

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**RAYRA ANNARA DA FONSECA OTACÍLIO PINTO**

**BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS DE *Dalbergia  
ecastaphyllum* L. Taub**

**Alfenas/MG**

**2019**

**RAYRA ANNARA DA FONSECA OTACÍLIO PINTO**

**BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS  
PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS DE *Dalbergia  
ecastaphyllum* L. Taub**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

**Alfenas/MG**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central - Sede

P659b Pinto, Rayra Annara Da Fonseca Otacílio  
Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub / Rayra Annara Da Fonseca Otacílio Pinto -- Alfenas/MG, 2019.  
99 f.: il. --  
Orientador: Masaharu Ikegaki.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.  
1. *D. ecastaphyllum*. 2. Endófitos. 3. Anti-Infeciosos . 4. Nanopartículas. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD- 579.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.  
CEP: 37130-001



RAYRA ANNARA DA FONSECA OTACÍLIO PINTO

“BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS DE *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas  
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 6 de agosto de 2019.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Ligiane Aparecida Fiorentino

Instituição: UNIFENAS

Assinatura:

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Dedico este trabalho à minha família.

## AGRADECIMENTO

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Masaharu Ikegaki por tornar a experiência do mestrado acadêmico agradável e rica, por sempre estar disponível e interessado em desempenhar essa tarefa comigo, e por me despertar para novas possibilidades na microbiologia. Foi um privilégio estar sob sua orientação. Muito obrigada.

Ao meu colaborador Daniel Vieira de Moraes, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP), que orientado pelo Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, se empenhou de maneira tão generosa nessa pesquisa, que não aconteceria se não fosse por sua colaboração.

Às minhas amigas e colaboradoras, a mestranda Amanda T. Santini e a Técnica Administrativa em Educação Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho, que me auxiliaram nas etapas de obtenção e atividade antimicrobiana dos endófitos. Vocês são a prova de que na Universidade o mais importante não é a obtenção de títulos, e sim as amizades conquistadas e os conhecimentos transmitidos, e vocês fizeram ambos de uma maneira que nunca esquecerei.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Latércia Tranches Dias, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Maria Lima Lemes, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ligiane Aparecida Florentino e ao Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento pela honra em tê-los nas minhas bancas de qualificação e defesa. Em especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Latércia Tranches Dias e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Maria Lima Lemes, que disponibilizaram recursos laboratoriais e intelectuais durante a pesquisa que me permitiram concluir os ensaios. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Ionta pela colaboração nos ensaios de viabilidade celular.

Aos meus amigos e familiares por acreditarem na minha capacidade, pelo apoio em dias de insucesso experimental, pelas comemorações a cada reconhecimento obtido nesse trabalho, e pelo entusiasmo como ouvintes e aprendizes nas longas conversas sobre microbiologia e microrganismos endofíticos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande”.

(Louis Pasteur).

## RESUMO

Os metabólitos secundários de endófitos são conhecidos por suas atividades bioativas e utilização biotecnológica. A *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub é a principal fonte da resina utilizada para a produção de própolis vermelha brasileira, produto com propriedades medicinais, seus endófitos constituem fontes atrativas para a bioprospecção de compostos biologicamente ativos. Este trabalho objetivou isolar fungos endofíticos de *D. ecastaphyllum* para avaliá-los em ensaios biológicos, *in vitro*, de atividade amilolítica, antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativa, determinação de compostos por Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) dos extratos brutos e caracterização morfológica dos microrganismos. Um total de 150 fungos endofíticos foi obtido através das folhas de *D. ecastaphyllum* coletadas em Canavieiras-BA. Foi estabelecido, pela primeira vez, um protocolo eficaz para a obtenção de fungos endofíticos para essa espécie vegetal. Os endófitos foram submetidos à triagem de atividade amilolítica e antimicrobiana pela metodologia do ágar em bloco, 12,67% foram capazes de sintetizar a enzima amilase *in vitro* e 23,33% apresentaram atividade antimicrobiana no método de triagem. Onze endófitos foram selecionados de acordo com o tamanho e especificidade das zonas de inibição na triagem, e foram submetidos à fermentação fúngica para obtenção de seus extratos brutos. Os extratos etanólicos dos endófitos foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras do gênero *Candida* spp. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias da família Enterobacteriaceae. As concentrações inibitórias variaram de 50 µg/mL até 800 µg/mL. Os extratos foram avaliados em ensaio antioxidante de DPPH, no qual todos tiveram capacidade sequestrante de radicais livres com médias estatisticamente distintas, sendo três extratos mais ativos que o padrão sintético comercial Hidroxitolueno butilado. O ensaio de viabilidade celular por MTS de cinco extratos não mostrou diminuição significativa da proliferação celular em células tumorais MCF-7, A549 e Hep-G2. As análises por CLAE-FR indicaram que os metabólitos secundários produzidos pelos endófitos têm características polares, e a caracterização morfológica prévia pela técnica de microcultivo mostrou fungos com hifas hialinas, septadas e produção de ascósporos sugestivos do filo Ascomycota. Este constitui o mais completo levantamento da microbiota endofítica de *D. ecastaphyllum* presente na literatura, o primeiro relato de atividade antimicrobiana de seus endófitos, e a comprovação de seu potencial como fontes de substâncias bioativas de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: *D. ecastaphyllum*. Endófitos. Antimicrobianos. Antioxidantes. Bioativos.

## ABSTRACT

Secondary metabolites of endophytes are known for their bioactive activities and biotechnological use. *Dalbergia ecastaphyllum* (L). Taub is the main source of the resin used for the production of Brazilian red propolis, a product with medicinal properties, its endophytes are attractive sources for the bioprospecting of biologically active compounds. This work aimed to isolate endophytic fungi from *D. ecastaphyllum* to evaluate them in *in vitro* biological assays of amylolytic, antimicrobial, antioxidant, antiproliferative activity, determination of compounds by HPLC-FR from crude extracts and morphological characterization of microorganisms. A total of 150 endophytic fungi were obtained through the leaves of *D. ecastaphyllum* collected in Canavieiras-BA. An effective protocol was established for the first time to obtain endophytic fungi for this plant species. The endophytes were submitted to amylolytic and antimicrobial activity screening by block agar method, 12.67% were able to synthesize the amylase enzyme *in vitro* and 23.33% presented antimicrobial activity in the screening method. Eleven endophytes were selected according to the size and specificity of the zones of inhibition in the screening, and were submitted to fungal fermentation to obtain their crude extracts. The ethanolic extracts of the endophytes were evaluated by the microdilution method in broth against Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeasts of the genus *Candida* spp. All the extracts presented antimicrobial activity, mainly against bacteria of the family Enterobacteriaceae. Inhibitory concentrations ranged from 50 µg / mL to 800 µg / mL. The extracts were evaluated in an antioxidant assay of DPPH, in which all had sequestering capacity of free radicals with statistically distinct averages, three extracts being more active than the commercial synthetic BHT butylated hydroxytoluene standard. The MTS cell viability assay of five extracts showed no significant decrease in cell proliferation in MCF-7, A549 and Hep-G2 tumor cells. The analysis by HPLC-FR indicated that the secondary metabolites produced by endophytes have polar characteristics, and the previous morphological characterization by the microculture technique showed fungi with hyaline, septate hyphae and ascospore production suggestive of the Ascomycota phylum. This is the most complete survey of the endophytic microbiota of *D. ecastaphyllum* present in the literature, the first report of antimicrobial activity of its endophytes, and the confirmation of its potential as sources of bioactive substances of biotechnological interest.

Keywords: *D. ecastaphyllum*. Endophytes. Antimicrobials. Antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> L.Taub .....	28
Figura 2 - <i>Apis mellifera</i> : recolhimento da resina vermelha de <i>D.ecastaphyllum</i> para a produção da própolis vermelha .....	28
Figura 3 - Fluxograma da metodologia .....	30
Figura 4 - <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> no Município de Canavieras-BA.....	39
Figura 5 - Colônias fúngicas produzindo micélios do interior dos fragmentos das folhagens de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	40
Figura 6 - T-test Two-Sided para comparação de médias de tratamentos .....	41
Figura 7 - Análise de variância gerada através do T-test para dois tratamentos.....	41
Figura 8 - Fluxograma das etapas de desinfecção e processamento do material botânico e isolamento de endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	42
Figura 9 - Teste de produção de amilase <i>in vitro</i> .....	44
Figura 10 - Triagem pelo método do ágar em bloco .....	48
Figura 11 - Concentração inibitória mínima pelo teste de microdiluição em caldo dos extratos etanólicos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> contra <i>P.aeruginosa</i> .....	59
Figura 12- Concentração bactericida mínima de <i>P.aeruginosa</i> .....	60
Figura 13- Teste Tukey das atividades antioxidantes dos extratos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	64
Figura 14- Gráfico de viabilidade celular de carcinoma de mama (MCF-7) na presença dos extratos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	68
Figura 15- Gráfico de viabilidade celular de adenocarcinoma pulmonar (A549) na presença dos extratos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	69
Figura 16- Gráfico de viabilidade celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) na presença dos extratos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	69
Figura 17- Hifas hialinas e septadas dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	79..
Figura 18- Esporulações dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	79
Figura 19- Hifas do endófito P5B de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	80

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Atividades biológicas e farmacológicas das espécies de <i>Dalbergia</i> descritas na literatura.....	26
Quadro 2 - Cromatogramas dos extratos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> produtores de amilase extracelular <i>in vitro</i> .....	43
Tabela 2 - Atividades antimicrobianas por inibição em ágar em bloco .....	45
Tabela 3 - Endófitos selecionados para fermentação líquida .....	49
Tabela 4 - Concentrações inibitórias mínimas dos extratos obtidos a partir de endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	50
Tabela 5 - Concentrações microbidas mínimas dos extratos obtidos a partir de endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	53
Tabela 6 - Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos .....	54
Tabela 7 - Concentrações microbidas mínimas dos antimicrobianos .....	54
Tabela 8- Atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	63
Tabela 9- Médias das atividades antioxidantes dos extratos dos endófitos de <i>D.ecastaphyllum</i> .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Ágar batata dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CITES	Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standardization Institute.</i>
CMM	Concentração microbicida mínima
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
MA2	Ágar extrato de malte 2%
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
RPMI	Meio de cultura ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
VRE	<i>Vancomycin-resistant Enterococcus</i>

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3- REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
3.1 Produtos naturais .....	18
3.2 Microrganismos endofíticos .....	19
3.3 Aplicações dos endófitos em biotecnologia .....	21
3.4 Gênero <i>Dalbergia</i> .....	24
3.5 <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> l. taub. ....	27
<b>4- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Coleta, desinfecção e processamento do material botânico e isolamento de endófitos de <i>dalbergia ecastaphyllum</i> L. Taub. ....	30
4.1.1 Coleta .....	30
4.1.2 Desinfecção e processamento do material botânico .....	31
4.1.3 Isolamento de fungos endofíticos de <i>D. ecastaphyllum</i> .....	31
4.2 Atividade Amilolítica .....	32
4.3 Triagem de atividade antimicrobiana por ágar em bloco .....	32
4.4 Fermentação, extração e concentração de metabólitos bioativos.....	33
4.5 Atividade antimicrobiana.....	33
4.5.1 Determinação da CIM.....	34
4.5.2 Determinação da CMM.....	35
4.6 Atividade antioxidante. ....	35
4.7 Ensaio de viabilidade celular. ....	36
4.7.1 Viabilidade celular por MTS.....	36
4.7.2 Viabilidade celular por exclusão de azul de tripano.....	37
4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR). ....	37

4.9 Caracterização dos endófitos por microcultivo.....	38
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1 Coleta, desinfecção e processamento do material botânico e isolamento de endófitos de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> L.Taub.....	39
5.2 Atividade amilolítica.....	43
5.3 Triagem de atividade antimicrobiana por ágar em bloco.....	44
5.4 Fermentação, extração e concentração de metabólitos bioativos.....	49
5.5 Atividade antimicrobiana (CIM e CMM) .....	50
5.6 Atividade antioxidante .....	63
5.7 Ensaio de viabilidade celular .....	67
5.8 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) .....	71
5.9 Caracterização dos endófitos por microcultivo .....	77
<b>6- CONCLUSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>98</b>

## 1- INTRODUÇÃO

Os produtos naturais possuem potencial para a prospecção de moléculas em razão da diversidade de compostos químicos abundantes na natureza. Apesar de serem considerados produtos de uso comum na medicina popular, são tidos como a fonte mais econômica de produção quando comparados a produtos biotecnológicos exclusivamente sintéticos (HARVEY, 2007).

Esses produtos do metabolismo secundário inspiram o desenvolvimento de cerca de 50% a 70% dos fármacos de uso clínico (NEWMAN; CRAGG, 2016), sua investigação tem aumentado significativamente nos últimos anos, dada a sua atuação em múltiplos campos da ciência, como na descoberta de novas drogas, na ecologia, biossíntese e química (PYE et al., 2017).

Uma das fontes de produtos naturais é a utilização de microrganismos produtores de compostos bioativos. O estudo desses microrganismos tem uma história mais recente do que a utilização de plantas medicinais, e foi evidenciado a partir da descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, através do fungo *Penicillium notatum*, o que revolucionou a terapia de infecções por patógenos bacterianos (GALLO; GUIMARAES, 2008; PEREIRA; PITA, 2018).

Outra vertente do estudo de microrganismos explorados na investigação de produtos naturais bioativos é a pesquisa de microrganismos endofíticos. Definidos como fungos e bactérias que vivem no interior dos tecidos de hospedeiros vegetais, normalmente em uma relação simbiótica, na qual o hospedeiro vegetal lhes garante um ambiente rico em nutrientes necessários à sua sobrevivência, e em contrapartida, os endófitos produzem metabólitos primários e secundários cujas funções biológicas no hospedeiro conferem benefícios como controle da herbivoria, de insetos e fitopatógenos, promoção de crescimento entre outros (AZEVEDO, 1998; HARDOIM et al., 2015).

Em decorrência da evolução na interação entre endófito-hospedeiro, alguns microrganismos endofíticos produzem metabólitos comuns a seus hospedeiros (STROBEL; DAISY, 2003; SILVA et al., 2016) como relatado nas substâncias vincristina (YANG et al., 2004) e podofilotoxina (PURI et al., 2006). Além disso, existe uma gama de novos compostos bioativos que têm sido isolados de microrganismos endofíticos (GUO et al., 2014; XIE et al., 2016; FORTKAMP, 2018).

Os compostos provenientes de endófitos são valorizados em diversificadas áreas da biotecnologia, como na indústria agroquímica e agropecuária na formulação de pesticidas, nos processos de biorremediação ambiental, na indústria farmacêutica através da busca por antibióticos, antimicóticos, antivirais, antitumorais, antioxidantes, antidiabéticos e imunossupressores (STROBEL, 2018).

Devido à própria natureza da relação endófitos-hospedeiro, estes microrganismos têm mecanismos enzimáticos adequados à degradação de biomassa vegetal (CORRÊA et al., 2014). Constituídos em sua maioria por ascomicetos, são capazes de produzir lignases, peroxidases, lipases, amilases, proteases, asparaginases, pectinaase, xylanases, celulases dentre diversas outras enzimas extracelulares (KHAN et al., 2017) valiosas na rotina industrial.

O gênero *Dalbergia* é descrito na literatura por possuir diversas atividades biológicas, o que justifica seu uso na medicina popular, como é o caso de *D.sisso*, extensivamente estudada por suas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, analgésica, dermatológica, gastrointestinal, antidiabética, antiparasitária, osteogênica, neurais e sua ação no sistema reprodutor (HAJARE, 2000; AL-SNAFI, 2017). Outro exemplo é a *D.odorífera*, promotora de angiogênese através da regulação de vias de sinalização e receptores VEGFs (FAN et al., 2017) e ativadora de queratinócitos contra o fotoenvelhecimento causado pelos raios ultravioletas, através de estimulação da expressão de proteínas P21 e P53 e da supressão de espécies reativas de oxigênio (HAM et al., 2015).

Considerando tais propriedades do gênero *Dalbergia*, a *Dalbergia ecastaphyllum* constitui uma fonte importante para a obtenção de endófitos e prospecção dos bioativos provenientes dessa simbiose. Caracterizada como a principal fonte da resina matéria-prima coletada por *Apis melífera* para a produção da própolis vermelha, cuja composição química difere dos outros 12 tipos de própolis do Brasil (CABRAL et al., 2009), a *D.ecastaphyllum* teve seus extratos e identidade genética investigados.

As atividades antimicrobianas, antioxidantes, citotóxicas, antitumorais, antivirais e anti-inflamatórias de seus extratos estão relacionadas à composição fenólica da planta (FERREIRA; NEGRI, 2019), que possui ácido gálico em todas as suas estruturas e outros componentes como a formonoteína, biochanina A, daídazeína e o 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpana (MELO et al., 2016; LOPEZ et al., 2017).

Considerando a rica biodiversidade brasileira e seu potencial econômico, o conjunto de atividades desempenhadas pelos produtos naturais, e a necessidade crescente de fontes diversificadas de compostos bioativos, a investigação da bioprospecção de fungos endofíticos de *Dalbergia ecastaphyllum* é uma fonte inédita e sustentável para a exploração de recursos naturais, principalmente, quando se considera a íntima relação endófito-hospedeiro. As atividades biológicas descritas para a espécie vegetal e seus produtos sugerem a aptidão de seus endófitos como possíveis fontes de substâncias de interesse biotecnológico.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar e caracterizar fungos endofíticos produtores de compostos bioativos com ação antimicrobiana.
- ✓ Realizar a caracterização enzimática em atividade amilolítica das linhagens endofíticas obtidas.
- ✓ Obter extratos brutos, oriundos de processos de fermentação fúngica de linhagens selecionadas, e caracterizá-los quimicamente.
- ✓ Avaliar os extratos brutos em ensaios biológicos *in vitro* de atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa.

### 3- REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Produtos naturais

As plantas medicinais são consideradas promissoras alvos da pesquisa científica em estudos bioquímicos e farmacológicos, para a obtenção de compostos bioativos com propriedades fundamentais para a indústria farmacêutica na elaboração de novos fármacos. Isso é devido à variedade de moléculas bioativas encontradas na natureza, cuja complexidade supera as moléculas sintéticas ou originárias de combinações químicas (PETSKO et al., 1996; ATANASOV et al., 2015; SHAKYA, 2016).

Essa heterogeneidade de compostos químicos naturais é reflexo da disponibilidade de precursores e de reações biossintéticas ocorridas frente aos desafios do ambiente, bem como das funções biológicas exercidas por esses compostos (GUIMARÃES, 2009; THOMFORD et al., 2018).

Em um estudo sobre agentes terapêuticos aprovados entre 1981 a 2014, Newman; Cragg (2016) apontam que 49% das 175 pequenas moléculas aprovadas em terapia antitumoral, constituem produtos naturais e seus derivados. Destaca-se ainda, que a influência desses produtos foi bastante significativa nas terapias infectocontagiosas devido aos medicamentos derivados de produtos naturais, como os produzidos por microrganismos, ou mesmo de suas interações microbianas com os hospedeiros dos quais foram isolados.

Tanto estruturas de produtos naturais descritas antigamente, quanto estruturas há pouco elucidadas, recentemente foram aprovadas ou estão em fase de testes clínicos, como indica uma análise de agentes terapêuticos aprovados pela FDA nos EUA e seus órgãos equivalentes em outros países, como Canadá, Reino Unido e Japão. Abrangendo o período entre 2010 a 2017, compostos naturais e também seus derivados sintéticos finais foram avaliados, e concluiu-se que os anos de 2016 e 2017 representaram uma recuperação na aprovação dessas substâncias, principalmente quando grande porcentagem dos fármacos aprovados é biológica ou vacinal. Fornecendo informações estruturais para a formulação de novas terapias medicamentosas, especialmente contra doenças infecciosas e câncer, os produtos naturais ainda são viáveis fontes de pesquisa (NEWMAN, 2018).

As justificativas que explicam o êxito dos produtos de origem natural como potenciais geradores de novos fármacos, são a criação de moléculas bioativas em razão da pressão evolutiva da natureza, a diversidade química e a semelhança estrutural de alvos proteicos nas diferenciadas espécies (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Diante deste cenário, um aspecto da pesquisa de produtos naturais, a pesquisa de microrganismos endofíticos produtores de substâncias bioativas, torna-se uma ferramenta importante para a obtenção de novas moléculas.

### **3.2 Microrganismos endofíticos**

Os microrganismos endofíticos constituem fungos e bactérias que habitam o interior das plantas (folhas, caule e raízes), geralmente sem prejudicarem seus hospedeiros. A associação do endófito à planta hospedeira se dá pela penetração em aberturas naturais como os estômatos, feridas causadas por insetos e fitopatógenos, através das sementes, e ainda, pela produção de enzimas facilitadoras pelo endófito, caracterizando a entrada ativa. Após a entrada, ocorre sua disseminação pelos tecidos vegetais colonizando seu hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Estima-se que os endófitos estejam associados a hospedeiros vegetais por mais de 400 milhões de anos, sendo reportados pela primeira vez no século XIX. Seu conceito passou por atualizações ao longo dos anos, à medida que as interações entre as plantas e sua microbiota foram mais bem esclarecidas. No final da década de 70, esses microrganismos despertaram o interesse científico em razão das descobertas sobre suas funções na manutenção da vida de seus hospedeiros, como praguicidas naturais, protetores contra herbivoria, produtores de fatores de crescimento e toxinas, e potencial farmacêutico e biotecnológico (KRINGS et al., 2007; SUN; GUO, 2012).

De acordo com Conti; Guimarães; Pupo (2012), os organismos complexos fornecem *habitats* nutricionalmente ricos aos microrganismos endofíticos, que se mantêm protegidos enquanto produzem compostos biológicos ativos usados na defesa de seus hospedeiros, resultando em uma complexa interação simbiótica da planta com o endófito durante sua evolução. Como consequência dessa relação estreita de simbiose, os microrganismos desenvolveram ferramentas genéticas para

a transferência de informações entre si e a planta hospedeira (GALLO; GUIMARAES, 2008).

Tais fatores valorizam a pesquisa de endófitos na prospecção de moléculas bioativas, uma vez que há a possibilidade, em alguns casos, de serem competentes em produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da espécie vegetal hospedeira. Durante a relação simbiótica, através da transferência horizontal genética, o receptor de genes começou a exercer as mesmas reações biossintéticas de seu doador durante o processo de coevolução (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; CUI et al., 2019).

Uma única espécie vegetal pode abrigar vários endófitos bacterianos e fúngicos, entretanto, existe uma relação de especificidade endófito-hospedeiro, fazendo com que haja comunidades microbianas dominantes, indicando influência mútua em decorrência da evolução associativa (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

A doação de genes pode ocorrer quando os diferentes organismos estão associados de forma íntima, ou também em contato regular entre si, dessa forma, são consideradas fontes para a transmissão horizontal genética, assim como as relações de simbiose, as patogênicas e epifíticas entre a planta e organismos não vegetais (BOCK, 2010).

Na planta hospedeira, todos os três compartimentos genéticos (núcleo, mitocôndria e plastídio) participam da transmissão dos genes, permitindo ao vegetal incorporar, por exemplo, genes envolvidos em rotas metabólicas, transmitidos pela troca de DNA viral, bacteriano, fúngico e até mesmo com outra espécie vegetal (BOCK, 2010).

Os metabólitos secundários de microrganismos são produzidos em funções fisiológicas específicas, sociais ou predatórias, relacionadas com a ecologia dos organismos, além de serem onipresentes em diversos *habitats* (solo, água, rochas), organismos (vegetais e animais) e condições ambientais (temperatura, pH, salinidade, oxigenação) (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

A produção de metabólitos pelos endófitos está intimamente relacionada a fatores fisiológicos do hospedeiro e às condições ambientais que afetam diretamente seus padrões de crescimento, reprodução e metabolismo, que são determinantes para que esses metabólitos tenham potencial de uso na elaboração de fármacos. Em condições de adversidade climática e metabólica da planta hospedeira (baixa respiração, pH inadequado), apenas alguns endófitos obterão sucesso na

colonização (JIA et al., 2016). Em contrapartida, em um clima de baixo sol anual e alta umidade, a planta produz mais nutrientes, favorecendo a colonização (WU et al., 2013).

