100

A: 20 µL da Fração; B: 10 µL da Fração. \*0: eliminação total dos parasitas.

Fonte: Autora, 2019.

De acordo com a contagem foi possível identificar o efeito que as frações do extrato causaram nos parasitas.

As Frações 1, 3 e 4 tiveram um aumento na quantidade de parasitas quando comparados ao controle negativo, logo, pela técnica de contagem, essas frações não obtiveram resultados positivos referente a inibição gerada pelos compostos.

Já a Fração 5 foi capaz de eliminar totalmente a quantidade de parasitas, nas duas diluições testadas.

Segundo Sandjo (2016), metabólitos vegetais -1- (2,2- dimetil-2H-cromen-6-il) -3- (4-hidroxifenil) prop-2- A en-1-ona (**3**), damnacanthal (**5**), foram avaliados quanto às atividades tripanocidas contra a ação intracelular de amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Os compostos 3 e 5 mostraram efeito tripanocida, contando que o metabólito mais tripanocida (**5**) apresentou atividade com IC 50 a 11,14 µg / mL

### 5.6.1 Análise da viabilidade do *Trypanosoma cruzi* pelo ensaio colorimétrico

Seguida as 24 horas de adição da resazurina nos poços, foi realizado a leitura no leitor de microplacas, utilizando os comprimentos de onda 570nm e 600nm (CORRAL *et al.*, 2013). A partir disso, foi calculado o percentual de inibição das Frações de metabólitos secundários, os quais estão quantificados na Tabela 11 a seguir.

**Tabela 91** - Redução dos parasitas provocado pelo dano mitocondrial causada pelas frações testadas. As quatro frações do extrato de metabólitos secundários testadas (1 - 0 a 5 min, 3 – 10 a 15 min, 4 – 15 a 20 min, 5 – 20 a 25 min), e suas respectivas diluições (A–referente a 20µL e B – referente a 10µL), em triplicata contra o parasita *T. cruzi* e suas respectivas porcentagens de inibição referente a Média ± Desvio Padrão.

FRAÇÕES	<i>Trypanosoma cruzi</i>
1 A	12,85 ± 6,40
3 A	25,72 ± 4,87
3 B	27,87 ± 2,97
4 A	14,73 ± 5,04
4 B	12,11 ± 2,45
5 A	100 ± 0
5 B	100 ± 0

Fonte: Autora, 2019.

Para os resultados referente ao parasita *Trypanosoma cruzi*, o composto que obteve maior fator de inibição foi a Fração 5, referente ao intervalo de tempo de 20 a 25 min, a qual atingiu inibição total do parasita.

As demais frações não atingiram 50% de inibição do parasita, ou seja, segundo o que foi analisado da mitocôndria desse parasita, percebeu-se que em relação ao controle, 12% (tomando como exemplo a Fração 1A desses parasitas) emitiam menos a capacidade de conversão de resazurina em resofurin, logo, 12% desses parasitas não são viáveis.

As pesquisas realizadas com produtos naturais e seus derivados têm se mostrado uma interessante alternativa na busca de novos fármacos com bioatividade antiparasitária que diminuam o efeito tóxico causado nos pacientes que necessitam de tratamento contra doenças.

Pesquisas realizadas com a samambaia *Lygodium venustum*, mostraram que há uma atividade intermediária de sua fração hexânica contra *T. cruzi* porém a concentração de efeito moderado possui citotoxicidade máxima tornando-se inviável para aplicação clínica. Os compostos químicos presentes no produto natural foram incapazes de afetar as formas do protozoários em concentrações de baixa toxicidade. Portanto, para o caso do *T. cruzi*, as concentrações em que demonstraram atividade moderada foram tóxicas sobre as células fibroblásticas e para o caso da *L. brasiliensis* os produtos naturais não foram ativos nas concentrações não tóxicas (BRAGA, et al., 2013).

Vários metabólitos secundários de diferentes padrões estruturais têm se mostrado ativo contra *T. cruzi* (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007), a triagem de extratos de plantas é uma estratégia válida visto que esses produtos naturais são explorados para descobrir agentes tripanocidas (LUIZE et al., 2006; PIZZOLATTI et al., 2008).