### 3.3 Aplicações dos endófitos em biotecnologia

Os endófitos são responsáveis por importantes funções no hospedeiro vegetal: defesas contra *stress* abiótico (através da produção de compostos antioxidantes contra fatores nocivos como extremos de salinidade e temperatura); contra *stress* biótico (produção de substâncias contra predadores e antimicrobianos); e promoção de crescimento por meio de suporte nutricional (disponibilidade de ferro, fósforo e nitrogênio) e hormonal (BACON; WHITE, 2016). Por tantas atividades descritas, são muitas as aplicações desses microrganismos na biotecnologia.

Em um estudo sobre as respostas mediadas por fungos endofíticos de grama após o acometimento de herbivoria, Fuchs et al (2017) evidenciaram pela primeira vez, um acréscimo da produção de alcaloides defensivos provenientes da interação endófito-hospedeiro, através de indução específica pela herbivoria. Esses resultados sugerem um “crosstalk” químico na relação simbiótica na presença de herbívoros, levando à produção de alcaloides tóxicos para o predador. Esse modelo experimental esclarece mais amplamente as interações endofíticas e também cria alternativas para o controle de herbívoros na agricultura.

Os endófitos destacam-se ainda como controles biológicos de insetos-praga, como por exemplo, o endófito do milho *Beauveria bassiana*, que recentemente foi utilizado como entomopatógeno em áreas produtoras de café na Guatemala, reduzindo em testes experimentais, 90% da população de *Ceratitis capirata* (a mosca do Mediterrâneo), uma praga que ameaça a cultura cafeeira dentre outras (TOLEDO et al., 2017).

Existem muitos mecanismos, diretos e indiretos, pelos quais os endófitos promovem o crescimento do hospedeiro vegetal. A facilitação de obtenção de precursores do ambiente, modulação de fitormônios como a citocinina, auxina e etileno, tal como a defesa contra danos diretos por patógenos, são realizadas principalmente por bactérias endofíticas promotoras de crescimento (SANTOYO et al., 2016).

A bactéria endofítica *Bradyrhizobium* sp., promotora de crescimento em

culturas de arroz, exemplifica a aplicação biotecnológica, seus genes e vias metabólicas foram investigados a fim de determinar melhores condições para estimular o crescimento da espécie vegetal (GREETATORN et al., 2019).

Os endófitos constituem alternativas para a biorremediação em circunstâncias de danos ambientais. A bactéria endofítica *Burkholderia cepacia* VM1268 é capaz de degradar o tolueno, através do plasmídeo pTOM-Bu61, que mantém essa função constitutivamente expressa. Esse plasmídeo foi transferido horizontalmente para diferentes comunidades endofíticas, na ausência ou presença de tolueno, de forma bem sucedida, demonstrando ser uma ferramenta valiosa na fitorremediação de canais aquáticos subterrâneos contaminados com solventes (TAGAHAVI et al., 2005; THUIS et al., 2016; DOTY et al., 2017).

O gênero de bactérias endofíticas *Streptomyces* spp. tem um destaque em termos de espectro de atividades desempenhadas na relação endófito-hospedeiro, uma das capacidades relacionadas ao gênero é a biodegradação de petróleo. Isolado de plantas que se desenvolveram em regiões onde o solo foi contaminado com o poluente, além da promoção de crescimento, a linhagem *Streptomyces* Hlh9 é capaz de degradar 98% de petróleo (BAOUNE et al., 2018).

Outros gêneros desenvolvem papéis semelhantes como a *Pantoea* spp., análises de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal, revelaram diferenças estruturais significativas entre as comunidades endofíticas de solos contaminados com hidrocarbonetos e não contaminados. Contudo, não houve diferenças em capacidades funcionais entre os dois grupos, excluindo a influência do ambiente contaminado para a capacidade de degradação (LUMACTUD; FULTHORPE, 2018).

Através do cultivo de células microbianas e de processos de fermentação, os microrganismos são fontes na obtenção e produção industrial de enzimas. Fatores como a facilidade de manutenção, melhor tempo de produção e a heterogeneidade de enzimas produzidas, principalmente por *Aspergillus* sp. (CORRÊA, 2014), tornam a investigação da capacidade de produção enzimática um campo promissor na busca por bioativos naturais.

As amilases são enzimas de ampla utilização, não apenas na indústria farmacêutica, mas também nas indústrias de alimentos, através de processos de sacarificação de amido e panificação, nas indústrias têxteis e produtoras de papel, no tratamento de poluentes e na demanda por processos industriais mais

sustentáveis quanto ao consumo de energia (ORLANDELLI et al., 2012).

Essas enzimas são úteis na produção de biocombustíveis como o etanol (MORAIS et al., 2015; BASTOS et al., 2015; ROSSETO et al., 2017; SANTOS, 2017), produto que gera entusiasmo científico e governamental, por ser uma fonte ecologicamente mais sustentável em relação ao petróleo (MUSSATO et al., 2010; PIETRZAK; KAWA-RYGIELSKA, 2019; SHAHRYARI et al., 2019).

As catálises realizadas por enzimas microbianas são mais rápidas do que as que ocorrem por catálises químicas e suas condições de reação ocorrem brandamente em relação ao pH, temperatura e tipos de solventes utilizados (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2012).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular, otimização da fermentação e melhoramento genético, podem proporcionar comercialmente alta produtividade com menor custo. O processo de biotransformação também implica menor necessidade energética, uma vez que dispensa a necessidade de condições extremas de crescimento e subprodutos indesejados. As reações costumam ocorrer em temperatura ambiente, com menor emissão de detritos industriais, pois geram resíduos biodegradáveis (BICAS; DIONISIO; PASTORE, 2009; NAIK, 2019).

No séc. XX, os endófitos ganharam visibilidade na indústria farmacêutica através do composto antitumoral citotóxico Taxol® (paclitaxel). Inicialmente extraído de plantas do gênero *Taxus* spp. e de alto valor comercial, sua síntese também ocorre pelo endófito *Taxomyces andreanea*. O fármaco liga-se a tubulina polimerizada, promovendo a estabilização dos microtúbulos, impedindo a dissociação, e conseqüentemente, a divisão celular mitótica (SOLIMAN; RAIZADA, 2018; MCELROY; JENNEWEIN, 2018).

Atividades antiparasitárias são descritas para muitas espécies endofíticas, das quais substâncias caracterizadas sugerem novas abordagens terapêuticas contra *Plasmodium* spp (TOGHUEO et al., 2019), *Leishmania* spp e *T.cruzi* (LENZI et al., 2018).

O já mencionado gênero *Streptomyces* spp., produz metabólitos contra patógenos humanos (EK-RAMOS et al., 2019). Diferentes cepas do gênero, obtidas de diversos hospedeiros vegetais, produzem compostos antivirais como a xiamicina, ativa contra o vírus HIV (DING et al., 2010; CHEN et al., 2018); antibacterianos (PRATIWI et al., 2018); e antifúngicos (JAKUBIEC-KRZESNIAK et al., 2018).

Compostos antioxidantes são sintetizados pela planta hospedeira e sua microbiota endofítica frente à geração de radicais livres, a fim de sobreviver às condições de estresse (WAQAS et al., 2015; SIAH et al., 2018). Eles são apontados como uma estratégia à utilização de antioxidantes sintéticos, que encontram restrições por menor disponibilidade e maiores efeitos colaterais. Pestacinas, isopestacinas, flavipinas e compostos fenólicos fazem parte dos antioxidantes produzidos por endófitos (GOUTAM et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

São numerosos os compostos antimicrobianos obtidos de fungos endofíticos. A urgência no combate a patógenos multirresistentes aumenta proporcionalmente, conforme se tornam limitadas as opções terapêuticas para microrganismos com resistência conhecida como *S.aureus* metilina resistente (MRSA), *Pseudomonas* spp., *E.coli*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus* spp vancomicina resistente (VRE), *Acinetobacter* spp. (DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2015; HAWKEY, 2015; PRESTERL et al., 2019), e novos patógenos, como o fungo multirresistente *C.auris* (CHOWDHARDY; SHARMA; MEIS, 2017; JEFFERY-SMITH et al., 2018; DOMINGUEZ et al., 2019).

### 3.4 Gênero *Dalbergia*

Pertencente à família Fabaceae (Papilionoidae), o gênero *Dalbergia* é caracterizado por árvores, arbustos e trepadeiras com caules lenhosos, predominantes de regiões tropicais e subtropicais (CARDOSO et al., 2013; HARTVIG et al., 2015).

O gênero, proveniente do continente africano, é influenciado por condições climáticas e ecossistêmicas durante sua evolução, e consiste em aproximadamente 250 espécies, das quais 38 estão em território brasileiro, encontradas nos biomas Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e campos rupestres (CAMARGO, 2005; YIN et al., 2018).

Espécies de *Dalbergia* possuem madeiras de lei, ricas em óleos essenciais, valorizadas pela decoração e aroma, são conhecidas como Jacarandás, tendo importância econômica citada na literatura desde o Brasil Colonial (ROUT et al., 2003). As madeiras dos Jacarandás são densas, não porosas e duradouras, servindo de matéria-prima na produção de móveis, instrumentos musicais e peças de arte (HASSOLD et al., 2016).

A exploração demasiada de algumas espécies fez com que alguns países criassem medidas de proteção contra o comércio ilegal da madeira, na Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens Ameaçadas de Extinção (CITES) (BARRET et al., 2010; NITHANIYAL et al., 2014).

Parte do controle legal para o comércio da madeira inclui identificação morfológica, microscópica e química das espécies (YU et al., 2016; WANG et al., 2016). Essa medida também atraiu a atenção de pesquisadores por métodos moleculares de identificação e criação de bancos de dados sobre as espécies do gênero *Dalbergia* (BHAGWAT et al., 2015; LI et al., 2017).

Dentre as aplicações medicinais, pode-se citar ação analgésica, antimicrobiana, anti-helmíntica, anti-inflamatória, antidiarreica e antiulcerogênica (VASUDEVA et al., 2009). Há também relatos de ação expectorante, abortiva, no tratamento de doenças de pele, obesidade e sífilis (SHAH; MUKHTAR; KHAN, 2010). O quadro 1 apresenta algumas das atividades biológicas e farmacológicas conhecidas das espécies de *Dalbergia*.

**Quadro 1.** Atividades biológicas e farmacológicas das espécies de *Dalbergia* descritas na literatura.

<b>Espécie</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
<i>D. saxatilis</i> <i>D. hórrida</i> <i>D. lanceolaria</i>	Analgésica	YEMITAN;ADEYEMI, 2017 NARAYANAN et al., 2007 MISAR et al., 2005
<i>D. odorifera</i> <i>D. odorifera</i> <i>D. sisso</i> <i>D. lanceolaria</i>	Anti-inflamatória	KIM et al., 2017 LEE et al., 2014 BHATTACHARYA; SINGH RAMRAKHYANI; 2014 KALE et al., 2007
<i>D. velutina</i> <i>D. sisso</i> <i>D. spinosa</i>	Antitumoral	KAENNAKAM ; SIRIPONG ; TIP-PYANG 2017 PRADIP et al., 2014 SAHA et al., 2013
<i>D. sisso</i> <i>D. lanceolaria</i>	Antidiarreica	BRIJESH et al., 2006 MUJUMDAR;MISAR;UPA DHYE, 2005
<i>D. stipulacea</i>	Antidiarreica e anti-helmintica	ULLA et al., 2015
<i>D. brasiliensis</i> <i>D. oliveri</i> <i>D. sisso</i>	Larvicida	DALARMI et al., 2015 PLUEMPANUPAT et al., 2013 ANSARI et al.,2000
<i>D. odorifera</i>	Antiplaquetária	YU et al., 2017
<i>D. sisso</i>	Antipirética	HARJARE et al.,2000
<i>D. boehmii</i> <i>D.ecastaphyllum</i> <i>D. cultrate</i>	Anti-leishmania	ABDOU et al., 2017 ARAUJO et al., 2014 TAKAHASHI et al., 2004
<i>D. sisso</i> <i>D. saxalitis</i>	Antiplaquetária	VERMA;SINGH, 2014 UCHENDU.KAMALU; ASUZU, 2000

Fonte: Autora.

### **3.5 *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.**

*Dalbergia ecastaphyllum* é uma espécie distribuída pela costa do Continente americano, do sul da Flórida (EUA) ao sul do Brasil e na costa ocidental africana, associada a regiões de estuário, leitos de rios e manguezais, onde é bem adaptada à alta salinidade do ambiente e seus ramos e caules fixam na areia (DE CARVALHO, 1997; E SILVA; DOS SANTOS, 2009). Apresenta crescimento moderado no início, os indivíduos mais velhos crescem cerca de 2,5 metros por ano, formando moitas densas em locais em que há constante vaporização de sal (SOUZA, 2010).

A espécie é conhecida popularmente como rabo-de-bugio, rabo-de-macaco, marmelo-do-mangue, marmeleiro-da-praia e moeda-de-videira (CAMARGO, 2005; SILVA et al., 2008).

Na República do Senegal na África Ocidental, suas folhas foram utilizadas em banhos e preparados inalatórios para terapia, enquanto índios americanos usavam as cascas e raízes na pesca, pois possuem substâncias entorpecentes que facilitam a captura de peixes. Já na medicina tradicional, há relatos do uso de extratos como eméticos, vermífugos e diuréticos, embora pudessem apresentar toxicidade para determinados tecidos (FRANCIS, 2004).

A *D.ecastaphyllum* é a principal fonte de resina para a produção da própolis vermelha brasileira. A própolis é proveniente de uma região de mangue do Estado de Alagoas no Brasil, sendo classificada como o 13º tipo de própolis brasileira, devido à sua intensa coloração vermelha, possuindo várias atividades biológicas e composição química diferenciada em relação aos outros 12 tipos de própolis já conhecidos no Brasil (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; MENDONÇA-MELO et al., 2017).



**Figura 1.** *Dalbergia ecastaphyllum* L.Taub

Fonte: <http://www.plantsystematics.org>.



**Figura 2.** *Apis mellifera*: recolhimento da resina vermelha de *D. ecastaphyllum* para a produção da própolis vermelha.

Fonte: <http://www.ufal.edu.br>

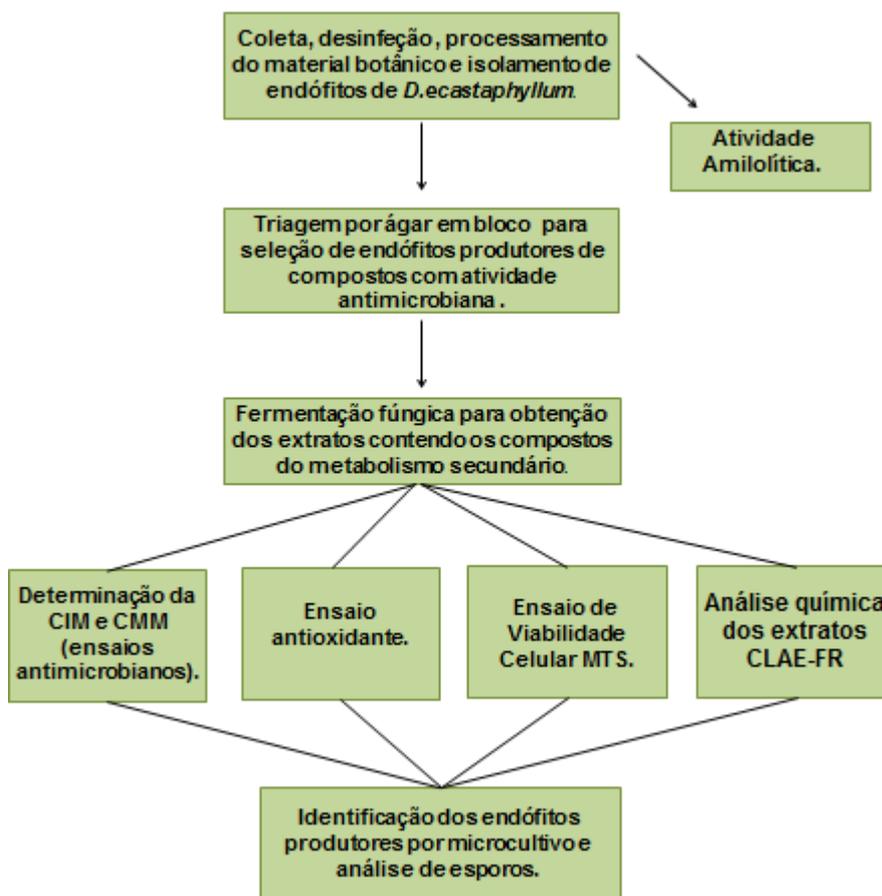
A própolis vermelha demonstrou alta atividade antioxidante, antibacteriana e sub-frações biologicamente ativas (CABRAL et al., 2009). Estudos constatam que a própolis vermelha e a *D.ecastaphyllum* possuem constituições químicas semelhantes. Análises da resina revelaram a presença de flavonoides luteonina, pinocembrina, rutina e isoliquiritigenina (DAUGSCH et al., 2008).

A diversidade de moléculas na própolis vermelha permite a diferenciação entre os demais tipos de própolis, sendo relatadas como substâncias principais: elemicina, formononetina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, biochanina A, medicarpina, homopterocarpan, quercetina e vestitol (DOS SANTOS et al., 2019).

Na planta, há os isoflavonoides 2'-hidroxi-5'-metoxibiochanina A e biochanina A, observados pela primeira vez no gênero e na espécie respectivamente. Os triterpenos também são comuns como a friedelina, lupano e oleano, e outros compostos químicos como a dalbergina, daidizeína, formononetina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, medicarpina e o principal 3-hidroxi-8,9-dimetóxipterocarpana (SILVA et al., 2008; SOARES, 2012; MELO et al., 2016; MACIEL et al., 2019).

## 4- MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia geral é apresentada no fluxograma a seguir:



**Figura 3.** Fluxograma da metodologia.

Fonte: Autora.

### 4.1 Coleta, desinfecção e processamento do material botânico e isolamento de endófitos de *D. ecastaphyllum*

#### 4.1.1 Coleta

Um total de 60 folhas de *D. ecastaphyllum*, sem indícios aparentes de fitopatologias ou danos causados por insetos/ herbivoria, foi coletado no município de Canavieiras-BA em dois pontos: Ponto 1 Latitude: -15.676664S; Longitude: -38.939320W; e Ponto 2 Latitude: -15.664407S; Longitude: -38.98015W.

A coleta foi realizada em novembro/2017 pelo colaborador Daniel Vieira de Moraes, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências do Centro de

Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP).

Para acesso ao material botânico, essa pesquisa foi devidamente cadastrada (Cadastro A9A52D7) junto ao Ministério do Meio Ambiente no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), conforme Lei Nº 13.123/2015, dados disponíveis no Anexo 1.

Subsequentemente a coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos para amostragem, vedados da entrada de ar, e levadas à uma caixa térmica contendo gelo, até sua chegada no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas-MG, no dia posterior à coleta.

#### **4.1.2 Desinfecção e processamento do material botânico**

As folhagens foram lavadas sob água corrente e divididas em dois grupos com 30 folhas cada: grupo 1- desinfecção superficial com etanol 70% (v/v) por 2 minutos; e grupo 2- desinfecção superficial com etanol 70% (v/v) por 4 minutos. Tais tempos de desinfecção foram determinados de acordo com metodologias utilizadas para o isolamento de endófitos de espécies vegetais predominantes em regiões de mangue e conforme a espessura das folhas (SCHULZ et al., 1993; POLONI et al., 2014; SEBASTIANES; DE AZEVEDO; LACAVA, 2017), uma vez que não havia informações sobre protocolos de desinfecção suficientemente na literatura para a espécie.

Posteriormente, ambos os grupos foram imersos em hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos, depois em etanol 98% (v/v) por 30 segundos, e por fim, lavadas em água destilada. As folhas seguiram para a secagem em câmara de fluxo laminar (PETRINI et al., 1993). Como controle da esterilização para microrganismos epifíticos, a água destilada da última etapa de lavagem na desinfecção superficial foi semeada em placas de Petri (90 mm) contendo ágar ABD, em duplicata para cada um dos grupos (2 e 4 minutos de desinfecção com etanol 70% (v/v)). As placas seguiram para incubação por 20 dias em estufa BOD a 25°C.

#### **4.1.3 Isolamento de fungos endofíticos de *D.ecastaphyllum***

Fragmentos de cada uma das 60 folhas coletadas, desinfetadas e secas, com tamanho de 5 mm x 5 mm, foram obtidos por secção com bisturi estéril.

Posteriormente, foram semeados em número de 5 fragmentos por placa de Petri (90 mm) contendo ágar MA2 (extrato de malte 2%, ágar 2%). As placas foram incubadas em estufa BOD a 25°C e observadas quanto ao crescimento dos endófitos a partir dos fragmentos vegetais por cerca de 20 dias.

As colônias fúngicas obtidas foram transferidas individualmente para o isolamento em placas de Petri (90 mm) com ágar ABD. A taxa de colonização fúngica foi analisada por avaliação macroscópica dos microrganismos isolados, levando em consideração a quantidade de fragmentos vegetais com crescimento fúngico, dividido pela quantidade total de fragmentos vegetais utilizados (ARAÚJO et al., 2010).

#### **4.2 Atividade amilolítica**

Para cada endófito obtido, foi preparada uma placa de Petri contendo meio ágar malte 2% suplementado com 1% de amido solúvel. Após a semeadura e crescimento das colônias fúngicas, por aproximadamente 5 dias, foi adicionado ao meio 10 mL de solução de iodo. Após completa dispersão da solução na placa, a presença de um halo incolor periférico a colônia indicou a produção da enzima amilase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

#### **4.3 Triagem de atividade antimicrobiana por ágar em bloco**

Os endófitos produtores de antimicrobianos foram selecionados por meio de triagem através da metodologia do ágar em bloco (ICHIKAWA et al., 1971) com modificações. Inicialmente cada um dos endófitos obtidos foi crescido em placas de Petri (90 mm) contendo ágar ABD.

Placas de ágar Müeller Hinton e Sabouraud (90 mm) foram preparadas, nas quais foram semeadas individualmente e uniformemente com auxílio de *swab* cepas teste de *S.aureus* ATCC 6538; *E.coli* ATCC 25922 e *C.albicans* ATCC 10231, preparadas previamente em solução salina estéril 75%, cuja transmitância em 660 nm equivale a  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

Com auxílio de furadores estéreis, 10 mm dos blocos de ágar ABD com crescimento fúngico, foram transferidos para as placas de Müeller Hinton contendo as cepas teste. As culturas fúngicas foram transferidas com os micélios voltados

para cima, e depois de fixados os blocos, as placas foram incubadas em geladeira por 20 minutos, para permitir a difusão dos metabólitos em meio de cultura sólido e equalizar o crescimento dos microrganismos.

As placas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h e posteriormente foram aferidos os halos de inibição ao redor dos blocos fúngicos, cujo diâmetro foi medido para cálculo das médias e desvio padrão. Como controle o mesmo procedimento foi realizado com blocos de ágar ABD sem a presença dos micélios fúngicos.

#### **4.4 Fermentação, extração e concentração de metabólitos bioativos**

Os endófitos selecionados na etapa de triagem pela metodologia do ágar em bloco, de acordo com a especificidade e capacidade de inibição em meio sólido, seguiram para a fermentação líquida para a obtenção de seus produtos.

A partir dos isolados fúngicos crescidos em ABD, 5 mm das bordas das colônias foram cortadas e transferidas para frascos Erlenmeyer de 1 L com 200 mL de caldo Czapek (RAPER; FENNELL, 1965).

Após incubação em estufa BOD 25°C por 20 dias, os micélios fúngicos foram separados do caldo de fermentação por filtração a vácuo. O caldo de fermentação foi submetido a 4 extrações em acetato de etila (1:1), das quais o solvente foi removido por evaporação rotativa a vácuo e a fase orgânica coletada.

O controle negativo de extração consistiu em Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de caldo Czapek, submetido a 4 extrações em acetato de etila (1:1) com fase aquosa descartada e fase orgânica submetida a rotaevaporação a vácuo para secagem.

#### **4.5 Atividade antimicrobiana**

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio de cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) e CDC (*Center for Diseases Control and Prevention*), cedidas gentilmente pelos Laboratórios de Microbiologia e Alimentos e de Microbiologia Básica da UNIFAL-MG.

Foram determinadas as atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas: *S.aureus* ATCC 6538, *B. cereus* ATCC 11778, *S.epidermidis* ATCC 12228,

*S.aureus* (MRSA) ATCC 6538, *L.monocytogenes* CDC 4555 e *L.acidophilus* ATCC 4356; bactérias Gram-negativas: *E.coli* ATCC 25922, *S.typhimurium* ATCC 6017 e *P.aeruginosa* ATCC 27853; e leveduras: *C.albicans* ATCC 10231, *C.parapsilosis* ATCC 2209, *C.glabrata* ATCC 90030, *C.tropicalis* ATCC 750 e *C.krusei* ATCC 6258.

#### 4.5.1 Determinação da CIM

A concentração inibitória mínima (CIM) foi aferida através de placas de 96 poços pelo método de microdiluição em caldo, conforme os protocolos M07-A11 para bactérias (CSLI, 2018) e M27 para leveduras (CLSI, 2017), desenvolvidos pelo *Clinical Laboratory Standardization Institute*.

Os extratos solubilizados em etanol absoluto foram avaliados nas concentrações de 800 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL.

Foram aplicados 180 µl de meio de cultura nas microplacas (Müerller Hinton para bactérias e RPMI para leveduras) na linha A colunas 1 a 10, e posteriormente foram adicionados 20 µl de cada extrato em duplicata. A primeira linha constituiu o controle de cor das amostras.

Na linha B colunas 1 a 10, foram adicionados 160 µl dos meios de cultura e 40 µl dos extratos em duplicata. A partir dessa linha foi feita a diluição seriada através da remoção de 100 µl dessa solução, que foram adicionados às linhas seguintes (C a H colunas 1 a 10) que continham 100 µl de meio de cultura, sendo os últimos 100 µl da diluição desprezados.

A partir da linha B, foram adicionados 80 µl de meio de cultura após a diluição, e por fim 20 µl da suspensão microbiana.

A coluna 11 foi utilizada para avaliação dos antimicrobianos, sendo aplicados 180 µl do meio de cultura e 20 µl do antimicrobiano na linha A. A solução foi diluída (100 µl) para as linhas seguintes que continham 100 µl de meio de cultura, e posteriormente adicionados 20 µl das suspensões microbianas.

A última coluna de número 12 foi dividida em duas partes: controle de esterilidade dos meios de cultura, no qual 200 µl dos meios foram adicionados a 4 poços; e controle de crescimento microbiano, no qual foram adicionados 180 µl de meio de cultura e 20 µl da suspensão microbiana em 4 poços.

Separadamente foi realizado o controle negativo do solvente, onde os extratos

foram substituídos por etanol absoluto, nas mesmas diluições em meio de cultura, e posteriormente foram adicionados 20 µl de cada suspensão microbiana.

As suspensões microbianas utilizadas foram obtidas após cultura de 24h e preparadas em solução salina cuja turbidez foi avaliada em espectrofotômetro 75% de transmitância em 660 nm, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

Os antimicrobianos testados foram: Amoxicilina (Gram-positivas) e Estreptomicina (Gram-negativas) nas concentrações de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,312 µg/mL, 0,156 µg/mL e 0,078 µg/mL. Para as leveduras foi usado o Fluconazol nas concentrações 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL e 0,625 µg/mL.

As microplacas seguiram para incubação em estufa bacteriológica 35°C por 24h. A leitura visual foi realizada e 40 µl do indicador resazurina (Sigma Aldrich®) foram aplicados em cada poço da microplaca.

#### **4.5.2 Determinação da CMM**

Com a revelação e aferimento da CIM, as suspensões dos poços nos quais foram observadas inibições foram utilizadas para determinar a atividade microbicida. Foram inoculados 10 µl dessas suspensões em placas de meio sólido contendo ágar Müeller Hinton (bactérias) ou ágar Sabouraud (leveduras), em triplicata.

Após incubação em estufa bacteriológica a 35°C por 24h, foram determinadas as concentrações microbicidas mínimas (CMM), consideradas as menores concentrações dos extratos que inviabilizaram o crescimento microbiano na superfície do meio de cultura.

#### **4.6 Atividade antioxidante**

De acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams Cuvelier e Berset (1995), foi determinada a atividade antioxidante dos extratos dos endófitos de *D. ecastaphyllum*. Foram adicionados 2,0 mL dos extratos a 90 µg/mL em etanol e 0,5 mL de uma solução de DPPH a 0,5 mMol. Após 45 minutos de incubação em temperatura ambiente e proteção de luz, a absorbância das soluções foi obtida em 517 nm. Os padrões usados foram ácido ascórbico e BHT.

A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante

(AA), calculada por meio da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH após 45 minutos de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol) de acordo com a fórmula abaixo. O resultado foi expresso como % de atividade antioxidante. Todos os ensaios serão realizados em triplicata, expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados serão avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) utilizando-se o *software* Sisvar versão 5.6.

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) * 100 / A_{\text{controle}}] \text{ onde:}$$

$A_{\text{amostra}}$  = absorbância da solução DPPH (amostras).

$A_{\text{branco}}$  = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH.

$A_{\text{controle}}$  = absorbância da solução referência de DPPH (etanol).

#### 4.7 Ensaio de viabilidade celular

Através da metodologia MTS e por exclusão pelo azul de tripano, a viabilidade celular foi avaliada *in vitro* no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL-MG, com a colaboração da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Ionta.

##### 4.7.1 Viabilidade celular por MTS

As linhagens celulares utilizadas foram adenocarcinoma de mama (MCF 7), carcinoma pulmonar (A549), melanoma (HT144) e carcinoma hepatocelular (HepG2), mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa 37°C com atmosfera controlada (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>). Como controle positivo foi usado Cisplatina.

Em placa de 96 poços as células foram semeadas em densidade (célula/poço) de  $1,0 \times 10^4$ . Depois do período de 24h de aderência as células foram tratadas por 48h com os extratos em diferentes concentrações, provenientes de uma solução estoque feita em DMSO, diluída em meio de cultura DMEM.

Após o tratamento foram adicionados 15 $\mu$ l de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-

(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sufofenil)-2H-tetrazolium] em cada poço e a placa incubada a 37°C por 4h, seguida de leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 490 nm.

A viabilidade celular foi determinada entre as culturas tratadas e não tratadas, uma vez que os valores de absorvância são diretamente proporcionais ao número de células vivas na amostra. Os testes foram realizados em triplicata e foram determinados os valores de IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir o crescimento celular em 50%).

#### **4.7.2 Viabilidade celular por exclusão de azul de tripano**

Em uma densidade de 8x10<sup>4</sup> célula/poço as células foram semeadas em placa de 24 poços. Após período de 24h de adesão, células HT144 foram tratadas com ácido fusárico em concentração de 60 µg/mL em períodos de 24, 48 e 72h. Foi realizada a contagem celular na presença do corante azul de tripano (0,4%) em hemocítmetro com auxílio de microscopia de fase. O experimento foi feito em triplicata e os resultados expressos em média e desvio padrão.

#### **4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)**

O método utilizado para a realização das análises por CLAE em fase reversa é descrito por Alencar et al. (2007). Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu Co) com detector de arranjo de fotodiodos e coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) e partícula de tamanho de 5µm. A fase móvel usada foi água: Solvente A (ácido acético 99,5/0,5 v/v) e Solvente B (metanol) com vazão constante de 0,8 mL/min.

Vinte microlitros de cada extrato foram injetados no cromatógrafo, o gradiente iniciou com 30% até 40% do solvente B em 15 minutos; 50% de B em 30 minutos; 60% de B em 45 minutos; 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos; 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos.

A temperatura da coluna foi mantida constantemente em 30°C e o processamento dos cromatogramas foi realizado pelo software Class-VP. Através da comparação do tempo de retenção e co-cromatogramas dos padrões, os compostos foram identificados pelo espectro de absorção em região ultravioleta por meio do detector de arranjo de fotodiodos.

Os padrões (Sigma Aldrich®) utilizados foram: ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido p- cumarínico, ácido siríngico, ácido vanílico, acacetina, apigenina, artepilin C, biochanina A, catequina, daidzeína, epicatequina, formanetina, galangina, hesperidina, isoliquitirigenina, kaempferol, naridina, pinocembrina, protocachuic, quercetina, resveratrol e rutina.

#### **4.9 Caracterização dos endófitos por microcultivo**

A identificação primária dos endófitos foi realizada segundo o Manual da Anvisa MOD. VII de 2004 para a identificação de fungos filamentosos (BRASIL, 2004). Foram observados os aspectos morfológicos, microscópicos e padrões de esporulação (hifas hialinas, demáceas, septadas ou cenocíticas). Em placa de Petri estéril foram colocadas lâminas estéreis, nas quais foram depositados blocos de ágar ABD. Após semeadura dos endófitos nos meios de cultura, foram recobertos com lamínulas. Uma câmara úmida foi feita com 1 a 2 mL de água em papel filtro na base do sistema e após o crescimento em 3, 5, 7 e 9 dias as lamínulas foram coradas com azul de lactofenol-algodão em objetiva de 40x. Através do microcultivo de fungos filamentosos foi realizada consulta das estruturas de esporulação observadas em referências bibliográficas como atlas, manuais e textos para a identificação do gênero dos endófitos.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Coleta, desinfecção e processamento do material botânico e isolamento de endófitos de *D.ecastaphyllum*

Foram analisados 300 fragmentos das folhas, dos quais foram obtidos 150 fungos endofíticos (frequência de isolamento de 50%). A coleta de 60 folhas de diferentes indivíduos da espécie *D.ecastaphyllum* foi realizada na primavera, período apontado por alguns autores como a época do ano que propicia maior obtenção de endófitos (GAO et al., 2005; GORE; BUCAK, 2007; SADEGHI et al., 2019). Essa constitui a primeira evidência de que a *D.ecastaphyllum* é colonizada por microrganismos endofíticos.

A ausência de bactérias endofíticas nos isolados a partir das folhas, não extingue a possibilidade de que a espécie vegetal seja habitada por tais microrganismos nas folhas ou outros tecidos. As necessidades bacterianas podem não incluir os meios de cultivo usados nesse experimento e métodos independentes de cultivo, recomendados para microrganismos não passíveis de cultivo, não foram empregados (SUN; GUO, 2012).



**Figura 4.** *Dalbergia ecastaphyllum* no Município de Canavieras-BA. Foram utilizadas as folhas para o isolamento dos endófitos.

Fonte: Colaborador Daniel Vieira de Moraes, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP).



**Figura 5.** Colônias fúngicas produzindo micélios do interior dos fragmentos das folhagens de *D.ecastaphyllum*.

Fonte: Autora.

Em razão da escassez de registros literários sobre o isolamento de endófitos em *D.ecastaphyllum*, dois protocolos de desinfecção superficial do material botânico foram estipulados, levando em consideração a espessura das folhas e *habitat* da espécie vegetal. No primeiro grupo com submersão em etanol 70% (v/v) por 2 minutos, foram obtidos 66 fungos endofíticos (44%), enquanto para o tempo de submersão em etanol 70% (v/v) por 4 minutos, foram isolados 84 fungos endofíticos (56%).

Foi realizado um T-test no software R Statistical versão 3.5.0 para comparação entre as duas médias de isolamento e uma análise de variância, para determinar se os tempos de desinfecção superficial constituíram fatores diferenciais para a quantidade de isolamentos entre os dois grupos:

```
> amostra1 = c(2,7,0,3,4,3,1,1,2,5,1,3,3,2,0,0,2,4,5,2,0,0,0,0,0,3,4,3,2,4)
> amostra2 = c(2,3,5,4,5,3,3,0,4,3,5,0,0,2,2,2,0,4,1,2,3,3,2,5,5,3,3,3,3,4)
> amostra1
[1] 2 7 0 3 4 3 1 1 2 5 1 3 3 2 0 0 2 4 5 2 0 0 0 0 0 3 4 3 2 4
> amostra2
[1] 2 3 5 4 5 3 3 0 4 3 5 0 0 2 2 2 0 4 1 2 3 3 2 5 5 3 3 3 3 4
> t.test(amostra1,amostra2,alternative="two.sided")
```

#### Welch Two Sample t-test

```
data: amostra1 and amostra2
t = -1.367, df = 56.199, p-value = 0.1771
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.4791774  0.2791774
sample estimates:
mean of x mean of y
      2.2      2.8
```

**Figura 6.** T-test Two-Sided para comparação de médias de tratamentos.

Fonte: Autora.

A média de isolamentos para o tempo de submersão em etanol 70% (v/v) por 2 minutos foi de 2,2 endófitos, enquanto que para o segundo grupo com submersão por período de 4 minutos foi de 2,8 endófitos. Como o p-valor é superior a 5% de significância, aceita-se a hipótese nula, ou seja, não houve diferença significativa estatisticamente entre as médias de isolamento para os dois protocolos utilizados.

```
> t.test(amostra1,amostra2, var.equal=TRUE)
```

#### Two Sample t-test

```
data: amostra1 and amostra2
t = -1.367, df = 58, p-value = 0.1769
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -1.4785777  0.2785777
sample estimates:
mean of x mean of y
      2.2      2.8
```

**Figura 7.** Análise de variância gerada através do T-test para dois tratamentos.

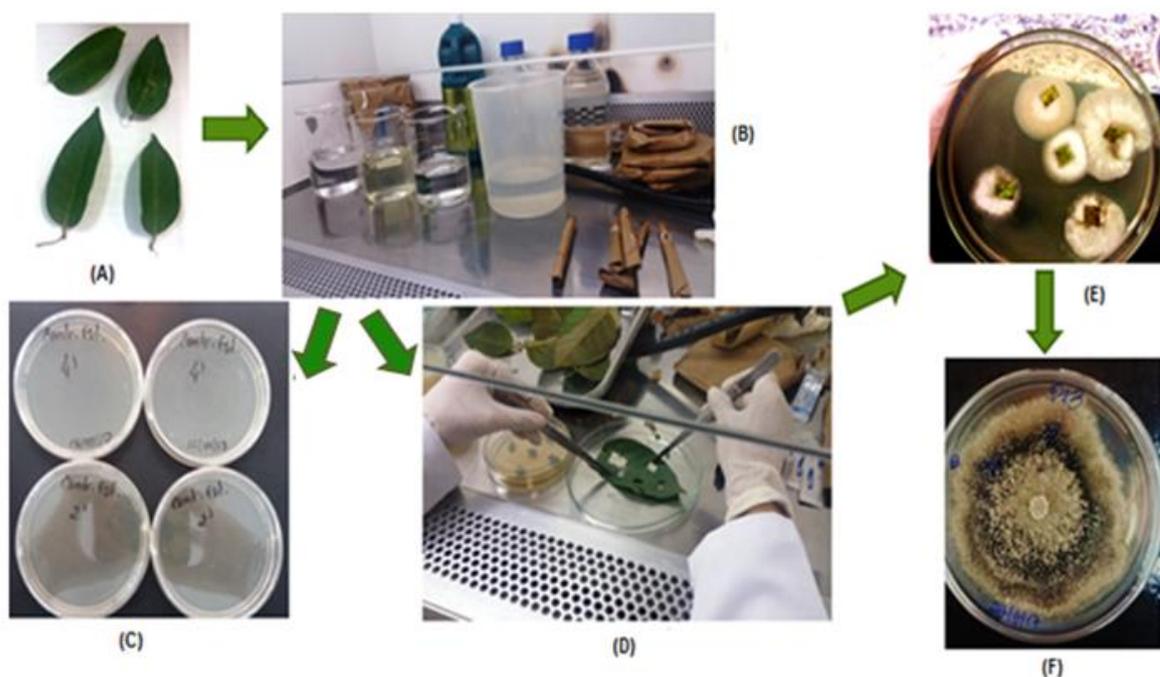
Fonte: Autora.

A análise de variância em 5% de significância confirma a hipótese nula de acordo com o p-valor, conclui-se que não houve diferença significativa entre a quantidade de isolamento de endófitos para os dois protocolos propostos. Esse dado

indica que ambos os tempos são eficientes e não constituíram interferentes na obtenção de endófitos a partir das folhas de *D.ecastaphyllum*.

O estabelecimento dos protocolos de desinfecção foi fundamental na recuperação dos endófitos. Extremos nas concentrações e tempos de submersão dos reagentes podem ocasionar em oxidação dos tecidos vegetais e diminuir a quantidade, ou mesmo impedir a obtenção da microbiota endofítica. Da mesma maneira, concentrações mínimas e tempos inferiores de desinfecção poderiam acarretar no isolamento de fungos ambientais não endofíticos nos meios de cultura.

Os meios inoculados com a última etapa de lavagem garantiram que o isolamento obtido foi constituído de endófitos e não microrganismos epifíticos, permanecendo ausentes para o crescimento microbiano por 20 dias de observação. A figura 8 ilustra as etapas do isolamento dos endófitos a partir das folhas de *D.ecastaphyllum*.



**Figura 8.** Fluxograma das etapas de desinfecção e processamento do material botânico e isolamento de endófitos de *D.ecastaphyllum*. **(A)** Folhas de *D. ecastaphyllum*; **(B)** Desinfecção superficial com etanol 70% (v/v), hipoclorito de sódio 3%, etanol 98% (v/v) e água destilada; **(C)** Placas de ágar ABD demonstrando o controle negativo para epifíticos; **(D)** Semeadura dos fragmentos das folhas em ágar Malte; **(E)** Endófitos crescidos a partir dos fragmentos vegetais; **(F)** Endófito isolado em meio de cultura ABD.

Fonte: Autora.

## 5.2 Atividade amilolítica

Dos 150 fungos endofíticos, foram produtores de amilase 12,67% (19). Essa triagem realizada não é capaz de caracterizar o tipo de amilase produzida pelos endófitos, entretanto abrem-se perspectivas para investigações mais elaboradas com os grupos produtores em ensaios específicos para caracterizações amilolíticas e de outras enzimas, uma vez que se comprova a capacidade de produção nas linhagens endofíticas. A tabela 1 apresenta os endófitos isolados capazes de produzir amilase extracelular *in vitro*:

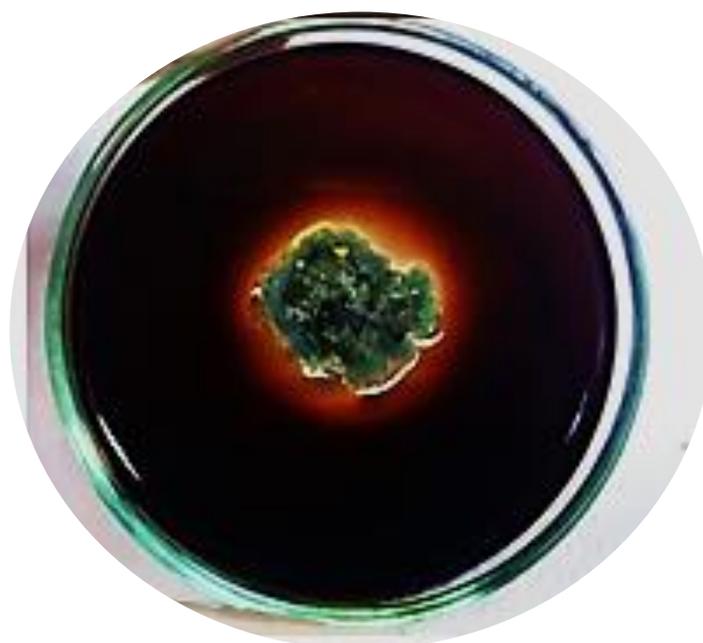
**Tabela 1.** Endófitos de *D. ecastaphyllum* produtores de amilase extracelular *in vitro*.

Endófito	Placa	Fragmento	Amilase
P11E	11	E	+
P12D1	12	D1	+
P18A	18	A	+
P18C	18	C	+
P18D	18	D	+
P29B	29	B	+
P30A	30	A	+
P30B	30	B	+
P32B	32	B	+
P34A	34	A	+
P36A	36	A	+
P37E	37	E	+
P39A	39	A	+
P44A	44	A	+
P46A	46	A	+
P48D1	48	D1	+
P54E1	54	E1	+
P55E2	55	E2	+
P57A	57	A	+

Fonte: Autora.

A produção de amilase extracelular por endófitos está relacionada, em alguns casos, à relação endófito-hospedeiro, uma vez que algumas espécies de endófitos são capazes de assimilar o amido oriundo dos vegetais após a morte de seu hospedeiro (CHOI et al., 2005). As amilases extracelulares produzidas por fungos são apontadas como mais estáveis que enzimas produzidas por bactérias, animais e plantas (AMIRITA et al., 2012; PATIL et al., 2015; MANDAL; BANERJEE, 2019).

A figura 9 ilustra o teste de produção de amilase extracelular positivo.



**Figura 9.** Teste de produção de amilase *in vitro*. O halo ao redor da colônia fúngica denota a produção da enzima pelo endófito, que degradou a amilose e amilopectina no meio de cultura, impedindo a complexação com o iodo solúvel.

Fonte: Autora.

### 5.3 Triagem de atividade antimicrobiana por ágar em bloco

A atividade antimicrobiana na triagem de inibição por ágar em bloco para 3 microrganismos selecionados (Gram-positivo, Gram-negativo e levedura), mostrou que dos 150 endófitos isolados, 35 (23,33%) apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos microrganismos testados, conforme pode ser observado na tabela 2:

**Tabela 2.** Atividades antimicrobianas por inibição em ágar em bloco.  
(Continua).

Endófito	Placa	Fragmento	Média e desvio padrão dos halos de inibição (mm)		
			<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>C.albicans</i> ATCC 10231
P1D	1	D	$\mu= 14,25$ $\sigma= 0,95$	-	-
P2A1	2	A	-	$\mu=18$ $\sigma=0,82$	$\mu= 21$ $\sigma=0,82$
P2E	2	E	$\mu= 15,33$ $\sigma=1,15$	-	-
P5B	5	B	$\mu= 14,5$ $\sigma=0,58$	-	$\mu= 20$ $\sigma=0,82$
P5D	5	D	-	$\mu=11,5$ $\sigma=0,58$	-
P13B	13	B	-	$\mu=15,25$ $\sigma=1,25$	$\mu=16$ $\sigma=0,82$
P14A	14	A	$\mu=12,5$ $\sigma=0,58$	-	-
P17A	17	A	-	-	$\mu=11,75$ $\sigma=0,95$
P17D	17	D	$\mu=17,25$ $\sigma=0,5$	-	-
P18A	18	A	$\mu=16$ $\sigma=0,82$	-	-
P19D	19	D	$\mu=13$ $\sigma=1,15$	-	-
P19E	19	E	-	$\mu=22,5$ $\sigma=0,58$	$\mu=20,75$ $\sigma=1,5$
P20A	20	A	$\mu=16,5$ $\sigma=0,58$	-	-
P28D1	28	D1	$\mu=13,25$ $\sigma=1,25$	-	-
P30B	30	B	$\mu=12,5$ $\sigma=0,58$	-	-
P31D	31	D	$\mu=13,75$ $\sigma=1,25$	-	-
P34B	34	B	$\mu=22$ $\sigma=0,82$	-	-
P34C	34	C	$\mu=19,75$ $\sigma=0,5$	-	$\mu=20$ $\sigma=0,82$
P34D	34	D	$\mu=18,75$ $\sigma=0,5$	-	-
P35A1	35	A1	$\mu=16,25$ $\sigma=0,5$	-	-
P35A2	35	A2	$\mu=15,5$ $\sigma=1$	-	-

**Tabela 2.** Atividades antimicrobianas por inibição em ágar em bloco.  
(Continuação)

Endófito	Placa	Fragmento	Média e desvio padrão dos halos de inibição (mm)		
			<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>C.albicans</i> ATCC 10231
P35C2	35	C2	$\mu=13$ $\sigma=1,15$	-	-
P37A	37	A	$\mu=15,25$ $\sigma=0,5$	-	-
P41A1	41	A1	$\mu=16,75$ $\sigma=0,5$	-	-
P45B	45	B	$\mu=14,5$ $\sigma=1$	-	-
P48D2	48	D2	$\mu=23$ $\sigma=0,82$	-	-
P48E	48	E	$\mu=24,5$ $\sigma=0,58$	-	-
P51B	51	B	$\mu=22$ $\sigma=0,82$	-	-
P52D	52	D	$\mu=15,5$ $\sigma=1$	-	-
P55A	55	A	-	-	$\mu=11,5$ $\sigma=0,58$
P55D	55	D	$\mu=15$ $\sigma=0$	-	-
P55E2	55	E2	$\mu=15,25$ $\sigma=0,95$	-	-
P56E	56	E	$\mu=12,5$ $\sigma=1$	-	-
P58D	58	D	-	$\mu=12,5$ $\sigma=0,58$	-
P60A	60	A	-	-	$\mu=11,5$ $\sigma=0,58$

(Conclusão).