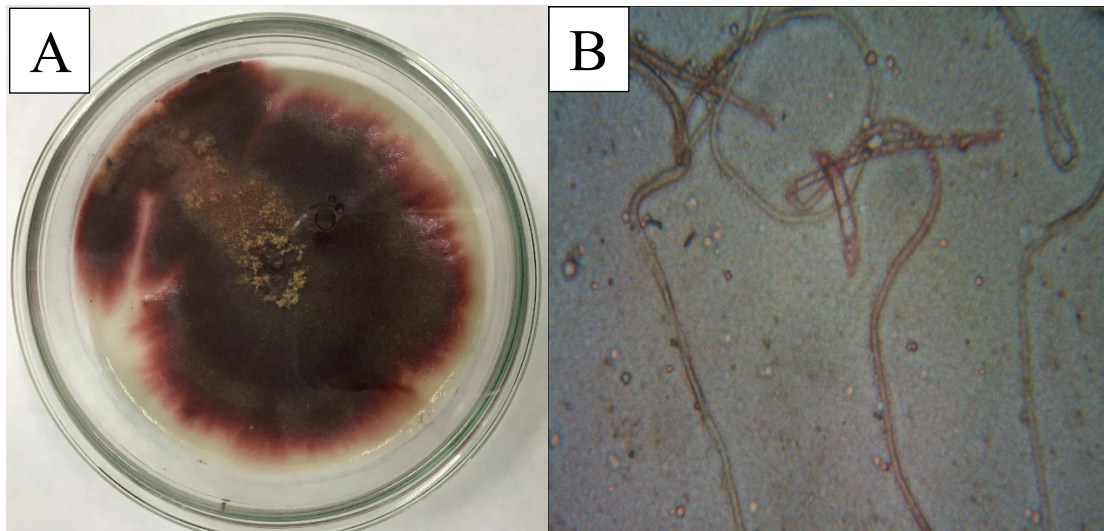
## 5.7 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ENDOFÍTICOS TESTADOS

Os fungos foram identificados a partir da visualização da imagem em microscópio eletrônico óptico seguido da comparação em literatura especializada. De acordo com os resultados obtidos, foi possível identificar que o Fungo N° 8 é uma espécie do gênero *Fusarium*, que em BDA, apresentaram colônias róseas, com pigmentação de coloração

vermelha (ROCHA *et al.*, 2016). Da mesma forma, o Fungo N°20 foi identificado como sendo da espécie do gênero *Aspergillus*, que é comum nessa região com frequência significativa no solo e no ar (PEREIRA *et al.*, 2010).

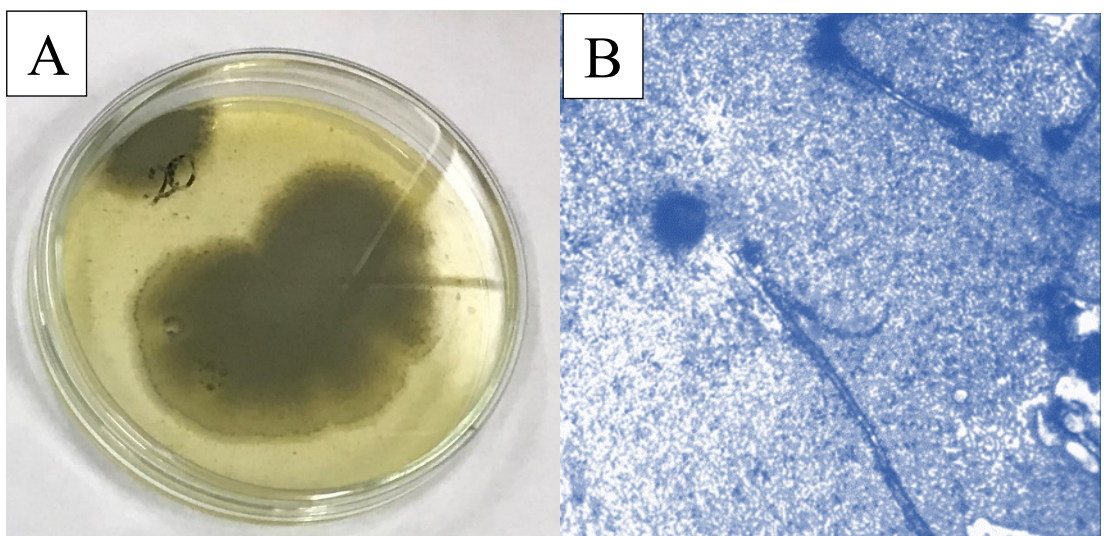
Para identificação, os fungos foram mantidos em cultivo por 7 dias, seguido de análise em microscopia eletrônica (Figuras 13 A-B e 14 A-B).