Fonte: Autora.

Dos 35 endófitos produtores de compostos antimicrobianos, apresentaram duplas inibições, 5 (14,29%) endófitos, dos quais apenas o endófito P5B inibiu *S.aureus* e *C.albicans* simultaneamente. Não foram observadas inibições simultâneas para microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, todas as duplas inibições envolveram atividades contra leveduras, sendo 4 também ativas contra *E.coli*.

O maior número de inibições foi contra *S.aureus*, 27 (77,15%) dos endófitos produtores de antimicrobianos foram ativos contra a bactéria Gram-positiva, o que pode sugerir uma ação antimicrobiana que tem como alvo inicial a maior camada de peptidoglicana presente na parede celular bacteriana. Outros mecanismos de inibição podem incluir alteração de rotas metabólicas específicas das bactérias Gram-positivas (RICHARDSON; SOMERVILLE; SONENSHEIN, 2015) frente ao desafio da presença do endófito no meio de cultura.

O segundo maior número de inibições foi contra a levedura *C.albicans*, 8 (22,86) endófitos. Os fatores que podem explicar a inibição das leveduras são a inibição de enzimas metabólicas, ação antimicrobiana na síntese de ergosterol da membrana celular e a quelação de ferro por sideróforos. Um dos mecanismos pelos quais a celulose é degradada por fungos ambientais, inclusive endófitos, é através da utilização de ferro e geração de peróxido de hidrogênio durante o processo de degradação da madeira, no caso de morte do hospedeiro vegetal (XU; GOODELL, 2001; GASKELL et al., 2016; ZHU et al., 2016).

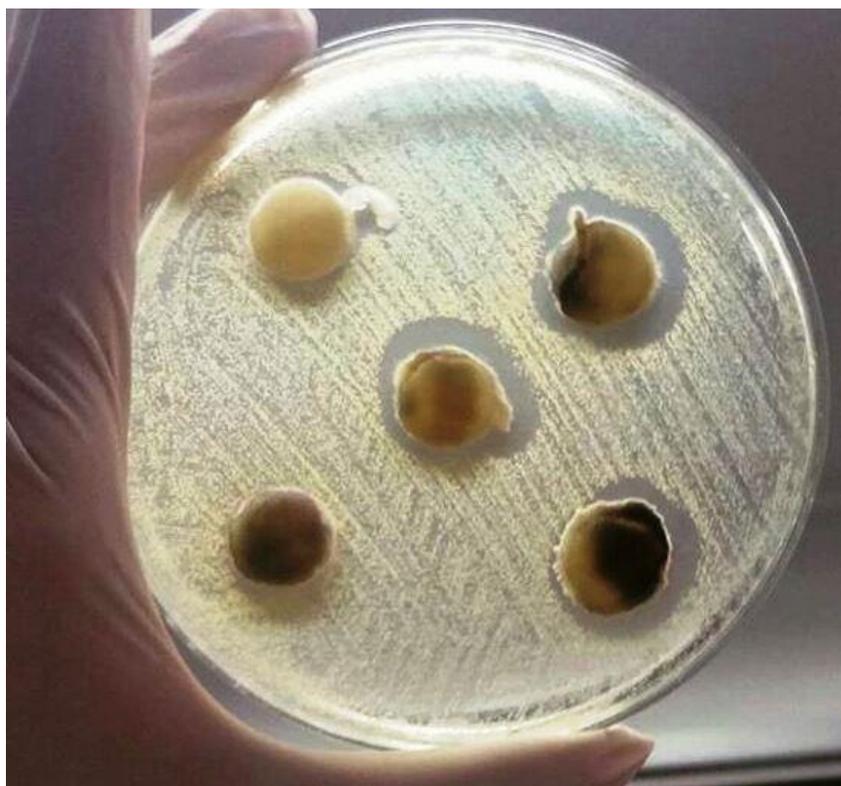
As menores porcentagens de inibição foram contra *E.coli*, 5 (14,29%). Esse resultado pouco expressivo pode ser explicado pela própria natureza da organização celular das bactérias Gram-negativas, descritas extensivamente na literatura (KULP; KUEHN, 2010; DIK; FISHER; MOBASHERY, 2018). A flexibilidade estrutural da parede celular e membranas, a composição química da membrana externa, o sítio de atuação de substâncias antimicrobianas e o trânsito molecular iônico entre o microrganismo e o ambiente, são fatores determinantes para a permeabilidade e susceptibilidade da célula bacteriana, sendo as bactérias Gram-negativas hábeis em possuir mecanismos de evasão à atuação de antimicrobianos, tornando a busca por novos agentes uma difícil tarefa (LI; PLÉSIAT; NIKAIDO, 2015; DOMALAON et al., 2018).

A produção de micotoxinas, assim como o estresse oxidativo constituem também algumas das respostas geradas pelos endófitos a fim de eliminar outros microrganismos competidores em um mesmo ambiente (NESIC; IVANOVIC; NESIC, 2014).

O mais amplo grupo de peptídeos antimicrobianos, conhecidos como defensinas, produzidas por eucariotos e muito ativas contra bactérias Gram-positivas, têm sua expressão em plantas reguladas por fatores ambientais, sendo os endófitos fontes de obtenção. A classe de defensinas antifúngicas denominadas

“*Defensin like-antifungal*”, são produzidas pelo gênero *Aspergillus* spp. em condições de estresse ambiental e por *Penicillium* spp. quando a glicose é limitada (CONTRERAS et al., 2019).

As médias dos halos de inibição foram de 11,5 mm a 24,5 mm de diâmetro. Essa medida não está necessariamente relacionada ao poder de inibição do endófito frente a um determinado microrganismo, embora seja um dos critérios para escolha dos endófitos. A metodologia do ágar em bloco ou bloco de gelose é utilizada para seleção de linhagens produtoras de antimicrobianos, sendo qualitativa, encontra o obstáculo da dispersão de metabólitos em meio de cultura sólido, no qual não é possível mensurar o quanto de substância foi liberada pelo endófito. A capacidade real de inibição a ser determinada qualitativa e quantitativamente é aferida pela atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, onde se conhece a concentração dos extratos.



**Figura 10.** Triagem pelo método do ágar em bloco. Halos de inibição circundam os blocos de ágar ABD contendo os endófitos, impedindo o crescimento das cepas teste nestas regiões do ágar Müller Hinton, através da liberação de substâncias antimicrobianas no meio de cultura sólido

Fonte: Autora.

#### 5.4 Fermentação, extração e concentração de metabólitos bioativos

A tabela 3 demonstra os onze endófitos escolhidos para a etapa de fermentação em meio líquido, com base no tamanho do halo de inibição e especificidade de inibição contra os três microrganismos teste:

**Tabela 3.** Endófitos selecionados para fermentação líquida.

Endófito	Halos de Inibição			Massa obtida
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	
<b>P2A1</b>	-	$\mu=18$ $\sigma=0,82$	$\mu= 21$ $\sigma=0,82$	0,28g
<b>P5B</b>	$\mu= 14,5$ $\sigma=0,58$	-	$\mu= 20$ $\sigma=0,82$	0,34g
<b>P13B</b>	-	$\mu=15,25$ $\sigma=1,25$	$\mu=16$ $\sigma=0,82$	0,23g
<b>P17D</b>	$\mu=17,25$ $\sigma=0,5$	-	-	0,31g
<b>P19E</b>	-	$\mu=22,5$ $\sigma=0,58$	$\mu=20,75$ $\sigma=1,5$	0,36g
<b>P34B</b>	$\mu=22$ $\sigma=0,82$	-	-	0,15g
<b>P34C</b>	$\mu=19,75$ $\sigma=0,5$	-	$\mu=20$ $\sigma=0,82$	0,29g
<b>P34D</b>	$\mu=18,75$ $\sigma=0,5$	-	-	0,32g
<b>P48D2</b>	$\mu=23$ $\sigma=0,82$	-	-	0,23g
<b>P48E</b>	$\mu=24,5$ $\sigma=0,58$	-	-	0,15g
<b>P51D</b>	$\mu=22$ $\sigma=0,82$	-	-	0,30g

Fonte: Autora.

A quantidade de massa obtida após a fermentação, extração e rotaevaporação do solvente de extração é dependente do metabolismo fúngico durante o processo fermentativo (LOHSE et al., 2015).

### 5.5 Atividade antimicrobiana (CIM e CMM)

A avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo pode ser observada na tabela 4, onde são mencionadas as concentrações inibitórias mínimas dos extratos dos endófitos solubilizados em etanol absoluto frente aos microrganismos teste:

**Tabela 4.** Concentrações inibitórias mínimas dos extratos obtidos a partir de endófitos de *D.ecastaphyllum*.

(Continua).

Concentrações inibitórias mínimas dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* ( $\mu\text{g/mL}$ )

Microrganismos teste	P2A1	P5B	P13B	P17D	P19E	P34B	P34C	P34D	P48D2	P48E	P51D
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	400	200	200	200	400	400	400	400	400	400	400
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	100	100	100	200	200	200	200	200	200	200
<i>L.monocytogenes</i> CDC 4555	200	200	200	200	400	200	200	200	400	400	400
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	100	100	100	200	100	100	100	200	200	200
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	>800	>800	NE	NE	>800	>800	>800	>800	>800	>800	NE
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	>800	>800	>800	NE	NE	>800	>800	>800	>800	>800	>800
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 6538	>800	400	>800	>800	NE	>800	>800	>800	>800	>800	>800
		-									
		200									
<i>E.coli</i> ATCC 25922	>800	400	400	400	NE	400	>800	400	400	400	>800
		-	-	-		-		-	-	-	
		200	200	200		200		200	200	200	

**Tabela 4.** Concentrações inibitórias mínimas dos extratos obtidos a partir de endófitos de *D.ecastaphyllum*.

(Continuação).

Concentrações inibitórias mínimas dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* ( $\mu\text{g/mL}$ )

Microrganismos teste	P2A1	P5B	P13B	P17D	P19E	P34B	P34C	P34D	P48D2	P48E	P51D
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	>800	>800	>800	>800	NE	>800	>800	>800	>800	>800	>800
<i>S.typhimurium</i> ATCC 6017	400	400	400	400	>800	>800	400	400	400	400	>800
	-	-	-	-			-	-	-	-	
	200	200	200	200			200	200	200	200	
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	400	200	200	200	400	200	200	200	200	200	200
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	200	100	100	100	200	100	100	100	100	100	100
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	400	200	200	200	400	NE	>800	800	800	NE	NE
	-	-	-	-	-			-	-		
	200	100	100	100	200			400	400		
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 2209	200	200	200	400	400	400	400	>800	>800	>800	NE
	-	-	-	-	-	-	-				
	100	100	100	200	200	200	200				
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	NE	>800	>800	>800	>800	>800	>800	400	>800	>800	>800
								-			
								200			
<i>C.tropicalis</i> ATCC 750	NE	NE	NE	>800	>800	>800	400	400	400	>800	>800
							-	-	-		
							200	200	200		

**Tabela 4.** Concentrações inibitórias mínimas dos extratos obtidos a partir de endófitos de *D.ecastaphyllum*.

(Continuação)

**Concentrações inibitórias mínimas dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* ( $\mu\text{g/mL}$ )**

Microrganismos teste	P2A1	P5B	P13B	P17D	P19E	P34B	P34C	P34D	P48D2	P48E	P51D
<i>C.glabrata</i>	200	200	100	200	200	100	200	200	100	100	100
ATCC 90030	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	100	50	100	100	50	100	100	50	50	50

(Conclusão).

Fonte: Autora.

\* NE: Não encontrado.

A seguir, na tabela 5, estão representadas as concentrações microbicidas mínimas dos extratos.

**Tabela 5.** Concentrações microbicidas mínimas dos extratos obtidos a partir de endófitos de *D.ecastaphyllum*.

**Concentrações microbicidas mínimas dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* ( $\mu\text{g/mL}$ )**

Microrganismos teste	P2A1	P5B	P13B	P17D	P19E	P34B	P34C	P34D	P48D2	P48E	P51D
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	400 - 200	200 - 100	400 - 200	400 - 200	NE	NE	NE	400 - 200	NE	NE	NE
<i>L.monocytogenes</i> CDC4555	400 - 200	NE	NE	NE							
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	NE										
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	NE										
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 6538	NE	800 - 400	NE								
<i>E.coli</i> ATCC 25922	NE										
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	NE										
<i>S.typhimurium</i> ATCC 6017	NE										
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	NE										
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	NE	NE	200 - 100	800 - 400	800 - 400	NE	NE	800 - 400	800 - 400	NE	NE
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 2209	800 - 400	800 - 400	800 - 400	800 - 400	800 - 400	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	NE										
<i>C.tropicalis</i> ATCC 750	NE										
<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	400 - 200	400 - 200	200 - 100	400 - 200	400 - 200	400 - 200	400 - 200	400 - 200	200 - 100	200 - 100	200 - 100

Fonte: Autora.

\* NE: Não encontrado.

Igualmente foram aferidas as concentrações inibitórias (tabela 6) e microbicidas (tabela 7) mínimas para os antibióticos e antifúngicos controles:

**Tabela 6.** Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos.

**Concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos (µg/mL)**

Microrganismo	Amoxicilina	Microrganismo	Estreptomicina	Microrganismos	Fluconazol
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	2,5 - 1,25	<i>E.coli</i> ATCC 25922	5 - 2,5	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	>0,625
<i>L.monocytogenes</i> CDC4555	0,312 - 0,156	<i>S.typhimurium</i> ATCC 6017	NE	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 2209	20 - 10
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	0,156 - 0,078	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	5 - 2,5	<i>C.krusei</i> ATCC 6258	40 - 20
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	0,312 - 0,156			<i>C.tropicalis</i> ATCC 750	2,5 - 1,25
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 6538	>10			<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	20 - 10
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	0,156 - 0,078				

Fonte: Autora.

\* NE: Não encontrado.

**Tabela 7.** Concentrações microbicidas mínimas dos antimicrobianos.

**Concentrações microbicidas mínimas dos antimicrobianos (µg/mL)**

Microrganismo	Amoxicilina	Microrganismo	Estreptomicina	Microrganismos	Fluconazol
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	10 - 5	<i>E.coli</i> ATCC 25922	NE	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	5 - 2,5
<i>L.monocytogenes</i> CDC4555	1,25 - 0,625	<i>S.typhimurium</i> ATCC 6017	NE	<i>C.parapsilosis</i> ATCC 2209	20 - 10
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	5 - 2,5	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	NE	<i>C.krusei</i> ATCC 6258	40 - 20
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	5 - 2,5			<i>C.tropicalis</i> ATCC 750	2,5 - 1,25
<i>S.aureus</i> (MRSA) ATCC 6538	NE			<i>C.glabrata</i> ATCC 90030	20 - 10
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	NE				

Fonte: Autora.

\* NE: Não encontrado.

De acordo com a CIM, os extratos correspondentes aos endófitos P5B, P13B e P17D, foram capazes de inibir *B.cereus* em concentrações entre 200 a 100 µg/mL, enquanto os extratos P2A1, P19E, P34B, P34C, P34D, P48D2, P48E e P51D inibiram a bactéria Gram-positiva em concentrações de 400 a 200 µg/mL.

Todos os extratos endofíticos se mostraram eficazes na inibição do crescimento do microrganismo, que se destaca por ser um anaeróbio facultativo produtor de toxinas distintas, que são clinicamente causadoras de vômitos e diarreias, após a ingestão de alimentos (sobremesas, produtos lácteos e carnes) contaminados por esporos bacterianos. *B.cereus* podem possuir características de termotolerância, constituindo um desafio na indústria alimentícia, exigindo recursos para o aprimoramento do controle de qualidade industrial e no âmbito hospitalar (VEYSSEYRE et al., 2015; KUMARI; SARKAR, 2016; GRIFFITHS; SCHRAFT, 2017).

O extrato P5B eliminou *B.cereus* em 200 a 100 µg/mL e os extratos P2A1, P13B, P17D e P34D foram microbicidas em 400 a 200 µg/mL. Considerando que são extratos brutos e não substâncias puras, são atividades relevantes para futuros fracionamentos dos compostos.

A inibição do crescimento de *L.monocytogenes* também foi bem sucedida para todos os extratos endofíticos. Os extratos P2A1, P5B, P13B, P17D, P34B, P34C e P34D inibiram o crescimento em 200 a 100 µg/mL, enquanto os extratos P19E, P48D2, P48E e P51D foram ativos contra o crescimento em concentrações de 400 a 200 µg/mL.

A bactéria, assim como *B.cereus*, também é responsável por toxinfecções alimentares. É veiculada principalmente em carnes, manifestando-se através de listeriose sistêmica invasiva, que causa sintomas febris brandos até letalidade, com altas taxas de hospitalização de gestantes, imunocomprometidos e idosos (JORDAN; MCAULIFFE, 2018; BUCHANAN et al., 2017)

A aquisição de elementos genéticos móveis é apontada como o mecanismo principal do desenvolvimento de resistência de *L.monocytogenes*. Bombas de efluxo contra fluoroquinolonas e formação de biofilmes são outros mecanismos contra a ação antimicrobiana (OLAIMAT et al., 2018). Esses dados tornam as atividades microbicidas dos extratos P2A1, P5B, P13B, P17D, P19E, P24B, P34C e P34D, mensuradas em 400 a 200 µg/mL, promissoras fontes para o desenvolvimento de possíveis agentes terapêuticos contra a bactéria Gram-positiva.

Os resultados de CIM e CMM para *S.aureus* foram os que mais se destacaram quando confrontados com as inibições vistas na metodologia pelo ágar em bloco. Na metodologia aplicada como triagem, 27 (77,15%) dos endófitos produtores de antimicrobianos foram ativos contra a bactéria Gram-positiva, inclusive os endófitos P17D (halo de 17,25 mm) e P51D (halo de 22 mm), que não apresentaram inibições nas concentrações utilizadas no método de microdiluição em caldo. Os demais extratos apresentaram inibições do crescimento acima de 800 µg/mL, (maior concentração testada) e não foram encontradas concentrações microbicidas para nenhum dos extratos.

Esse resultado pode ser explicado pela atividade metabólica do endófito durante o teste do ágar em bloco. A quantidade de substâncias do metabolismo secundário liberadas em meio sólido não pode ser quantificada pela metodologia, o que sugere que as concentrações das mesmas presentes nos halos de inibição foram superiores às utilizadas na avaliação da CIM e CMM.

As amostras P13B e P19E permaneceram negativas contra *S.aureus* em ambas as metodologias, de acordo com as concentrações testadas.

Os microrganismos *S.epidermidis* e *S.aureus* MRSA geraram a mesma resposta de baixa inibição de crescimento, com quatro exceções em comparação com *S.aureus*: os extratos P13B e P51D, cujas inibições foram acima de 800 µg/mL para ambos os microrganismos; o extrato P5B com CIM em 400 a 200 µg/mL e CMM de 800 a 400 µg/mL contra *S.aureus* MRSA; e P17D com CIM acima de 800 µg/mL para *S.aureus* MRSA. O extrato P5B foi, portanto, o único a apresentar CMM contra um dos microrganismos do gênero *Staphylococcus*.

As inibições superiores a 800 µg/mL contra *S.aureus* e *S.epidermidis* indicam que os extratos possuem atividade contra microrganismos Gram-positivos, assim como pode ser observado nas atividades contra *L.acidophilus*, entretanto, em altas concentrações.

A resistência à metilina, antibiótico β-lactâmico derivado de penicilina, por *S.aureus* MRSA é devida ao gene *MecA*, que codifica a proteína de ligação à penicilina responsável pela reticulação do peptidoglicano da parede celular (PBP2a), resultando em baixa afinidade e resistência à essa classe de antibióticos. Outros genes envolvidos na resistência à aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprim, macrolídeos e tetraciclina também já foram descritos (TURNER et al., 2019). Os resultados obtidos para o extrato do endófito P5B sugerem um

mecanismo de ação alternativo à classe de antibióticos derivados de penicilina.

Todos os extratos com atividade inibitória contra microrganismos Gram-negativos foram bacteriostáticos. Com exceção do extrato P19E negativo contra *E.coli*, todos os extratos apresentaram atividades inibitórias, outro dado destacável quando confrontado com a triagem antimicrobiana pelo ágar em bloco, na qual apenas três endófitos dos onze selecionados (Tabela 3), possuíam indícios de atividade contra *E.coli*. A mudança no padrão de inibição contra bactérias Gram-negativas entre as duas metodologias pode ser justificada pela fase de fermentação intermediária entre ambas.

Na triagem em bloco, o endófito tem menor tempo para produzir metabólitos secundários de origem antimicrobiana, em quantidades suficientes e difusíveis em meio sólido, para inibir o microrganismo teste. Na fermentação, em um período de 20 dias, o endófito se propaga no meio de cultura líquido até que os nutrientes cheguem à escassez, levando ao declínio microbiano, que na tentativa de perpetuação, libera compostos do metabolismo secundário (LIMA et al., 2001). O tempo de produção de compostos antimicrobianos e a quantidade de células no meio de cultura líquido na fermentação (biomassa) são maiores.

O processo de fermentação de uma maneira geral é regulado por fatores como disponibilidade de oxigênio, fontes de carbono, nitrogênio, aminoácidos, fosfato e outros elementos que promovem a regulação metabólica do microrganismo. Esses fatores podem estimular a produção de compostos antimicrobianos (SANCHEZ; DEMAIN, 2002; SER et al., 2016).

A inibição contra *E.coli* para os extratos P5B, P13B, P17D, P34B, P34D, P48D2 e P48E foram entre 400 a 200 µg/mL, os extratos P2A1 e P51D tiveram inibições ativas a partir de 800 µg/mL.

Contra *S.typhimurium* foram constatadas inibições em 400 a 200 µg/mL para os extratos P2A1, P5B, P13B, P17D, P34C, P34D, P48D2 e P48E e superior a 800 µg/mL para os extratos P19E, P34Be P51D.

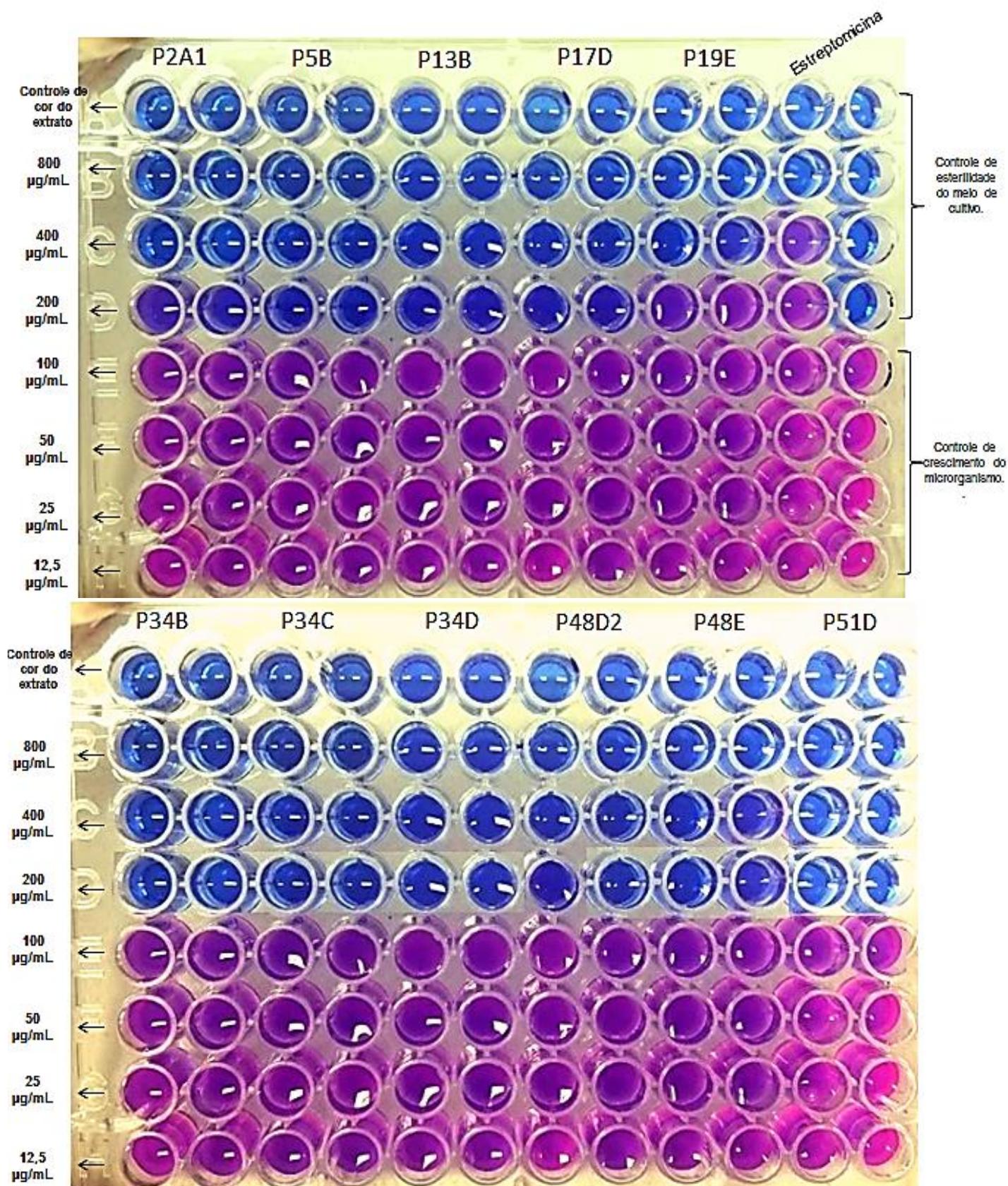
As Enterobacteriaceae se tornaram um desafio global pelo aumento da resistência aos antimicrobianos, através de mutações pela seleção clínica no uso indiscriminado de antimicrobianos e evolução das bactérias ao longo do tempo com o ambiente (WELLINGTON et al., 2013). *K.pneumoniae*, *E.coli* e *Salmonella* produtoras de β-lactamases (ESBL) são frequentes no âmbito hospitalar, onde exibem múltiplos perfis de resistência, inclusive aos antibióticos carbapenêmicos,

utilizados preferencialmente em infecções graves por esse grupo bacteriano (PATERSON, 2006; SENCHYNA et al., 2019).

Mecanismos de resistência naturais em *P.aeruginosa* são bombas de efluxo, alteração de canais porinas, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, produção de  $\beta$ -lactamases, mutações de topoisomerasas e formação de biofilmes. Constituem agentes infecciosos que requerem atenção e medidas de controle nosocomial (LIEW et al., 2019; WEILAND; CHHATWAL; VONBERG, 2018).

A membrana de *P.aeruginosa* possui 100 vezes menor permeabilidade quando comparada à membrana de *E.coli* (ANGUS et al., 1982). Essa característica estrutural reafirma o potencial antimicrobiano dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. A *P. aeruginosa* foi a bactéria Gram-negativa com os melhores índices de inibição do grupo, os extratos P2A1 e P19E com inibições em 400 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ; P5B, P13B, P17D, P34C, P34D, P48D2, P48E e P51D entre 200 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ; apenas o extrato P34B com inibição superior a 800  $\mu\text{g/mL}$ .

A figura 11 representa o ensaio de concentração inibitória mínima e a figura 12 ilustra o teste de concentração microbicida mínima para *P.aeruginosa*.



**Figura 11.** Concentração inibitória mínima pelo teste de microdiluição em caldo dos extratos etanólicos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* contra *P.aeruginosa*.

Fonte: Autora.



**Figura 12.** Concentração bactericida mínima de *P.aeruginosa*. Todos os extratos testados tiveram ação bacteriostática

Fonte: Autora.

A natureza bacteriostática da atuação dos extratos em bactérias Gram-negativas pode indicar ações na modificação de proteínas, rompimento de membrana plasmática, na replicação do DNA e ligação a ribossomos, o que impede a síntese proteica (NEMESH; OESH; KUSTER, 2015). Análises das frações constituintes poderiam revelar valores de CIM inferiores em relação aos extratos brutos, bem como uma possível ação bactericida para os compostos puros.

Cada espécie do gênero *Candida* apresentou seus próprios padrões de inibição, o que constitui um elemento importante para justificar a utilização de múltiplas espécies do gênero, tal como conhecer o comportamento das substâncias antimicrobianas em investigação.

*C.albicans*, o patógeno clinicamente mais importante do gênero, foi inibida pelos extratos P5B, P13B e P17D em 200 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ; P2A1, P19E em 400 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ; P34D e P48D2 em 800 a 400  $\mu\text{g/mL}$ ; P34C acima de 800  $\mu\text{g/mL}$ ; e apenas três extratos (P34B, P48E e P51D) não apresentaram inibições nas concentrações testadas.

Os resultados da CIM para *C.albicans* concordaram com as inibições observadas na triagem no ágar em bloco, com exceção do endófito P17D, que não havia mostrado indícios de atividade contra a levedura na triagem.

O extrato P13B foi o que teve menor concentração microbicida mínima (200 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ), os extratos P17D, P19E, P34D e P48D2 eliminaram a levedura em 800 a 400  $\mu\text{g/mL}$ , não sendo encontradas as CMMs dos demais extratos.

*C.parapsilosis* não foi inibida nas concentrações testadas pelo extrato P51D.

Os extratos P34d, P48D2 e P48E apresentaram faixas de inibição superiores a 800 µg/mL. Para os extratos P17D, P19E, P35B e P34C a CIM foi de 400 a 200 µg/mL, e para extratos P2A1, P5B e P13B a CIM foi de 200 a 100 µg/mL. Cinco extratos (P2A1, P5B, P13B, P17D e P19E tiveram CMM em 800 a 400 µg/mL), não sendo encontradas para os demais extratos.

A espécie menos susceptível à ação antimicrobiana dos extratos foi *C.krusei*, contra a qual o extrato P2A1 não teve CIM definida e a única inibição inferior a 800 µg/mL foi do extrato P34D (400 a 200 µg/mL). Também não foi possível encontrar CMM dos extratos para a espécie.

*C.tropicalis* é a segunda espécie com menor resposta inibitória dos extratos, sendo P2A1, P5B e P13B inativos nas concentrações testadas; P17D, P19E e P34B, P48E e P51D superiores a 800 µg/m; apenas os extratos P34C, P34D e P48D2 inibidores em 400 a 200 µg/mL, com CMM não encontradas.

Todos os extratos mostraram inibição frente a *C.glabrata*, que foi o microrganismo com as menores CIMs aferidas: P13B, P34C, P48D2, P48E e P51D em 100 a 50 µg/mL; P2A1, P5B, P17D, P19E, P34C e P34D em 200 a 100 µg/mL. Também foi o único microrganismo cujas CMMs frente aos extratos foram todas encontradas: P2A1, P5B, P17D, P19E, P34B, P34C, P34D em 400 a 200 µg/mL; e P13B, P48D2, P48E e P51D em 200 a 100 µg/mL.

Embora a espécie *albicans* ainda seja a principal responsável por infecções, há um crescimento de infecções causadas por *Candida* não-*albicans*, esse fator somado à variabilidade de resistência intrínseca e adquirida entre as espécies é um grande problema no controle das infecções (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

Assim como observado na interação dos extratos antimicrobianos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*, as espécies de *Candida* exibem graus variados de suscetibilidade aos antifúngicos utilizados na rotina clínica.

O fluconazol, antifúngico mais usado na terapia de infecções pelas leveduras do gênero, raramente é deficiente no combate a *C.albicans*, *C.tropicalis* e *C.parapsilosis*. *C.glabrata* apresenta sensibilidade reduzida em comparação às outras espécies e *C.krusei* é intrinsecamente resistente. As equinocandinas, embora eficientes contra a maioria das espécies, requerem CIMs mais elevadas contra *C.parapsilosis* (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

Os azóis atuam na esterol 14- $\alpha$  desmetilase, enzima envolvida na síntese de

ergosterol, indispensável às leveduras. O crescimento da resistência ao fármaco entre as espécies de *Candida* é derivado da exposição prévia em terapias antifúngicas e cada espécie tem seu próprio arsenal de escape à atuação do antifúngico, que envolve regulação gênica, metabólica e mutações (WHALEY et al., 2017).

A *C.krusei*, o microrganismo com menor susceptibilidade às atividades antimicrobianas dos extratos etanólicos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*, e intrinsecamente resistente aos azóis, não tem seus mecanismos de resistência completamente elucidados. Redução de acumulação de fármacos por blindagem de transportadores, bombas de efluxo e superexpressão de genes que reduzem a afinidade dos fármacos em seus sítios-alvo de atuação, são algumas estratégias usadas que talvez expliquem o desempenho ineficaz de inibição ao patógeno (WHALEY et al., 2017).

Embora ainda não haja um consenso na padronização dos níveis de inibição microbiana para produtos de origem natural, autores propõe uma classificação com base nos resultados da CIM: fortes inibidores com CIM até 500 µg/mL; atividade moderada entre 600 a 1500 µg/mL; e inibidores fracos com CIM acima de 1600 µg/mL (ALIGIANNIS et al., 2001; HILÁRIO et al., 2017). O fracionamento dos extratos brutos decorre muitas vezes em menor concentração necessária para a inibição dos patógenos, as subfrações apresentam menores valores de CIM quando comparadas ao extrato precursor (RUFATTO et al., 2018).

Devido ao cenário atual do perfil de resistência antimicrobiano, muitas pesquisas tem sido desenvolvidas a fim de projetar os impactos econômicos, sociais e na saúde pública no futuro (DE KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016; O'NEILL, 2014). Segundo FOREMAN et al. (2018), dentre as bactérias consideradas prioridades futuras no desenvolvimento de terapias antimicrobianas estão *S.aureus* MRSA, *E.faecium* resistente à vancomicina, as Gram-negativas *P.aeruginosa*, *A.baumannii* e Enterobacteriaceae.

As pesquisas de base no rastreio de compostos antimicrobianos de fontes naturais ainda não exploradas, como a bioprospecção em endófitos de *D.ecastaphyllum*, constituem um passo inovador no desenvolvimento de novas terapias no combate a patógenos.

## 5.6 Atividade antioxidante

Na tabela 8 são observadas as médias e desvios padrão para as atividades antioxidantes expressas em porcentagem para cada um dos extratos dos endófitos de *D. ecastaphyllum*, e dos padrões BHT e ácido ascórbico.

**Tabela 8:** Atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos endófitos de *D. ecastaphyllum*.

Amostra	Concentração (ppm)	ABS 1 517nm	ABS 2 517nm	ABS 3 517 nm	AA1 (%)	AA2 (%)	AA3 (%)	Média AA (%)	Desv. Pad.	DPPH residual (%)
P2A1	90	0,146	0,189	0,171	85,282	80,948	82,762	82,997	2,177	17,003
P5B	90	0,128	0,129	0,13	87,097	86,996	86,895	86,996	0,101	13,004
P13B	90	0,769	0,726	0,722	22,480	26,815	27,218	25,504	2,627	74,496
P17D	90	0,695	0,665	0,666	29,940	32,964	32,863	31,922	1,718	68,078
P19E	90	0,706	0,719	0,713	28,831	27,520	28,125	28,159	0,656	71,841
P34B	90	0,136	0,134	0,13	86,290	86,492	86,895	86,559	0,308	13,441
P34C	90	0,477	0,474	0,475	51,915	52,218	52,117	52,083	0,154	47,917
P34D	90	0,582	0,571	0,536	41,331	42,440	45,968	43,246	2,421	56,754
P48D2	90	0,833	0,819	0,831	16,028	17,440	16,230	16,566	0,763	83,434
P48E	90	0,758	0,748	0,751	23,589	24,597	24,294	24,160	0,517	75,840
P51D	90	0,859	0,855	0,857	13,407	13,810	13,609	13,609	0,202	86,391
BHT	90	0,279	0,275	0,293	71,88	72,28	70,46	71,54	0,953	28,46
Âc. Âsc.	90	0,034	0,034	0,033	96,72	96,72	96,82	96,76	0,056	3,24

Fonte: Autora.

Segundo a análise de variância e o Teste Tukey realizados em 5% de significância com base nas médias de atividade antioxidante dos extratos, houve diferença significativa para todos os extratos testados, ou seja, as médias de atividade antioxidante diferiram estatisticamente entre as amostras e padrões utilizados. A figura 13 ilustra o Teste Tukey obtido após a análise de variância:

---

Teste Tukey para a FV AMOSTRA

---

DMS: 0 NMS: 0,05

---

Média harmonica do número de repetições (r): 1  
 Erro padrão: 0

---

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
P51D	13.609000	a1
P48D2	16.566000	a2
P48E	24.160000	a3
P13B	25.504000	a4
P19E	28.159000	a5
P17D	31.922000	a6
P34D	43.246000	a7
P34C	52.083000	a8
BHT	71.540000	a9
P2A1	82.997000	a10
P34B	86.559000	a11
P5B	86.996000	a12
AC. ASC	96.760000	a13

---

**Figura 13:** Teste Tukey das atividades antioxidantes dos extratos dos endófitos de *D. ecastaphyllum*

Fonte: Autora.

A tabela 9 apresenta, em ordem decrescente, as atividades antioxidantes dos extratos e seus respectivos agrupamentos em médias estatisticamente diferentes aferidas no Teste Tukey.

**Tabela 9:** Médias das atividades antioxidantes dos extratos dos endófitos de *D. ecastaphyllum*.

Amostra	Média de Atividade Antioxidante
AC.ASC	96,760 <sup>a</sup>
P5B	86,996 <sup>b</sup>
P34B	86,559 <sup>c</sup>
P2A1	82,997 <sup>d</sup>
BHT	71,540 <sup>e</sup>
P34C	52,083 <sup>f</sup>
P34D	43,246 <sup>g</sup>
P17D	31,922 <sup>h</sup>
P19E	28,159 <sup>i</sup>
P13B	25,504 <sup>j</sup>
P48E	24,160 <sup>k</sup>
P48D2	16,566 <sup>l</sup>
P51D	13,609 <sup>m</sup>

Fonte: Autora.

O ácido ascórbico foi o padrão que apresentou melhor resposta antioxidante dentre as amostras testadas. Sua utilização como padrão permite uma comparação de seu potencial antioxidante com o dos extratos, tido como um agente antioxidante natural não-enzimático, está presente em plantas e é utilizado em resposta ao estresse ambiental na eliminação de espécies reativas de oxigênio e na modulação fisiológica de vegetais (AKRAM; SHAFIQ; ASHRAF, 2017).

O BHT (hidroxitolueno butilado) é um antioxidante sintético comercial amplamente usado contra a degradação dos alimentos industrializados (ENES et al., 2006), sua toxicidade está relacionada ao tipo de tecido exposto, aos parâmetros de exposição e geração de metabólitos eletrofílicos que geralmente são formados por fortes agentes antioxidantes (LANIGAN; YAMARIK, 2002).

Os extratos dos endófitos de *D. ecastaphyllum* P5B, P34B e P2A1 foram os

que mais se aproximaram da atividade antioxidante produzida pelo padrão natural ácido ascórbico, os mesmos também superaram a atividade antioxidante produzida pelo padrão comercial BHT. A análise de variância e o teste Tukey também demonstraram nos extratos P34B, P34C e P34D que as médias de atividade antioxidante foram distintas nesses extratos, que foram obtidos a partir de diferentes endófitos de uma mesma folha, tal como ocorreu nos extratos P48D2 e P48E.

Esse dado, juntamente com os resultados obtidos nas concentrações inibitórias mínimas dos extratos dos endófitos, reforça a hipótese de que mesmo sendo oriundos de uma mesma espécie vegetal, alguns de uma mesma folha e possivelmente sendo do mesmo gênero e espécie (devido à especificidade da relação endófito-hospedeiro), cada endófito tem um desempenho singular na produção de compostos bioativos.

Nos hospedeiros vegetais, as espécies reativas de oxigênio desempenham funções na morte celular programada e têm efeitos diversos no êxito de infecções por fitopatógenos ou na colonização por microrganismos não patogênicos. Por sua vez, os antioxidantes atuam como facilitadores da interação química entre o hospedeiro e patógenos avirulentos ou endófitos, pois permite que o vegetal possa distinguir o processo patogênico de uma colonização mutualista. Dessa forma, a produção de antioxidantes por endófitos pode ser um fator determinante para a resistência ou aceitação da colonização pelo hospedeiro vegetal (HAMILTON et al., 2012).

Em contrapartida, os endófitos também produzem espécies reativas de oxigênio, utilizadas na degradação de matéria orgânica e facilitação da absorção de nutrientes pelas hifas, o que explica o maior teor de compostos fenólicos e flavonoides em hospedeiros colonizados por endófitos (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011). Um exemplo é a inoculação de linhagens endofíticas em culturas videiras, promovendo a produção de compostos antioxidantes nos tecidos hospedeiros, e consequente melhora na qualidade do fruto e do vinho (YANG et al., 2016).

Ainda não há informações suficientes na literatura a respeito da atividade antioxidante ou espécies reativas de oxigênio dos endófitos de *D.ecastaphyllum* e qual seu papel na modulação da produção da resina vermelha secretada pela planta para a produção de própolis vermelha brasileira, ambos produtos com atividades antioxidantes, resultantes de compostos fenólicos como isoflavonoides (ALENCAR et al., 2007).

Em um trabalho recente CANEI et al. (2017), objetivaram a inoculação de rizóbios autóctones em plantas nativas do Parque Estadual do Rio Vermelho em Santa Catarina, com a finalidade de recuperação de áreas degradadas através do aprimoramento das espécies vegetais pela ação de bactérias fixadoras de nitrogênio. Das espécies vegetais utilizadas, a *D.ecastaphyllum* foi a que mais mostrou resistência à assimilação da nova microbiota, rejeitando cinco, das 12 linhagens inoculadas. Esse resultado sugere maior especificidade simbiótica entre o hospedeiro e seus endófitos, uma vez que as espécies inoculadas podem ter sido eliminadas pela ação de substâncias antimicrobianas ou antioxidantes, que agora com o nosso trabalho, sabemos serem produzidas pela microbiota endofítica natural presente em *D.ecastaphyllum*.

Outros estudos sobre o nível de interação entre os endófitos e *D.ecastaphyllum* são necessários para que se compreenda as modulações fisiológicas produzidas pelos microrganismos e como aprimorar a sobrevivência da espécie no seu *habitat* natural em caso de eventual degradação ambiental, uma vez que é a única fonte conhecida atualmente para a obtenção da própolis vermelha brasileira.

### **5.7 Ensaio de viabilidade celular**

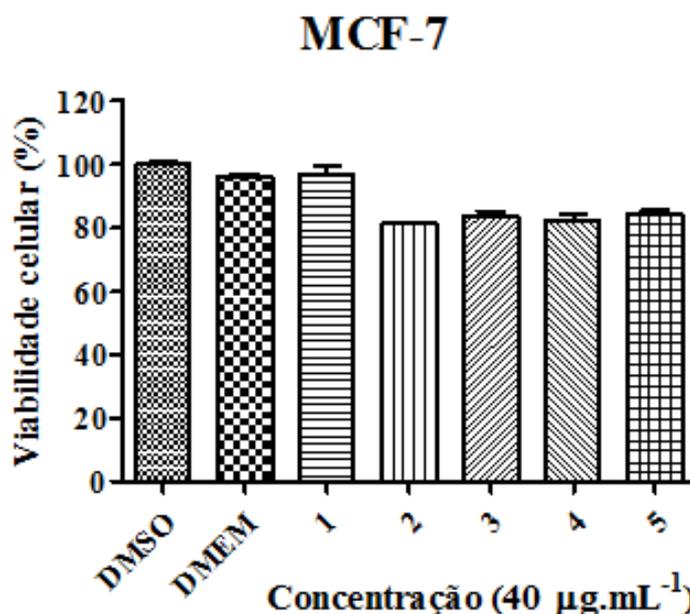
A atividade antioxidante de produtos naturais é comumente devida aos flavonoides que possuem mais de 8000 compostos caracterizados pela presença de anéis aromáticos e heterocílios oxigenados, com variações hidroxi-metil na estrutura química. As classes de flavonoides mais abundantes em produtos naturais são a antocianina, flavonas, flavonóis, flavononas, isoflavinas e flavanas. A atividade antioxidante para alguns extratos pode ser responsável pela inibição ou progressão tumoral de algumas linhagens celulares e tecidos (PEREIRA; DAS GRAÇAS CARDOSO, 2012; PATIL; MASAND, 2019).

A superexpressão de antioxidantes peroxirredoxinas é observada em alguns processos tumorais como o câncer colorretal, pancreático e peritoneal, principalmente em razão da promoção de angiogênese e progressão das células tumorais que levam ao processo metastático. A superexpressão de moléculas de natureza antioxidante promotoras da diferenciação anormal de células tumorais é

uma das ferramentas que pode ser utilizada no prognóstico e rastreamento do câncer (LI et al., 2018).

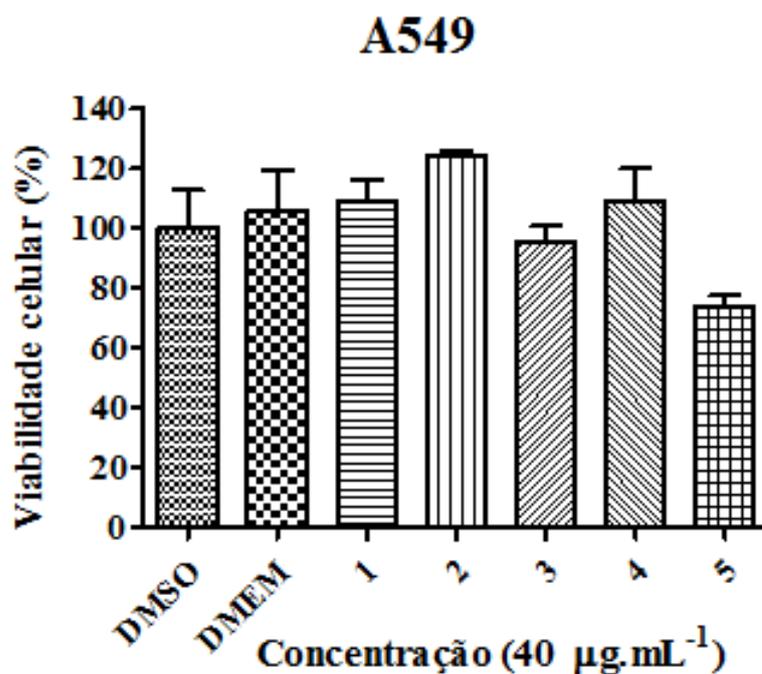
Por estas razões as atividades antioxidantes (item 6.6) dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* serviram como parâmetro de seleção para aferir a viabilidade celular por MTS. Primeiramente cinco extratos foram selecionados para a realização do ensaio: os extratos P5B e P34B, cuja atividade antioxidante foi superior ao BHT; o extrato P34D cuja atividade antioxidante foi intermediária comparada ao extrato com maior atividade; e os extratos P13B e P48D2 que obtiveram baixo desempenho antioxidante (Tabela 9).

O perfil de citotoxicidade dos extratos foi avaliado sobre três linhagens celulares derivadas de cânceres humanos (MCF-7, carcinoma de mama; A549, adenocarcinoma pulmonar; e HepG2, carcinoma hepatocelular). Os extratos foram testados na concentração de  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  por 48 horas. Dentro das condições experimentais utilizadas não houve redução significativa da viabilidade em nenhuma das linhagens celulares utilizadas. As figuras 14, 15 e 16 representam as avaliações dos extratos nos diferentes tipos celulares testados.



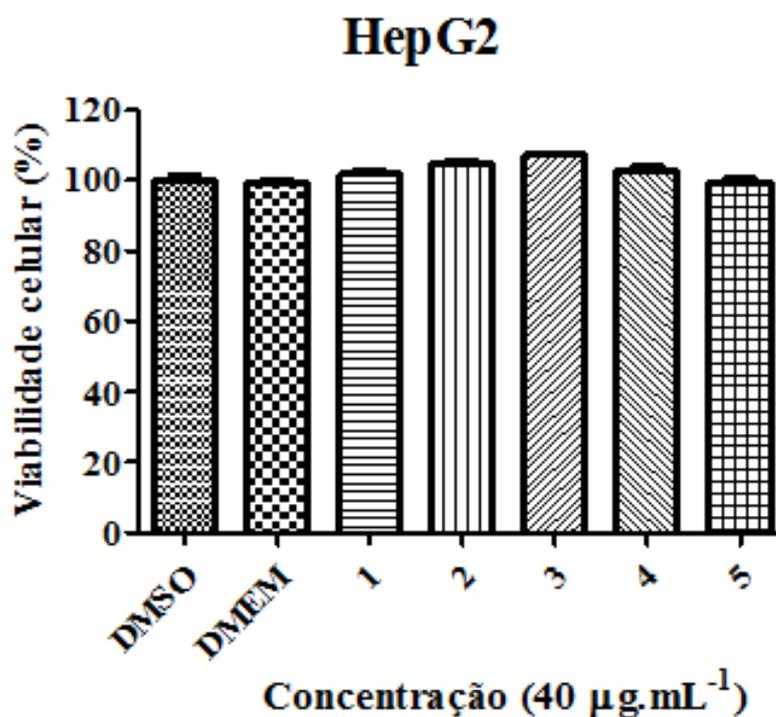
**Figura 14:** Gráfico de viabilidade celular de carcinoma de mama (MCF-7) na presença dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. Extratos: 1) P5B; 2) P13B; 3) P34B; 4) P34D 5) P48D2.