**Imagem 11** - Fungo de N° 8, gênero *Fusarium*. A: Fungo em cultivo. B: Fungo em microscopia óptica.



Fonte: Autora, 2019.

**Imagem 12** - Fungo N° 20, do gênero *Aspergillus*. A: fungo em cultivo. B: Fungo em microscopia óptica.



Fonte: Autora, 2019.

## 5.8 POTENCIAL FARMACÊUTICO DAS FRAÇÕES

As frações de metabólitos secundários apresentaram, tanto no teste antimicrobiano como antiparasitário, atividade com capacidade inibitória para os vetores das doenças em estudo. É necessário o isolamento e quantificação desse composto e descobrir que substância é responsável por tais atividades, assim como novos testes para determinar em qual concentração o extrato possui atividade inibitória mínima, e conseguinte, verificar qual a dose-dependência desse composto em novos testes.

Entretanto, um ou mais compostos presentes na Fração 5 dos metabólitos secundários do Fungo Nº20 endofítico a *A. macrocarpa* possui potencial para ser desenvolvido como composto antiparasitário tanto para *Leishmania*, quanto para *T. cruzi*, ajudando no combate a estas enfermidades presente no Brasil e em outros países de clima tropical.

Dessa forma, os compostos presentes nas Frações que causam dano mitocondrial nos parasitas podem levar, a médio e longo prazo, a morte do parasita, assim futuramente podemos ter um fármaco usado nos estudos de indução de apoptose via mitocondrial.

## 6 CONCLUSÕES

- Sob a condição de cultivo testada, 70,8% dos extratos de metabólitos secundários dos fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa* apresentaram atividade antibacteriana.
- Sob a condição de cultivo testada, os extratos dos fungos endofíticos de numeração 3, 5, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 20 e 21 da *Anadenanthera macrocarpa*, ou seja, 39,28% dos fungos endofíticos isolados, mostraram-se produtores de moléculas antibióticas contra bactérias *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Escherichia coli* (Gram negativa);
- Os Fungos N°8 e N°20 se destacaram como melhores produtores de substâncias antibióticas.
- Quando purificado, todas as frações testadas, contendo vários metabólitos do Fungo N°8 apresentaram atividade antibacteriana de amplo espectro.
- As Frações 3 (10µL) e 4 (10µL e 20µL) dos metabólitos secundários do Fungo N°20 reduziram a mais de 50% a viabilidade do parasita *Leishmania amazonensis*, causado pelo dano mitocondrial.
- A Fração 5, dos metabólitos secundários do Fungo N°20, causou 100% de morte *in vitro* dos parasitas *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*, demonstrando assim que algum (ns) do (s) componente (s) dessa fração possui potencial como fármaco antiparasitário.

## REFERÊNCIAS

ALSTCHUL Siri von Reis. Vilca and its use. *In*: EFRON, Daniel H.; HOLMSTEDT, Bo; KLINE, Nathan S. **Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs**. New York: Raven Press, 1967. 468p.

ALTSCHUL, Siri von Reis. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Harvard University Herbaria: Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**. [s.l.], p. 3-65. 1964.

ALVAR, Jorge *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>> Acesso em : 15 de Março de 2019.

ANTINORI, Spinello; SCHIFANELLA, Luca; CORBELLINO, Mario. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.109-118, 1 maio 2011. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em:< [https:// doi.org/10.1007/s10096-011-1276-0](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1276-0) PMID: 21533874> Acesso: 20 de Janeiro de 2019.

ARRUDA, Viviane Martins de. **Avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antiulcerogênico Sanativo®**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

AZEVEDO, João Lúcio de. Microrganismos endofíticos. *In*: MELO, Itamar Soares de; AZEVEDO, João Lúcio de. **Ecologia microbiana**. Jaguaruina: Embrapa-CNPMA, 1998. 17-137 p.

BARBOSA, Luciana Gabriel. DOENÇA DE CHAGAS<sup>1909-2009</sup>. **Revista Logos**, São Paulo, v. 17, n. 3, p.20-36, 2009.

BARREIRO, Eliezer Jesus. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e O Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 13, p.29-39, 1990.

BOU, Diego Dinis *et al.* Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 21, n.5, p.676-681, abr.2014. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.004>> Acessado em: 15 de Fevereiro de 2019.

BRENAN, John Patrick Micklethwait. Notes on Mimosoideae: I. **Kew Bulletin**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.161-192, 1955. JSTOR. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2307/4108864>> Acessado em: 17 de março de 2018.

BRITO, Monique Araujo de; CORDEIRO, Benedito Carlos. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.247-249, ago. 2012. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442012000400002>> Acesso: 20 de Junho de 2019.

CABRAL, Daniela Lyra de Vasconcelos. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como antiinflamatórias**. 2014. 79 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

CAVALCANTI, Rayza Morganna Farias. **Bioprospeção de tanases produzidas por fungos endofíticos isolados de espécies vegetais da Caatinga**. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2017.

CHAPLA, Vanessa Mara; BIASETTO, Carolina Rabal; ARAUJO, Angela Regina. Endophytic Fungi: An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.421-437, 2013. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20130036>> Acesso em:15 de Julho de 2018.

CHAUDHRY, Zahra Fazal. **Novas fases estacionárias para CLAE preparadas por imobilização térmica de PMODS sobre diferentes suportes de sílica**. 2005. 174 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Química Analítica, Universidade de Campinas, São Paulo, 2005.

CLEMENTINO, Leandro da Costa. **Bioprospeção de Antibióticos Produzidos por Fungos da Caatinga**. 2014. 52 f. Monografia (Graduação) – Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande. 2014.

CLOETE, Thomas Eugene. Resistance mechanisms of bactéria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 51, ed. 4, p. 277-282, jan 2003.

COLOSIO, R. C. et al. Conhecimentos e atitudes sobre a doença de Chagas entre profissionais de saúde–Paraná, Brasil. **Ciência, Cuidado e Saúde** v. 6, p. 355-363, 2007.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure And Applied Chemistry**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.7-24, 1 jan. 2005. Walter de Gruyter GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1351/pac200577010007>> Acessado em: 10 de março de 2018.

DNDi | **Chagas Disease (American trypanosomiasis), 2010**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>> Acessado em: 25 de Novembro de 2017.



DNDi | **Chagas Disease (American trypanosomiasis), 2015.** Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>> Acessado em: 25 de Novembro de 2017.

DNDi | **Leishmanioses (Tratamentos atuais), 2018.** Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/tratamentos-atuais-leish/>> Acessado em: 21 de Junho de 2019.

DREYFUSS, M.M.; Chapela I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In: Gullo VP. **The discovery of natural products with therapeutic potential.** Boston: Butterworth-Heinemann; 1994.

DRUMOND, Marcos Antônio. Potencialidade das Essências Nativas do Trópico Semi-árido. In: Congresso Nacional Sobre Essências Nativas, 5., 1982, Campos do Jordão. **Anais[...]. Campos do Jordão, 1982.** Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/131899>. Acesso em: 11 de maio de 2019.

DRUMOND, Marcos Antônio; PIRES, Ismael Eleotério; BRITO, José Otávio. Algarobeira: uma alternativa para preservar as espécies nativas do Nordeste semi-árido. **Silvicultura**, São Paulo, v. 37, n. 10, p.51-53, maio 1984.