Fonte: Autora.



**Figura 15:** Gráfico de viabilidade celular de adenocarcinoma pulmonar (A549) na presença dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. Extratos: 1) P5B; 2) P13B; 3) P34B; 4) P34D 5) P48D2

Fonte: Autora.



**Figura 16:** Gráfico de viabilidade celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) na presença dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. Extratos: 1) P5B; 2) P13B; 3) P34B; 4) P34D 5) P48D2

Fonte: Autora.

De acordo com a figura 14, nenhum dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* reduziu a viabilidade celular de carcinoma de mama em níveis inferiores a 80%.

Na figura 15, os extratos P5B, P13B e P34D proporcionaram aumento da viabilidade nas células de adenocarcinoma pulmonar, podendo esse efeito estar relacionado à composição química dos extratos que tiveram diferentes médias de atividade antioxidante. Ainda não se sabe qual classe de antioxidantes é produzida pelos endófitos, portanto não é possível afirmar com certeza se o estímulo do desenvolvimento celular se deve a esses compostos, embora essa hipótese constitua um dos mecanismos prováveis, assim como a produção de metabólitos carcinogênicos que tampouco deve ser descartada. Os extratos P34B e P48D2 reduziram a viabilidade celular de adenocarcinoma pulmonar, entretanto as porcentagens de redução que refletem o potencial antitumoral foram baixas, não sendo considerado um resultado promissor mesmo em extratos brutos.

O mesmo estímulo da viabilidade celular pode ser observado na figura 16 para carcinoma hepatocelular. As análises estatísticas não evidenciaram diferenças significativas entre as amostras de acordo com o resultados obtidos no ensaio.

Embora os microrganismos endofíticos possuam ampla gama de atividades biológicas diversificadas, os endófitos de *D.ecastaphyllum* selecionados primeiramente pela atividade antimicrobiana, e posteriormente com base nas diferentes atividades antioxidantes, não se mostraram efetivos na inibição de linhagens tumorais.

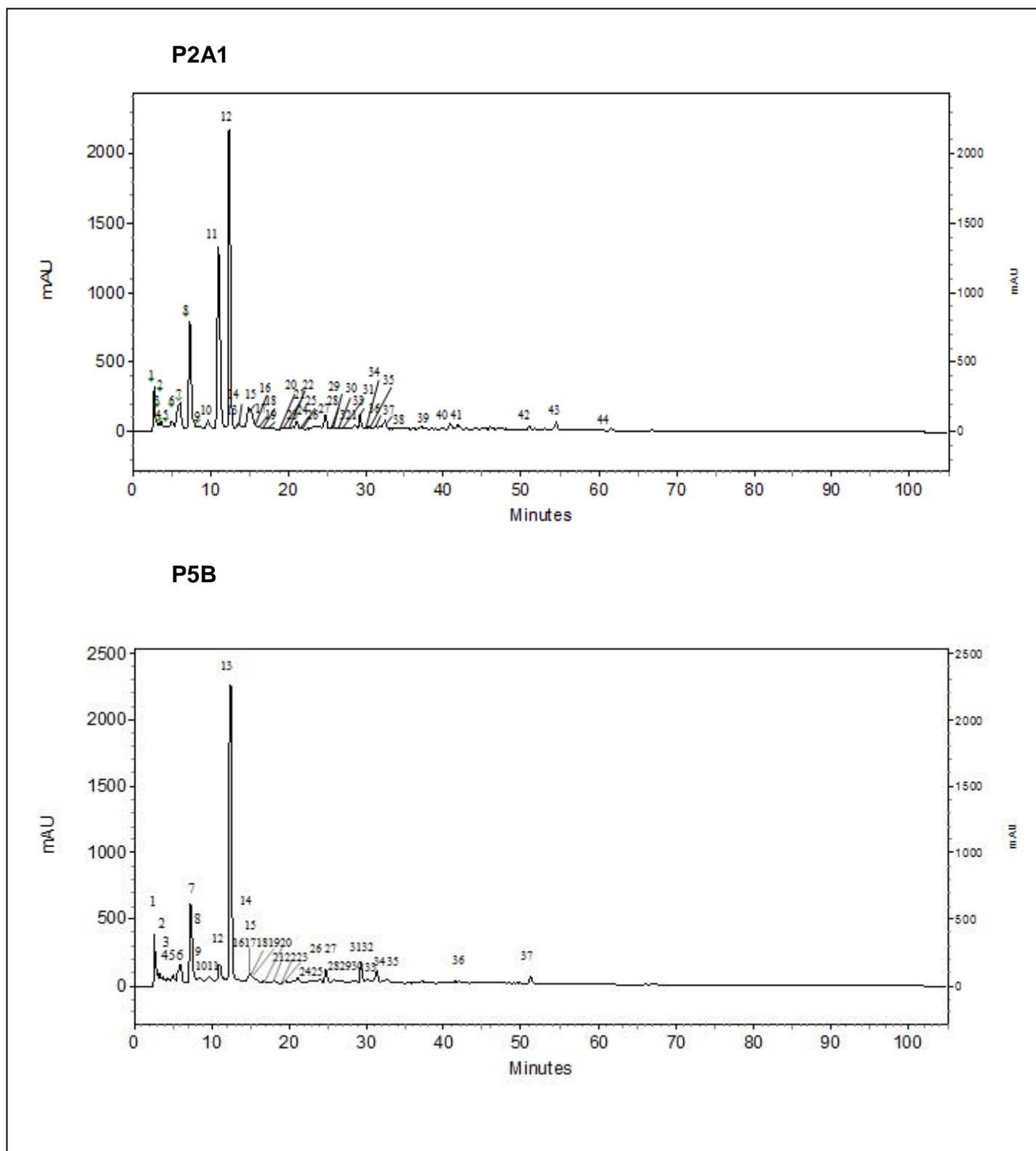
É importante ressaltar que foram obtidos 150 endófitos nesse experimento, e que os ensaios posteriores à triagem pela metodologia do ágar em bloco (item 4.3) foram realizados apenas com os onze endófitos mais promissores em atividade antimicrobiana (item 5.5). Destes, apenas cinco foram avaliados quanto à viabilidade celular de apenas três linhagens de células tumorais, portanto 145 fungos endofíticos de *D.ecastaphyllum* não foram avaliados no ensaio. Há possibilidade de que estes endófitos não investigados possuam atividade antiproliferativa .

### 5.8 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

O quadro 2 apresenta os cromatogramas gerados para cada extrato dos endófitos de *D.ecastaphyllum*:

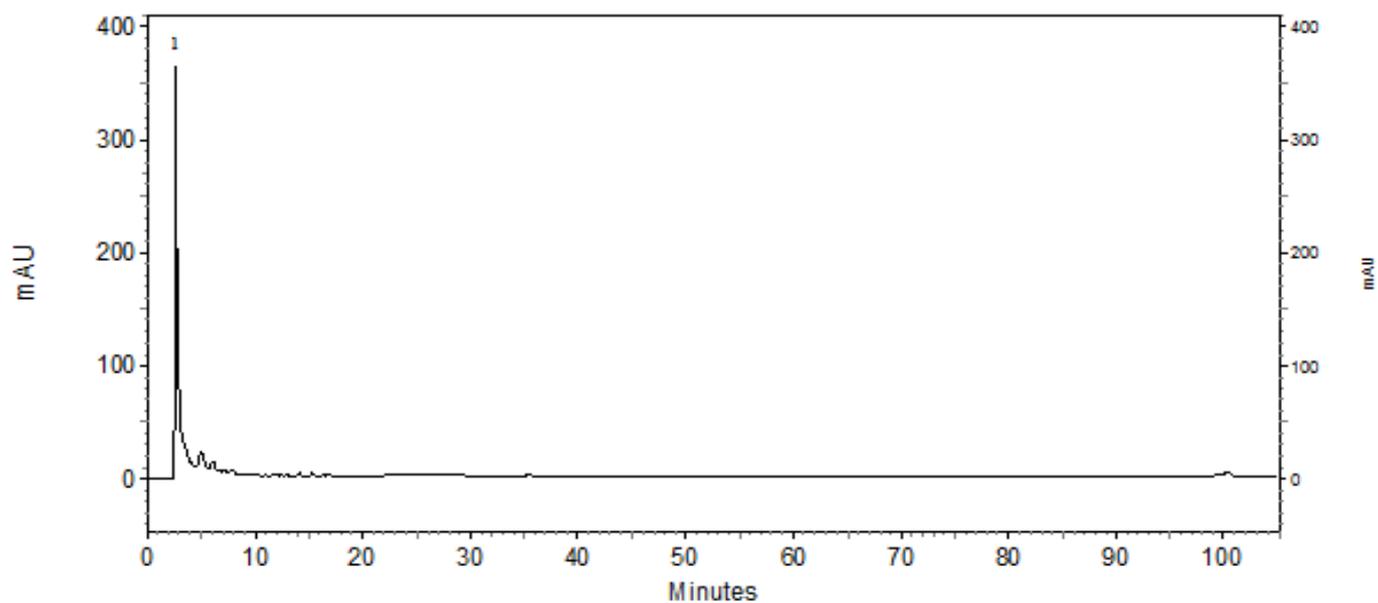
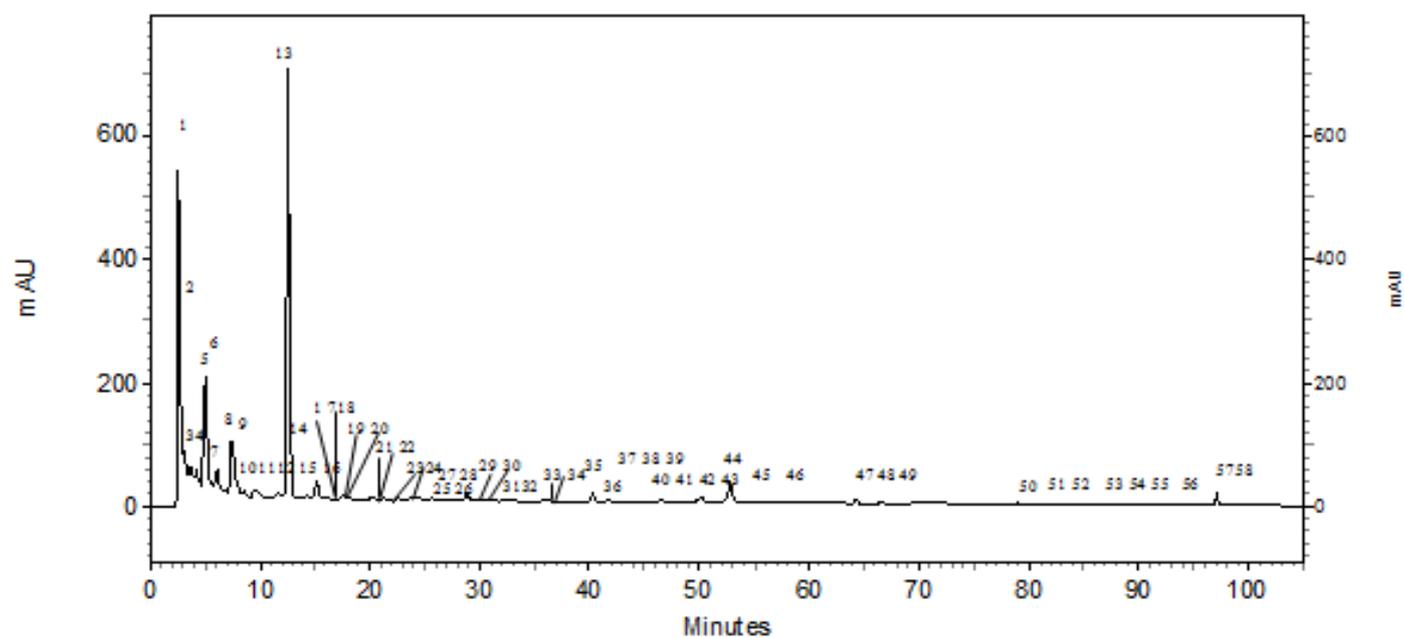
**Quadro 2:** Cromatogramas dos extratos de *D.ecastaphyllum*:

(Continua).



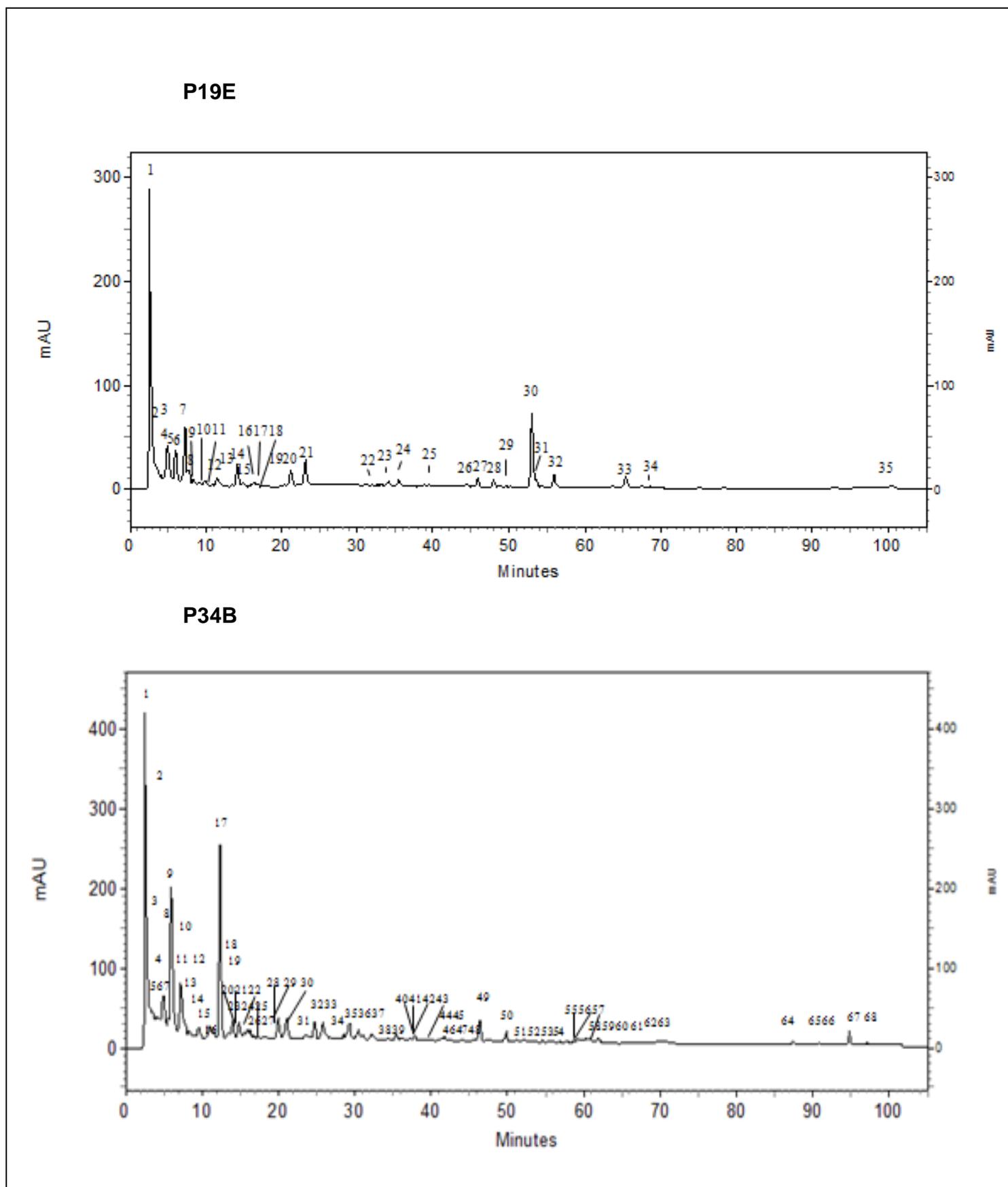
**Quadro 2:** Cromatogramas dos extratos de *D.ecastaphyllum*:

(Continuação).

**P13B****P17D**

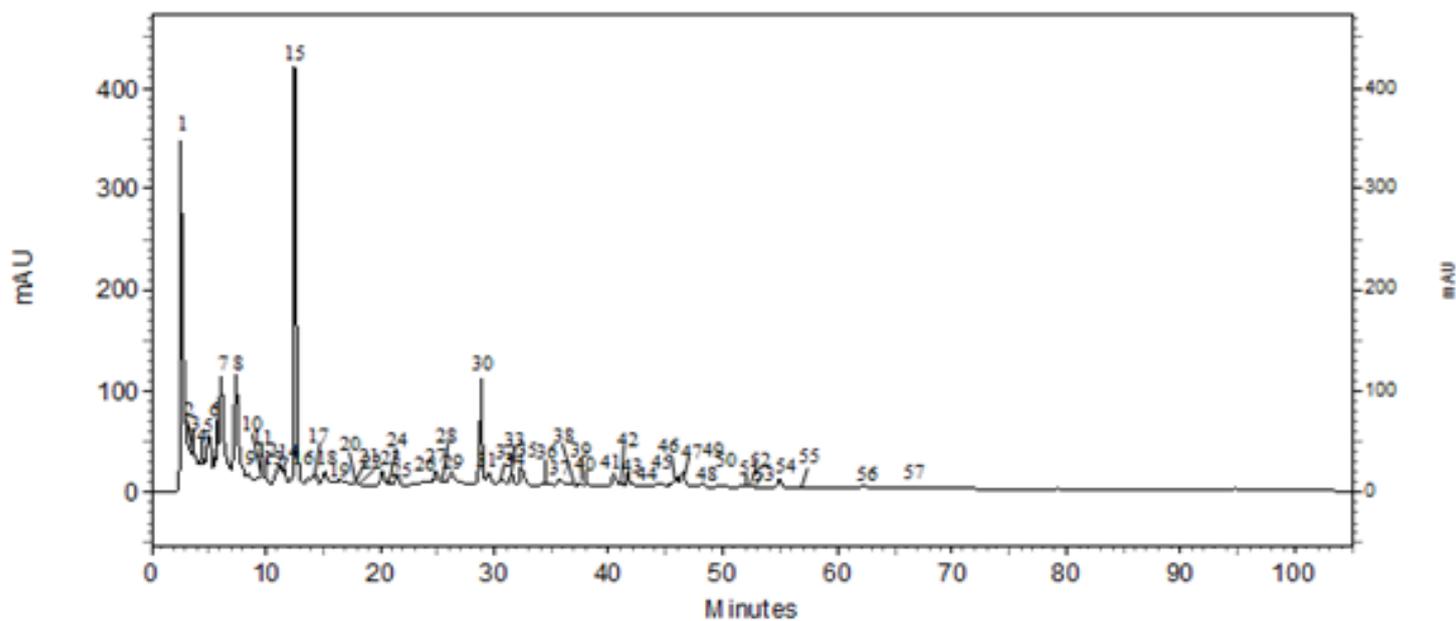
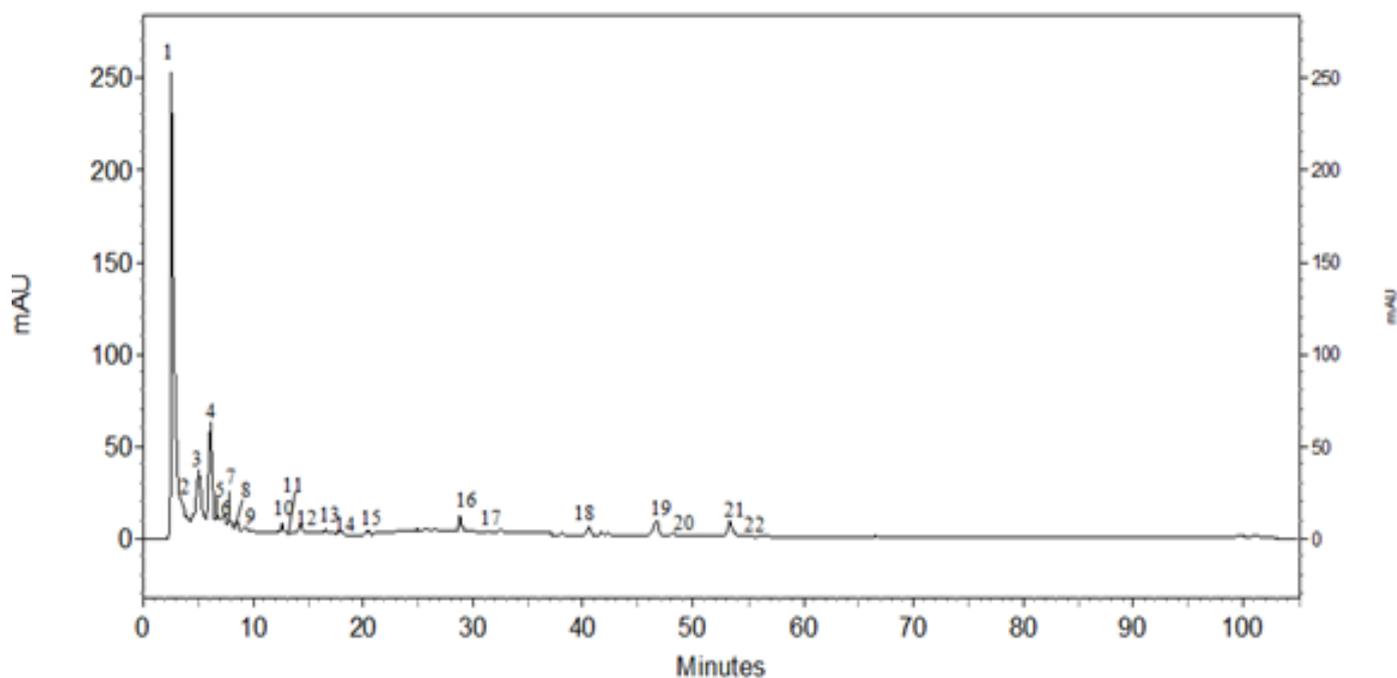
**Quadro 2:** Cromatogramas dos extratos de *D.ecastaphyllum*:

(Continuação).