DUARTE, Danilo Freire. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. Opium and Opioids: A Brief History. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135-146, 2005. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0034-70942005000100015>> Acessado em: 20 de Março de 2018.

FIGUEREDO, Fernando Gomes *et al.* Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-5, 2013. Hindawi Limited. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/640682>> Acessado em: 26 de Junho de 2018.

GOMES, Leandra Macedo de Araújo. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae) em roedores.** 2014. 184 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.

GOMES, Sara Margarida da Costa. **Determinação de Antioxidantes por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Detecção Electroquímica.** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Controlo de Qualidade e Ambiente, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2010.

HAMILTON, R. J.; SEWELL, P. A.. Introduction to high performance liquid chromatography. **Introduction To High Performance Liquid Chromatography**, [s.l.], p.1-12, 1982. Springer Netherlands. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-5938-5\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-5938-5_1)> Acessado em: 26 de outubro de 2018.

HAUFF, Shirley Noely. 2010. **Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga.** Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Disponível em:

<[http://www.mma.gov.br/estruturas/203/\\_arquivos/representativconservcaat\\_shauff\\_revis\\_ojoo\\_03\\_produto\\_final\\_203.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/representativconservcaat_shauff_revis_ojoo_03_produto_final_203.pdf)> Acessado em: 07 de maio de 2019.

HOTEZ, Peter J. *et al.* Combating Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.871-878, 15 mar. 2004. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/382077>> Acesso em: 28 de março de 2019.

KETTLER, Hannah E.; MARJANOVIC, Sonja. Engaging biotechnology companies in the development of innovative solutions for diseases of poverty. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.171-176, fev. 2004. Springer Nature. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd1308>> Acessado em: 26 de abril de 2018.

LAINSON, Ralph; SHAW, Jeffrey Jon. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v. 1 - Biology and epidemiology. Academic Press: London, 1987. p. 1-120.

LESTINOVA, Tereza *et al.* Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and Leishmania. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 11, n. 7, p. e0005600, 13 jul. 2017. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005600>>.Acessado em: 07 de Janeiro de 2019.

LOZANO, Valquiria Ferrazzini. **Avaliação da atividade antiparasitária e efeito sinérgico de compostos cumarínicos comparados ao benznidazol em duas cepas de trypanosoma cruzi**. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2011.

MANSUETO, Pasquale *et al.* Immunopathology of Leishmaniasis: An Update. **International Journal Of Immunopathology And Pharmacology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.435-445, jul. 2007. SAGE Publications. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/039463200702000302>> Acessado em: 03 de abril de 2019.

MARR, Alexandra K; MCGWIRE, Bradford S; MCMASTER, W Robert. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 9, p.1047-1059, set. 2012. Future Medicine Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2217/fmb.12.85>>. Acessado em: 08 de janeiro de 2019.

MATOS, Francisco José de Abreu; ROCHA, Francisco Dias da. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha: informações sobre o emprego na medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: UFC Edições, 1997. 258 p.

MEYER, Isabela Fabiana; KANESHIMA, Edilson Nobuyoshi; SOUZA-KANESHIMA, Alice Maria de. ALTERAÇÕES NO SISTEMA DIGESTIVO DESENCADEADAS PELO QUADRO INFECCIOSO DO Trypanosoma cruzi. **Unicesumar**, Maringá, v. 8, n. 1, p.11-23, jul. 2006

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.629-661, 7 fev. 2016.

American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>> Acessado em: 25 de Novembro de 2018.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; SILVA, Rafael Souza da. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, [s.l.], v. 1, n. 10, p.189-197, mar. 2008.

OLIVEIRA, Kamyla Moraes de; BOAS, Edilene Vilas; BONETT, Lucimar Pereira; CARDOSO JÚNIOR, Euclides Lara; BERNARDI-WENZEL, Juliana. Isolamento e Atividade Antibacteriana de Fungos Endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 1, p. 3-9, jan/abr. 2015.

PEIXOTO NETO, Pedro Accioly de Sá; AZEVEDO, João Lúcio de; ARAÚJO, Welington Luiz Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.62-76, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>> Acessado em: 20 de maio de 2019.

PEREIRA, Fillipe de Oliveira *et al.* Microbiota fúngica do solo e ar atmosférico na região da Borborema, estado da Paraíba, Brasil\*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 42, p.123-126, jul. 2010.

PINTO, Angelo C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, p.45-61, maio 2002. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000800009>> Acessado em: 16 de agosto de 2018.

POLI, Anderson *et al.* Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **Sabios: Rev. Saúde e Biol.**, Maringá, v. 7, n. 2, p.82-89, 2012.

PRINCE, Karina Andrade de. **Determinação da atividade anti – Mycobacterium tuberculosis de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do maba**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

ROCHA, Fernando da Silva *et al.* Caracterização de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, produção de fitotoxina e incidência da fusariose no norte de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.67-72, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2100>> Acessado em: 25 de janeiro de 2019.

SANDJO, Louis P., MORAES, Milena H. de, KUETE, Victor., KAMDOUM, Blaise C., STEINDEL, Mario. Individual and combined antiparasitic effect of six plant metabolites against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p.1772-1775, abril 2016.

SANTOS, Cristiane Araújo Tuma. Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em doadores de sangue: revisão sistemática da literatura e estudo de prevalência no Hemocentro de Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.251-252, jul. 2012.

SAVOIA, Dianella. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, [s.l.], v. 9, n. 06, p.588-596, 4 jul. 2015. Journal of Infection in Developing Countries. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3855/jidc.6833>> Acessado em: 25 de abril de 2019.

SCHISTEK, Haroldo. **Caatinga, um bioma desconhecido e a “convivência com o semiárido”**. In: **REVISTA DO INSTITUTO HUMANITAS UNISINOS**. São Leopoldo: Graziela Wolfart Mtb 13159, v. 389, 30 abr. 2012.

SILVA, Kelle Oliveira. **Avaliação das atividades antimicrobiana, aderência, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva de *Anadenanthera macrocarpa* (benth) brenan**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2013.

SILVA, Livia Ribeiro da; CANABARRO, Adriele de Melo Cezar Almeida; NASCIMENTO, Maize Mariana Brandão do; JESUS, Evely Vitória Oliveira de; SANTOS, Tania Marta Carvalho dos; MELO, Irvin Lucena; ALMEIDA, Arthur Costa Pereira Santiago de. Bioativos Antimicrobianos Produzidos por Endófitos Associados a Plantas do Semiárido. *Ciência Agrícola*, Rio Lago, v. 16, número suplementar, p. 5-7, 2018.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/ Ed. UFCS., 2010. 1104 p.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A.. **Princípios de Análisis instrumenta**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora Ltda, 2002. 1056 p.

SPECIAN, Vânia *et al.* Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endófitos. **Cient Ciênc Biol Saúde**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.345-351, jul. 2014.

STROBEL, Gary *et al.* Natural Products from Endophytic Microorganisms I. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.257-268, fev. 2004. American Chemical Society (ACS). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np030397v>>. Acessado em: 26 de outubro de 2018.

STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.491-502, 1 dez. 2003. American Society for Microbiology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.67.4.491-502.2003>> Acessado em: 29 de agosto de 2018.

TAMASHIRO, Jorge Yoshio; ESCOBAR, Nicoll Andrea Gonzalez. Subfamília Mimosoideae. In: Wanderley, M.G.L. *et al.* (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, 2016. v. 8, p. 84-166.

TONHI, Edivan *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.616-623, jul. 2002. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000400017>>. Acessado em: 18 de setembro de 2018.

TORRES, Constantino Manuel; REPKE, David B.. **Anadenanthera**: visionary plant of ancient South America. USA: Routledge, 2006. 340 p.

VIEGAS JUNIOR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.326-337, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000200025>> Acessado em: 26 de outubro de 2018.

WEBER, Carlos R. *et al.* Anadenanthera colubrina: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**, [s.l.], v. 92, n. 4, p. 235-244, 2011.

WHO **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>> Acessado em: 10 de Novembro de 2018.