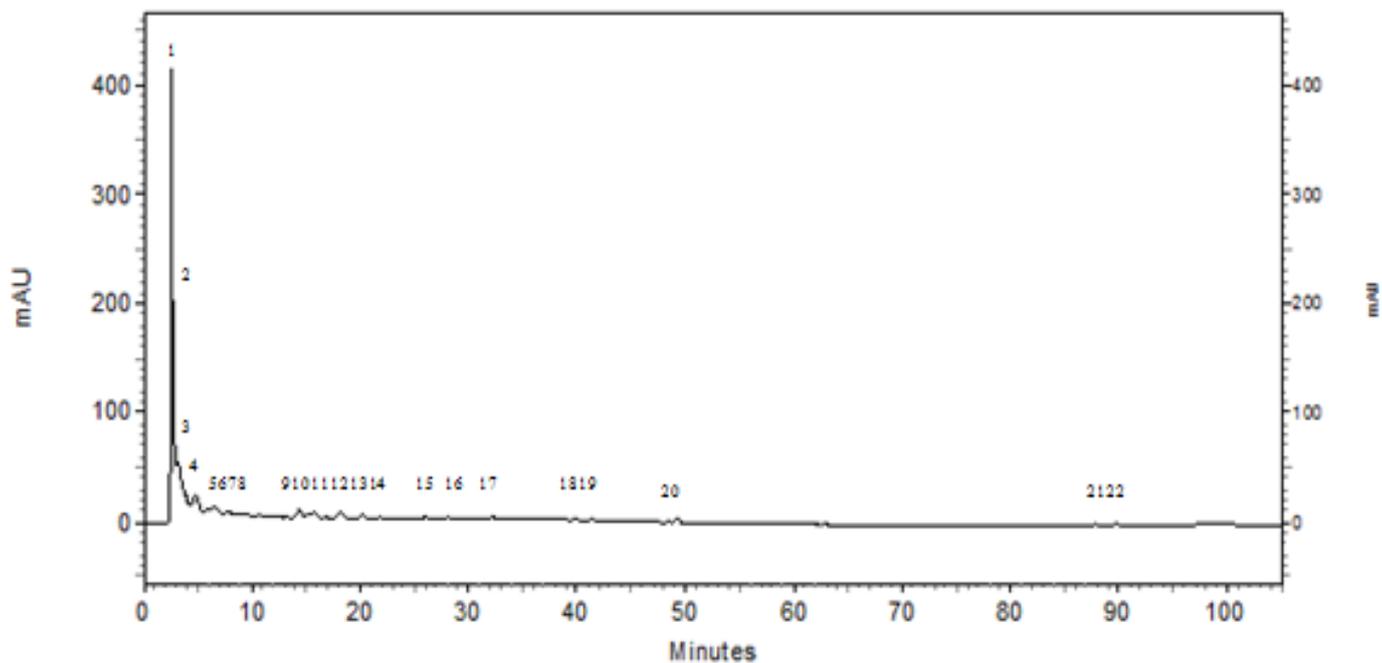
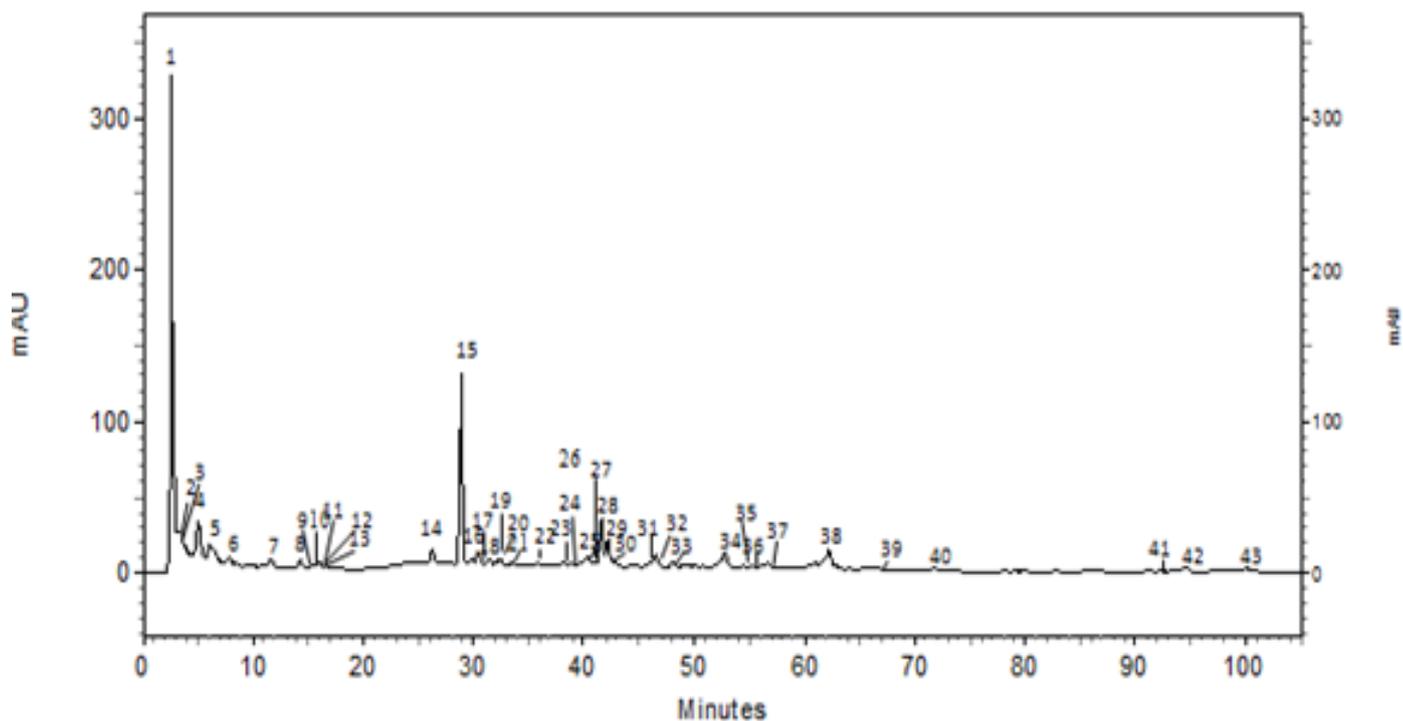
**Quadro 2:** Cromatogramas dos extratos de *D.ecastaphyllum*:

(Continuação).

**P34C****P34D**

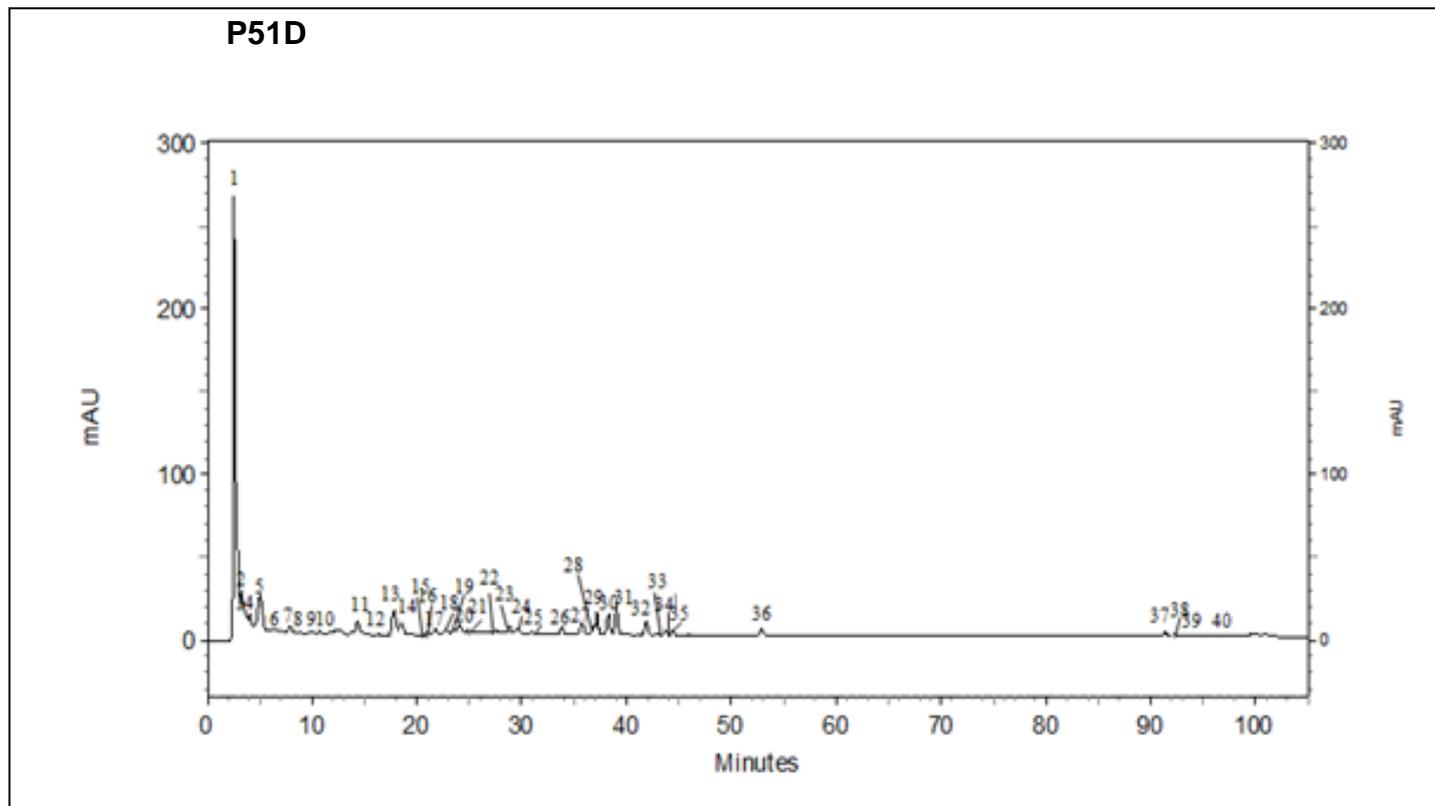
**Quadro 2:** Cromatogramas dos extratos de *D.ecastaphyllum*:

(Continuação).

**P48D2****P48E**

**Quadro 2:** Cromatogramas dos extratos de *D.ecastaphyllum*:

(Continuação).



(Conclusão).

Fonte: Colaborador Daniel Vieira de Moraes, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP).

A CLAE-FR foi realizada como o primeiro passo para uma caracterização prévia dos extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. É importante frisar que essa investigação é inédita na literatura, portanto não há relatos sobre substâncias eventualmente presentes nos extratos. Desta forma, os padrões utilizados para comparação química (item 4.8) foram estabelecidos por estarem presentes em tipos de própolis (inclusive própolis vermelha brasileira) e na resina de *D.ecastaphyllum*, a fim de encontrar possíveis similaridades químicas.

Analisando os cromatogramas gerados em fase reversa, é possível observar que maior parte dos compostos químicos dos extratos têm características polares, de acordo com as condições metodológicas empregadas. De acordo com Pereira et al. (2000), as análises de compostos de alto peso molecular e altamente polares em produtos naturais como própolis, podem necessitar de refinamentos durante o

processo, como derivatizações que facilitam a quantificação e separação dos compostos em técnicas cromatográficas.

Conhecendo a característica polar da maioria dos compostos presentes nos extratos revelada pela CLAE-FR, existe a possibilidade de utilização de outras fases móveis que permitam melhor separação dos analito, como a acetonitrila, utilizada na caracterização de compostos alcaloides produzidos pelo fungo endófitico *Undifilum* spp. (YANG et al., 2012).

A identificação de compostos químicos em extratos brutos de produtos naturais encontra outros obstáculos, como a similaridade entre as moléculas e dos tempos de retenção dos analitos. O emprego de espectrometria de massas de alta resolução permite a caracterização com precisão, devido à obtenção de até quatro casas decimais de massa do analito, superando outras técnicas cromatográficas por gerar com exatidão as medidas necessárias para diferenciação dos compostos de massa similar (CASS; CASSIANO, 2015).

Embora os extratos dos endófitos de *D.ecastaphyllum* tenham apresentado substâncias com tempo de retenção aparentemente semelhantes entre si e entre a própolis vermelha, devido às limitações encontradas no desempenho da metodologia, por hora não seria correto afirmar que há similaridade nos compostos. Novas cromatografias líquidas em fase reversa estão sendo empregadas com fases móveis mais polares para melhor separação dos compostos, e uma análise por cromatografia gasosa será realizada para identificação química na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo- USP, Piracicaba.

A identificação precisa dos compostos químicos permitirá realizar a associação entre as substâncias presentes nos extratos com os resultados antimicrobianos, antioxidantes e de viabilidade celular por MTS. Através dessa caracterização é possível sugerir quais as prováveis substâncias responsáveis pelas atividades bioativas e avaliar as atividades em extratos puros.

### **5.9 Caracterização dos endófitos por microcultivo.**

Os onze endófitos selecionados para a etapa de fermentação (item 5.4) foram submetidos ao microcultivo, no qual foram observadas as características microscópicas das colônias por período de 3, 5, 7 e 9 dias. A utilização da técnica objetivou a observação de estruturas reprodutivas que pudessem sugerir algum

gênero para classificação dos endófitos.

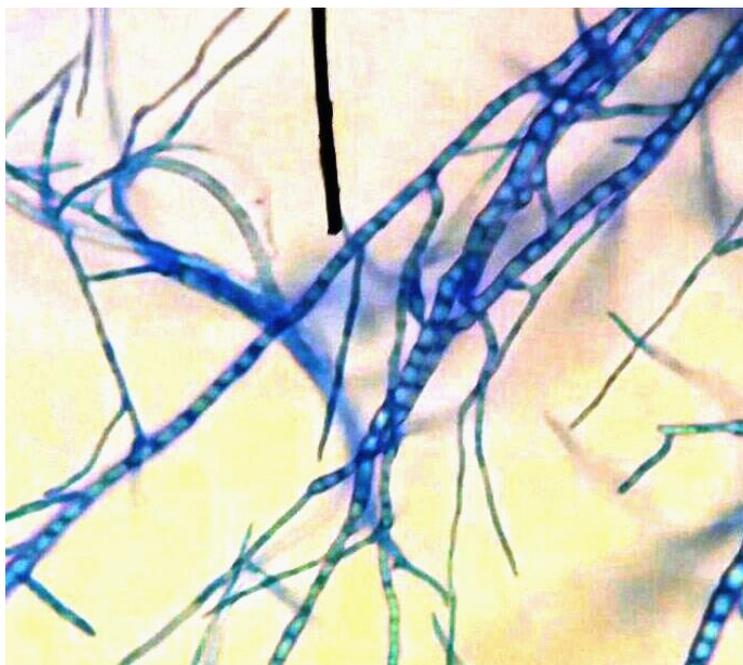
Macroscopicamente, as onze linhagens têm semelhanças quanto ao tempo de crescimento, que começa por volta do terceiro dia de cultivo em meio ABD, com colônias inicialmente brancas e algodonosas. Os pigmentos produzidos variam entre as colorações verde e alaranjada conforme o tempo em que as colônias residem no meio de cultivo.

Apenas pelas características macroscópicas de cultivo seria difícil identificar o gênero e espécie dos endófitos. A principal dificuldade encontrada foi a pouca disponibilidade de imagens na literatura e atlas para identificação de fungos de origem ambiental, que é muito escassa em relação à quantidade de manuais disponíveis para identificação de fungos e leveduras de importância médica disponíveis na literatura.

Outra observação importante é que grande parte dos trabalhos sobre endófitos nos quais foram disponibilizadas imagens das culturas, não há aplicação da técnica de microcultivo, que permite a visualização de hifas e estruturas de frutificação dos fungos. Dessa forma, muitos gêneros de fungos ambientais não possuem imagens microscópicas de qualidade para que sejam observadas as características singulares que os diferem dos gêneros mais comuns de fungos ambientais, como *Aspergillus* spp, *Trichoerma* spp. *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp, extensivamente representados em imagens microscópicas. Apenas a representação das colônias macroscópicas também pode acarretar em erro de identificação, pois muitos gêneros têm uma característica visual semelhante entre si.

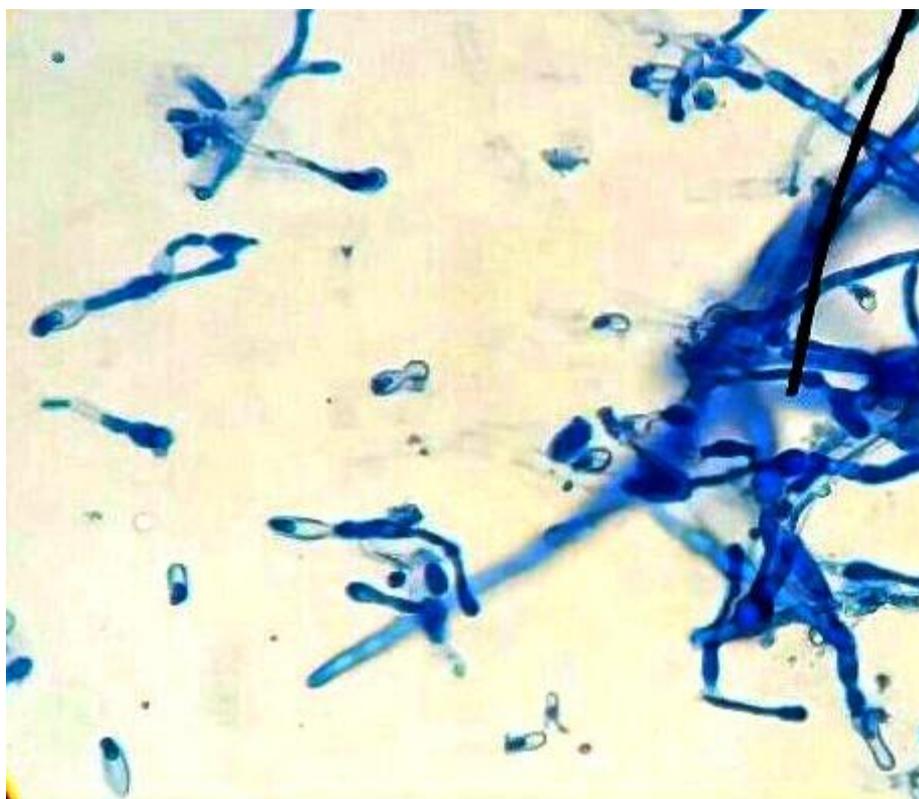
Através do microcultivo, foi possível observar que todos os endófitos são constituídos por hifas hialinas e septadas, havendo pouca ou nenhuma esporulação. Mais informações sobre as estruturas de esporulação não foram passíveis de obtenção, apenas o endófito P5B demonstrou possuir uma morfologia distinta, num primeiro momento, das demais culturas, possuindo hifas gomosas com duplas membranas de delimitação. As poucas estruturas de esporulação visualizadas sugerem que os endófitos são pertencentes ao filo Ascomycota.

A figura 17 ilustra as hifas hialinas e septadas observadas, comuns a todos os endófitos. A figura 18 ilustra as esporulações dos endófitos, e a figura 19 mostra as hifas do endófito P5B, único do grupo que apresentou uma morfologia diferenciada na metodologia.



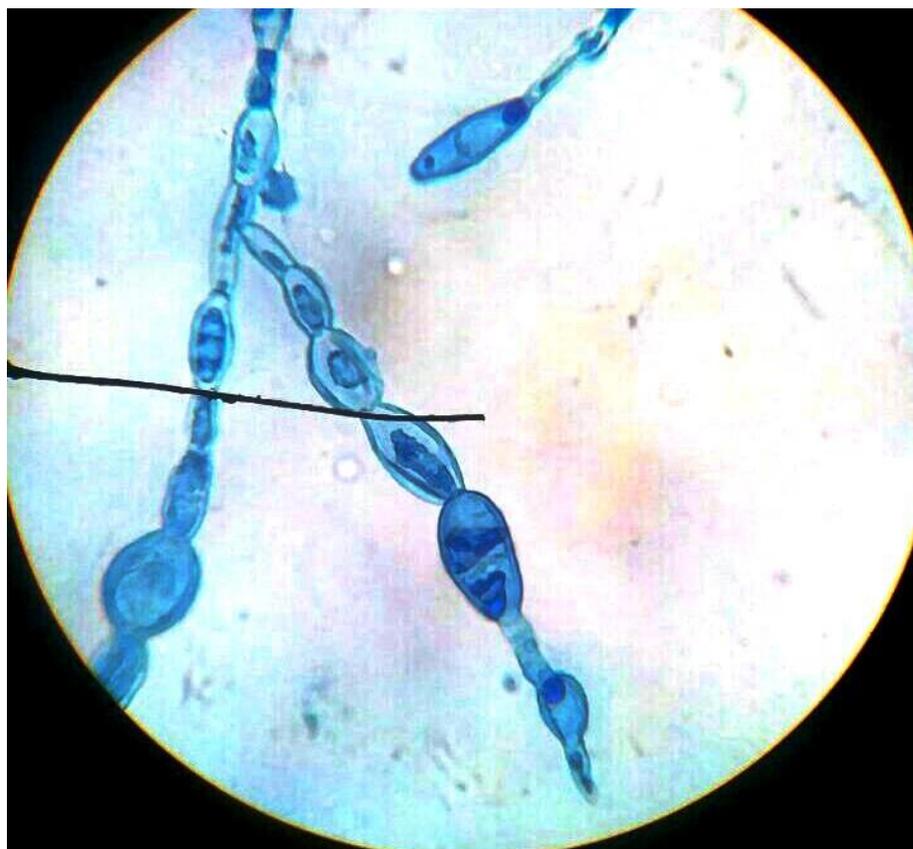
**Figura 17:** Hifas hialinas e septadas dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. Microscopia de luz 40x, em coloração com azul de algodão lactofenol

Fonte: Autora



**Figura 18:** Esporulações dos endófitos de *D.ecastaphyllum*. Microscopia de luz 40x, em coloração com azul de algodão lactofenol.

Fonte: Autora.



**Figura 19:** Hifas do endófito P5B de *D.ecastaphyllum*. Microscopia de luz 40x, em coloração com azul de algodão lactofenol

Fonte: Autora.

Sieber et al. (2007) abordaram importantes considerações a respeito da identificação de fungos endofíticos:

- 1) As linhagens endofíticas podem permanecer estéreis após o isolamento, impossibilitando a identificação com base na morfologia por microcultivo.
- 2) A morfologia de frutificação em meios de cultura pode distinguir-se significativamente da ocorrida nos tecidos do hospedeiro vegetal, o que implica maior dificuldade de determinação dos gêneros pelos meios de cultivo, que podem não fornecer os mesmos nutrientes do hospedeiro vegetal.
- 3) A comparação entre o sequenciamento gênico dos endófitos em cultura e dos mesmos no hospedeiro vegetal aumenta a acurácia da identificação.

- 4) Um mesmo endófito, que possua uma gama de hospedeiros vegetais diferentes, pode apenas esporular em alguns deles.
- 5) Mesmo com os avanços da utilização de regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para identificação dos endófitos, muitas sequências identificadoras ainda não estão inseridas nas bases de dados, pois muitas espécies não são conhecidas. Estima-se que haja 6 milhões de espécies de fungos nos variados ecossistemas, das quais apenas 100.000 foram formalmente descritas (NILSSON et al., 2016).

A identificação precisa de endófitos constitui um grande problema, principalmente para fungos, que já foram descritos erroneamente em alguns trabalhos, devido ao polimorfismo no hospedeiro e *in vitro*. O sequenciamento da região ITS vem sendo empregado como método preferencial de identificação, entretanto, para enriquecimento das informações na literatura a respeito das características morfológicas e microscópicas dos microrganismos, deve ser combinado com os métodos clássicos de identificação (KUSARI; SINGH; JAYBASKARAN, 2014).

Os fungos endofíticos de *D.ecastaphyllum* deverão ser investigados de forma mais profunda por análise de regiões ITS para obtenção de sua identidade taxonômica.

## 6- CONCLUSÃO

Foi comprovada a existência de uma microbiota endofítica constituída por fungos filamentosos, hialinos e septados, sugestivos do filo Ascomycota colonizando as folhas de *D.ecastaphyllum*.

Os endófitos mostraram atividades enzimáticas, antimicrobianas contra microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras do gênero *Candida*, além de atividade antioxidante com diferentes médias de capacidade de sequestro de radicais livres pelo ensaio com DPPH. Análises de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não determinaram a composição química dos extratos obtidos por fermentação fúngica, entretanto apontam a característica polar dos metabólitos secundários produzidos pelos endófitos.

Neste trabalho se estabeleceu um protocolo inédito e eficaz de isolamento de endófitos para as folhas de *D.ecastaphyllum*, no qual foi possível a recuperação de 150 fungos endofíticos, com taxa de colonização em 50%, maior número já documentado na literatura para a espécie vegetal.

Comprovou-se pela primeira vez a atividade antimicrobiana exercida pelos fungos endofíticos de *D.ecastaphyllum*, que foram ativos principalmente na inibição de bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae.

A resina de *D.ecastaphyllum* é a matéria-prima fundamental para a produção de própolis vermelha brasileira, o que constitui o primeiro relato de uma espécie leguminosa como fonte de própolis e seus endófitos constituem comprovadamente fontes de substâncias bioativas de interesse biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

- ABDOU, J. P. et al. New coumestan and coumaronochromone derivatives from *Dalbergia boehmii* Taub.(Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 109-113, 2017.
- AKRAM, N. A.; SHAFIQ, F.; ASHRAF, M.. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 613, 2017.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- AL-SNAFI, A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Dalbergia sissoo*-A review. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 59-71, 2017.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- AMIRITA, A. et al. Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World J. Sci. Technol**, v. 2, n. 2, p. 13-19, 2012.
- ANSARI, M. A. et al. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb.(F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 207-211, 2000.
- ARAUJO, J. M. E. **Chemical characterization and leishmanicidal activity of hydroethanolic extracts of Red Propolis and *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae)**. 2014. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.
- ARAÚJO, W. L. et al. Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. **Cop. Luiz de Queiroz, Piracicaba, 167p**, 2010.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.

- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**, v. 1, p. 189-207, 2007.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v. 68, n. 1-3, p. 87-98, 2016.
- BAOUNE, H. et al. Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 602-609, 2018.
- BARRETT, M. A. et al. CITES designation for endangered rosewood in Madagascar. **Science**, v. 328, n. 5982, p. 1109-1110, 2010.
- BASTOS, C. M. S. et al. Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 3, 2015.
- BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.
- BHAGWAT, R. M. et al. Two new potential barcodes to discriminate *Dalbergia* species. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0142965, 2015.
- BHATTACHARYA, M.; SINGH, A.; RAMRAKHYANI, C. *Dalbergia sissoo*-An Important Medical Plant. **Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n. 2, 2014.
- BICAS, J. L.; DIONISIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. **Chemical reviews**, v. 109, n. 9, p. 4518-4531, 2009.
- BOCK, R. The give-and-take of DNA: horizontal gene transfer in plants. **Trends in plant science**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Detecção e identificação dos fungos de importância médica**. Módulo VII, 2004. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod_7_2004.pdf)>. Acesso em 18/06/2019.
- BRIJESH, S. et al. Studies on *Dalbergia sissoo* (Roxb.) leaves: possible mechanism (s) of action in infectious diarrhoea. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 120, 2006.
- BUCHANAN, R. L. et al. review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food control**, 2017.
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, 2009.
- CAMARGO, R. A. **A tribo Dalbergieae (Leguminosae-Faboideae) no estado de Santa Catarina, Brasil. 2005**. 148 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

CANEI, A. D. et al. **Eficiência simbiótica de rizóbios autóctones de áreas de restinga em leguminosas nativas do Parque Estadual do Rio de Vermelho, Florianópolis, SC.** 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina- SC, 2017.

CARDOSO, D. B. O. S. et al. Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 58-75, 2013.

CASS, Q.; CASSIANO, N. **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações.** Elsevier Brasil, 2015.

CHEN, L. et al. Genome mining of *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B-24674 T for the discovery of the gene cluster involved in anticomplement activities and detection of novel xiamycin analogs. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 22, p. 9549-9562, 2018.

CHOI, Y. W.; HODGKISS, I. J.; HYDE, K. D. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. **J Agric Technol**, v. 1, p. 55-66, 2005.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 2017.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** 11th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts.** 4<sup>a</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

CONTRERAS, G. et al. Oxidative stress and the presence of bacteria increase gene expression of the antimicrobial peptide aclasin, a fungal CS $\alpha$  $\beta$  defensin in *Aspergillus clavatus*. **PeerJ**, v. 7, p. e6290, 2019.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

CUI, J. L. et al. Correlation in Chemical Metabolome and Endophytic Mycobiome in *Cynomorium songaricum* from Different Desert Locations in China. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2019.

DALARMI, L. et al. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae-Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 35, p. 881-885, 2015.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DE CARVALHO, A. M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, p. 87-109, 1997.

DE KRAKER, M. E.A; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. **PLoS medicine**, v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.

DE OLIVEIRA, K. B.; DE OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 11-11, 2012.

DE SOUSA, D. P. et al. Influence of the chirality of (R)-(-)-and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. **Chirality**, v. 19, n. 4, p. 264-268, 2007.

DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 715, 2015.

DIK, D. A.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. Cell-wall recycling of the Gram-negative bacteria and the nexus to antibiotic resistance. **Chemical reviews**, v. 118, n. 12, p. 5952-5984, 2018.

DING, L. et al. Xiamycin, a pentacyclic indolosesquiterpene with selective anti-HIV activity from a bacterial mangrove endophyte. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 22, p. 6685-6687, 2010.

DOMALAON, R. et al. Antibiotic hybrids: the next generation of agents and adjuvants against gram-negative pathogens?. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 2, p. e00077-17, 2018.

DOMINGUEZ, E. G. et al. Conserved Role for Biofilm Matrix Polysaccharides in *Candida auris* Drug Resistance. **mSphere**, v. 4, n. 1, p. e00680-18, 2019.

DOS SANTOS, D. A. et al. Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. **Biotechnology Research and Innovation**, 2019.

DOTY, S. L. et al. Enhanced degradation of TCE on a Superfund site using endophyte-assisted poplar tree phytoremediation. **Environmental science & technology**, v. 51, n. 17, p. 10050-10058, 2017.

E SILVA, F. H. M.; DOS SANTOS, F. A. R. Pollen morphology of the shrub and arboreal flora of mangroves of Northeastern Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v. 17, n. 5, p. 423, 2009.

EK-RAMOS, M. J. et al. Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

ENES, R. F. et al. Synthesis and antioxidant activity of [60] fullerene–BHT conjugates. **Chemistry–A European Journal**, v. 12, n. 17, p. 4646-4653, 2006.

FAN, Z. M. et al. *Dalbergia odorifera* extract promotes angiogenesis through upregulation of VEGFRs and PI3K/MAPK signaling pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p. 132-141, 2017.

FERREIRA, J. M.; NEGRI, G. Composição química e atividade biológica das própolis brasileiras: verde e vermelha. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 6, n. 1, p. 06-15, 2019.

FORTKAMP, D. **Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.** 2018.185p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2018.

FRANCIS, J. K. et al. Wildland shrubs of the United States and its Territories: thamnisc descriptions: volume 1. **General Technical Report-International Institute of Tropical Forestry, USDA Forest Service**, n. IITF-GTR-26, 2004. Disponível em: <[http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildland\\_shrubs.htm](http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildland_shrubs.htm)>. Acesso em: 01/06/2019.

GALLO, M. B.; GUIMARAES, D. O. Endophytic Fungi. **Microbial Biotechnology**, p. 139, 2008.

GAO, X. X. et al. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, n. 2, p. 255-266, 2005.

GASKELL, J. et al. Transcriptome and secretome analyses of the wood decay fungus *Wolfiporia cocos* support alternative mechanisms of lignocellulose conversion. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 13, p. 3979-3987, 2016.

GONG, J. et al. Genetic Differentiation, Diversity, and Drug Susceptibility of *Candida krusei*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

GÖRE, M. E.; BUCAK, C. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. **Forest Pathology**, v. 37, n. 4, p. 281-288, 2007.

GOUTAM, J. et al. Endophytic Fungi: Carrier of Potential Antioxidants. In: **Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives**. Springer, Singapore, 2018. p. 539-551.

GREETATORN, T. et al. Empowering rice seedling growth by endophytic *Bradyrhizobium* sp. SUTN 9-2. **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 3, p. 258-266, 2019.

GRIFFITHS, M. W.; SCHRAFT, H. *Bacillus cereus* food poisoning. In: **Foodborne diseases**. Academic Press, 2017. p. 395-405.

GUIMARÃES, D. O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans***. 2009. 186 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GUO, Z. K. et al. Aspergiloid I, an unprecedented spiro lactone norditerpenoid from the plant-derived endophytic fungus *Aspergillus* sp. YXf3. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 10, p. 2677, 2014.

HAJARE, S. W. et al. Analgesic and antipyretic activities of *Dalbergia sissoo* leaves. **Indian journal of pharmacology**, v. 32, n. 6, p. 357-360, 2000.

HAJARE, S. W. et al. Analgesic and antipyretic activities of *Dalbergia sissoo* leaves. **Indian journal of pharmacology**, v. 32, n. 6, p. 357-360, 2000.

HAM, S. A. et al. Ethanol extract of *Dalbergia odorifera* protects skin keratinocytes against ultraviolet B-induced photoaging by suppressing production of reactive oxygen species. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 79, n. 5, p. 760-766, 2015.

HAMILTON, C. E. et al. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2012.

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

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HARTVIG, I. et al. The use of DNA barcoding in identification and conservation of rosewood (*Dalbergia* spp.). **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138231, 2015.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current opinion in chemical biology**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2007.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HASSOLD, S. et al. DNA barcoding of malagasy rosewoods: towards a molecular identification of CITES-listed *Dalbergia* species. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157881, 2016.

HAWKEY, P. M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 4, p. 241-247, 2015.

HILÁRIO, F. et al. Antimicrobial screening of endophytic fungi isolated from the aerial parts of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) led to the isolation of secondary metabolites produced by *Fusarium fujikuroi*. **Journal of the Brazilian Chemical**

**Society**, v. 28, n. 8, p. 1389-1395, 2017.

ICHIKAWA, T. et al. **Folia microbiologica**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

JAKUBIEC-KRZESNIAK, K. et al. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. **Polish journal of microbiology**, v. 67, n. 3, p. 259-272, 2018.

EFFERY-SMITH, A. et al. *Candida auris*: a review of the literature. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 1, p. e00029-17, 2018.

JIA, M. et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 906, 2016.

JORDAN, K. ; MCAULIFFE, O. *Listeria monocytogenes* in Foods. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, 2018. p. 181-213.

KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Cytotoxicities of two new isoflavanes from the roots of *Dalbergia velutina*. **Journal of natural medicines**, v. 71, n. 1, p. 310-314, 2017.

KALE, M. et al. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 300-304, 2007.

KHAN, A. L. et al. Endophytic microbes: a resource for producing extracellular enzymes. In: **Endophytes: Crop Productivity and Protection**. Springer, Cham, 2017. p. 95-110.

KIM, D. C. et al. Heme Oxygenase-1-Inducing Activity of 4-Methoxydalbergione and 4'-Hydroxy-4-methoxydalbergione from *Dalbergia odorifera* and Their Anti-inflammatory and Cytoprotective Effects in Murine Hippocampal and BV2 Microglial Cell Line and Primary Rat Microglial Cells. **Neurotoxicity Research**, p. 1-16, 2017.

KRINGS, M. et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 648-657, 2007.

KULP, A. ; KUEHN, M. J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 163-184, 2010.

KUMARI, S. ; SARKAR, P. K. *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. **Food Control**, v. 69, p. 20-29, 2016.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297-303, 2014.

LANIGAN, R. S.; YAMARIK, T. A. Final report on the safety assessment of BHT (1). **International journal of toxicology**, v. 21, p. 19-94, 2002.

- LEE, D. S. et al. The Neoflavonoid Latifolin Isolated from MeOH Extract of *Dalbergia odorifera* Attenuates Inflammatory Responses by Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation via Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression. **Phytotherapy research**, v. 28, n. 8, p. 1216-1223, 2014.
- LENZI, J. et al. Medicinal fungi: a source of antiparasitic secondary metabolites. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5791-5810, 2018.
- LI, H.X. et al. Peroxiredoxin 1 promoted tumor metastasis and angiogenesis in colorectal cancer. **Pathology-Research and Practice**, v. 214, n. 5, p. 655-660, 2018.
- LI, Q. et al. The phylogenetic analysis of *Dalbergia* (Fabaceae: Papilionaceae) based on different DNA barcodes. **Holzforschung**, v. 71, n. 12, p. 939-949, 2017.
- LI, X. Z. ; PLÉSIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.
- LIEW, S. M. et al. Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **PeerJ**, v. 7, p. e6217, 2019.
- LIMA, Urgel de Almeida et al. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. **São Paulo: Edgard Blücher**, v. 3, p. 1-43, 2001.
- LOHSE, R. et al. Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of *Beauveria bassiana* in oilseed rape plants. **Biological Control**, v. 88, p. 26-36, 2015.
- LOPEZ, B. G. C. et al. **Análise química dos compostos bioativos da própolis vermelha: Chemical analysis of the bioactive compounds of red propolis**. 2017. 120 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências, Universidade Estadual de Campinas, 2017.
- LUMACTUD, R. ; FULTHORPE, R. R. Endophytic bacterial community structure and function of herbaceous plants from petroleum hydrocarbon contaminated and non-contaminated sites. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.
- MACIEL, R. D. S. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (fabaceae)**. 2016. 142 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- MANDAL, S.; BANERJEE, D. Proteases from Endophytic Fungi with Potential Industrial Applications. In: **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Springer, Cham, 2019. p. 319-359.
- MCELROY, C.; JENNEWEIN, S. Taxol® biosynthesis and production: from forests to fermenters. In: **Biotechnology of Natural Products**. Springer, Cham, 2018. p. 145-

185.

MELO, L. S. D. M. et al. **Caracterização química e identidade genética de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados**. 2016. 111 f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe, 2016.

MENDONÇA-MELO, L. et al. Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 1, p. 32-39, 2017.

MIRANDA, A.L.P.; FRAGA, C.A.M. **Free radical scavenger activity: determination of the antioxidant profile of bioactive substances**. In: MONGE, A.; BARREIRO, E.J.; (Org.). *Practical Studies for Medicinal Chemistry: an integrating approach for developing*. **IUPAC**, 2006. Disponível em: <[www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/)>. Acesso em: novembro de 2017.

MISAR, A. V. et al. Analgesic Activity of *Dalbergia lanceolaria*. Bark Extract in Swiss Albino Mice. **Pharmaceutical biology**, v. 43, n. 8, p. 723-725, 2005.

MORAIS, R. R. **Produção de etanol pela levedura *Saccharomyces bayanus* INCQS 40235 a partir do amido de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

MUJUMDAR, A. M.; MISAR, A. V.; UPADHYE, A. S. Antidiarrhoeal activity of ethanol extract of the bark of *Dalbergia lanceolaria*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 213-216, 2005.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

NAIK, B. S. Potential Roles for Endophytic Fungi in Biotechnological Processes: A Review. In: **Plant and Human Health, Volume 2**. Springer, Cham, 2019. p. 327-344.

NARAYANAN, M. C. et al. Isolation and characterisation of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*. **Natural product research**, v. 21, n. 10, p. 903-909, 2007.

NEMETH, J.; OESCH, G.; KUSTER, S. P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 382-395, 2015.

NESIC, K. ; IVANOVIC, S. ; NESIC, V. Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 228**. Springer, Cham, 2014. p. 101-120.

NEWMAN, D. J. From natural products to drugs. **Physical Sciences Reviews**, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981

to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NILSSON, R. H. et al. Top 50 most wanted fungi. **MycoKeys**, n. 12, p. 29-40, 2016.

NITHANIYAL, S. et al. DNA barcode authentication of wood samples of threatened and commercial timber trees within the tropical dry evergreen forest of India. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107669, 2014.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G.D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.552-558, 2011.

O'NEILL, J. AMR Review Paper-Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **AMR Review Paper**, 2014.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S20-S28, 2006.

PATIL, M. G. et al. Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 4, n. 3, p. 1035-1042, 2015.

PATIL, V. M.; MASAND, N. Anticancer Potential of Flavonoids: Chemistry, Biological Activities, and Future Perspectives. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2019. p. 401-430.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prémio Nobel (1945). **História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**, v. 6, 2018.

PEREIRA, A. S. et al. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by high-temperature high-resolution gas chromatography– mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5226-5230, 2000.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural toxins**, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1993.

PETSKO, G. A. et al. For medicinal purposes. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 7-10, 1996.

PIETRZAK, W. ; KAWA-RYGIELSKA, J. Backset valorization in dry-grind ethanol process by co-culture of edible filamentous fungi and fodder yeast. **Journal of Cleaner Production**, v. 220, p. 376-385, 2019.

PLUEMPANUPAT, S. et al. Laboratory evaluation of *Dalbergia oliveri* (Fabaceae: Fabales) extracts and isolated isoflavonoids on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Industrial crops and products**, v. 44, p. 653-658, 2013.

POLONI, M. M. et al. **Estudo da produção de substâncias bioativas por fungos endofíticos do mangue**. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

PRADIP, G. et al. Recent alkaloids from *Dalbergia sissoo* and various herbs as anticancer agents. **International Journal of Traditional System of Medicine**, v. 1, p. 28-33, 2014.

PRATIWI, R. H. et al. Bioactivity of Antibacterial Compounds Produced by Endophytic Actinomycetes from *Neesia altissima*. **Journal of Tropical Life Science**, v. 8, n. 1, 2018.

PRESTERL, E. et al. Multiresistant Microorganisms and Infection Control. In: **Basic Microbiology and Infection Control for Midwives**. Springer, Cham, 2019. p. 97-105.

PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 494-510, 2006.

PYE, C. R. et al. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The Genus *Aspergillus* (Baltimore, The Williams and Wilkins Co). 1965.

RICHARDSON, A. R.; SOMERVILLE, Greg A.; SONENSHEIN, Abraham L. Regulating the intersection of metabolism and pathogenesis in Gram-positive bacteria. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, 2015.

ROSSETO, R. E. et al. Panorama do etanol brasileiro. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 5, p. 13-22, 2017.

ROUT, G. R. et al. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. **Biodiversity & Conservation**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2003.

RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological research**, v. 214, p. 74-82, 2018.

SADEGHI, F. et al. Diversity and Spatiotemporal Distribution of Fungal Endophytes Associated with *Citrus reticulata* cv. Siyadoo. **Current microbiology**, v. 76, n. 3, p. 279-289, 2019.

SAHA, S. et al. Antibacterial and cytotoxic potential of *Dalbergia spinosa* Roxb.

leaves. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 1, p. 512, 2013.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 895-906, 2002.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2-13, 2015.

SANTOS, P. D. S. **PROSPECÇÃO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DE MANIPUEIRA COM *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, 2017.

SANTOYO, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SCHULZ, B. et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological research**, v. 97, n. 12, p. 1447-1450, 1993.

SEBASTIANES, F. L. S.; DE AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. T. Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, 2017. p. 37-56.

SENCZYNA, F. et al. Diversity of resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a health care system in Northern California, from 2013 to 2016. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 93, n. 3, p. 250-257, 2019.

SER, H. L. et al. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: a systematic review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 522, 2016.

SHAH, M. H.; MUKHTAR, I.; KHAN, S. N. Medicinal importance and association of pathological constraints with *Dalbergia sissoo*. **Pak J Phytopathol**, v. 22, n. 2, p. 135-138, 2010.

SHAHRYARI, Z. et al. Amylase and Xylanase from Edible Fungus *Neurospora intermedia*: Production and Characterization. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 721, 2019.

SHAKYA, A. K. Medicinal plants: future source of new drugs. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 4, p. 59-64, 2016.

SIAH, A. et al. Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. In: **Natural Antimicrobial Agents**. Springer, Cham, 2018. p. 121-159.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 75-89, 2007.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, S. M. D. et al. **Correlação metabólica entre fungos endofíticos de amaryllidaceae e as plantas hospedeiras na busca por substâncias bioativas**. 2016. 98f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará, 2016.

SOARES, R. D. S. **Estudo fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub (Fabaceae)**. 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

SOLIMAN, S. S. M.; RAIZADA, M. N. Darkness: a crucial factor in fungal taxol production. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 353, 2018.

STROBEL, G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 57, 2018.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUN, X.; GUO, L. D.. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, v. 3, n. 1, p. 65-76, 2012.

TAGHAVI, S. et al. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 12, p. 8500-8505, 2005.

TAKAHASHI, M. et al. In vitro screening of leishmanicidal activity in Myanmar timber extracts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 921-925, 2004.

THIJS, S. et al. Towards an enhanced understanding of plant–microbiome interactions to improve phytoremediation: engineering the metaorganism. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 341, 2016.

THOMFORD, N. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Antiplasmodial potential and GC-MS fingerprint of endophytic fungal extracts derived from *Cameroonian Annona muricata*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 235, p. 111-121, 2019.

TOLEDO, J. et al. Pathogenicity of three formulations of *Beauveria bassiana* and efficacy of autoinoculation devices and sterile fruit fly males for dissemination of conidia for the control of *Ceratitis capitata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 164, n. 3, p. 340-349, 2017.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1, 2019.

UCHENDU, C. N.; KAMALU, T. N.; ASUZU, I. U. A preliminary evaluation of antifertility activity of a triterpenoid glycoside (DSS) from *Dalbergia saxatilis* in female *Wistar* rats. **Pharmacological research**, v. 41, n. 5, p. 521-525, 2000.

ULLA, A. et al. Investigation of In-vivo Anti-diarrheal and In-vitro Antihelminthic properties of Methanolic Leaves Extract of *Dalbergia stipulacea* Roxb. **Biomedical Research and Therapy**, v. 2, n. 12, p. 426-434, 2015.

VASUDEVA, N. et al. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*-A review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, n. 6, p. 307, 2009.

VERMA, H. P.; SINGH, S. K. Effect of aqueous leaf extract of *Dalbergia sissoo* Roxb. on spermatogenesis and fertility in male mice. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, v. 19, n. 6, p. 475-486, 2014.

VEYSSEYRE, F. et al. *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 45, n. 11-12, p. 436-440, 2015.

WANG, S. N. et al. Distinction of four *Dalbergia* species by FTIR, 2nd derivative IR, and 2D-IR spectroscopy of their ethanol-benzene extractives. **Holzforschung**, v. 70, n. 6, p. 503-510, 2016.

WAQAS, M. et al. Endophytic infection alleviates biotic stress in sunflower through regulation of defence hormones, antioxidants and functional amino acids. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, n. 4, p. 803-824, 2015.

WELLINGTON, E. M. H. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 155-165, 2013.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WIELAND, K.; CHHATWAL, P.; VONBERG, R. P. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. **American journal of infection control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.

WU, L. et al. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. **Current microbiology**, v. 66, n. 1, p. 40-48, 2013.

XIE, X. S. et al. A new dimeric anthraquinone from endophytic *Talaromyces* sp. YE3016. **Natural product research**, v. 30, n. 15, p. 1706-1711, 2016.

XU, G.; GOODELL, B. Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. **Journal of biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 43-57, 2001.

YANG, G.D. et al. Determination of swainsonine in the endophytic *Undifilum* fungi by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detector. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 44-49, 2012.

YANG, M.Z. et al. Fungal endophytes as a metabolic fine-tuning regulator for wine grape. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0163186, 2016.

YANG, X. et al. Preliminary study of a vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Chinese traditional and herbal drugs**, v. 35, n. 1, p. 79-81, 2004.

YEMITAN, O. K.; ADEYEMI, O. O. Mechanistic assessment of the analgesic, anti-inflammatory and antipyretic actions of *Dalbergia saxatilis* in animal models. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 898-905, 2017.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, Pin-Der. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 193-200, 2005.

YIN, X. et al. Identification of three *Dalbergia* species based on differences in extractive components. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2163, 2018.

YU, J. et al. A critical courier role of volatile oils from *Dalbergia odorifera* for cardiac protection in vivo by QiShenYiQi. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7353, 2017.

YU, M. et al. Testing three proposed DNA barcodes for the wood identification of *Dalbergia odorifera* T. Chen and *Dalbergia tonkinensis* Prain. **Holzforschung**, v. 70, n. 2, p. 127-136, 2016.

ZHOU, J. et al. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0197359, 2018.

ZHU, Y. et al. Iron sequestration in brown-rot fungi by oxalate and the production of reactive oxygen species (ROS). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 185-190, 2016.

## ANEXO



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A9A52D7

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A9A52D7**  
 Usuário: **UNIFAL-MG**  
 CPF/CNPJ: **17.879.859/0001-15**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso:

**Pesquisa Científica**       **Bioprospecção**       **Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Phoma herbarum**  
**Alternaria alternata**  
**Microsphaeropsis sp**  
**Paraconiothyrium sp**  
**Rhizoctonia sp**  
**Gibberella moniliformis**  
**Aspergillus niger**

Título da Atividade: **Determinação da composição química e atividade biológica de fungos endofíticos isolados de diferentes plantas.**

**Equipe**

**Masaharu Ikegaki**      **UNIFAL-MG**  
**Severino Matias de Alencar**      **USP**

Pedro Luiz Rosalen	Unicamp
Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho	UNIFAL-MG
Andrea Natan de Mendonça	UNIFAL-MG
Barbara Helena Muniz Padro e Felipe	UNIFAL-MG
Ana Lucia Tasca Gois Ruiz	Unicamp
Joao Ernesto de Carvalho	Unicamp
Raquel Maria Lima Lemes	UNIFAL-MG
Marina Miranda Poloni	UNIFAL-MG
Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Priscilla Oliveira Amaral	UNIFAL-MG
Maria Tereza Carneiro Paschoal Bernardes	UNIFENAS
Anne Letícia Silva Ferri	UNIFAL-MG
Daniela Aparecida Chagas de Paula	UNIFAL-MG
Eliane de Oliveira Silva	UFBA
Aline Rocha	UNIFAL-MG
Maurette dos Reis Vieira Fernandes	UNIFAL-MG
Tales Alexandre Costa e Silva	USP
Marisa Aparecida de Lima Coral	UNIFAL-MG
Daniel Vieira de Morais	USP
Rayra Annara da Fonseca Otacilio Pinto	UNIFAL-MG
Paulo Teixeira Lacava	UFSCar
Franciele Ávila Martins Carneiro	UNIFAL-MG