



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,
LEISHMANICIDA E CITOTÓXICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS
Diaporthe sp. E *Pseudofusicoccum sp.*
OBTIDOS DE MANGUE E CERRADO BRASILEIROS**

Carla Cristina Moreira

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadores:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Bolsista CAPES - Processo nº 1618429

**São Carlos - SP
2020**

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

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores e aos profissionais de saúde, nesse momento tão atípico e delicado, de uma pandemia. Com todo meu respeito, gratidão e admiração. Vocês são heróis.

Ofereço este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais Carlos e Sônia, à minha irmã Cibele e à minha sobrinha Nina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é meu universo;

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, pela orientação, ensinamentos, paciência, compreensão, oportunidade e privilégio em tê-lo como orientador;

À Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, pela orientação, ensinamentos, paciência, compreensão, oportunidade e privilégio em tê-la como orientadora;

À profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, pelo apoio e aprendizado dentro e fora do LAB, você é muito especial e querida;

À Dra. Andréa Cristina Bogas (Deia linda) por todo o apoio científico e pela amizade especialmente aquariana que construímos;

À profa. Dra. Márcia Nitschke e sua aluna mestra Paula de Camargo Bertuso, da Universidade de São Paulo, Campus II, São Carlos-SP, pela colaboração com parte dos ensaios antimicrobianos;

À profa. Dra. Ângela Merice de Oliveira Leal e sua aluna (também minha grande amiga) Dra. Genoveva Lourdes Flores Luna, do Departamento de Medicina da UFSCar, Campus São Carlos, pela colaboração com os ensaios de citotoxicidade;

À técnica Joana Bressolin, do Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação, pela colaboração em liofilizar minhas amostras;

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar);

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFSCar;

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES);

À todo o corpo docente do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, UFSCar, por todo conhecimento somado ao longo desses anos;

À Claudia Pastega, secretária do PPGBiotec, obrigada por tudo sempre;

Ao Departamento de Morfologia e Patologia (DMP), todo o corpo docente e colaboradores. A alguns de vocês, obrigada pela companhia agradável nas pausas para o café;

Aos meus amigos de LAB e de vida Bianca, Genoveva e Rafael (em ordem alfabética pois são igualmente importantes). Foi mais especial com vocês. Obrigada até aqui. E vamos continuar seguindo juntos;

À minha parceirinha de vida e grande colaboradora na confecção de gráficos Juliana Virginio da Silva (Juiana);

À minha amiga Julia Matias, pela companhia no LAB em horários alternativos e pela amizade que enobrece a minha jornada;

À todos os meus amigos (não vou citar nomes para não correr o risco de ser injusta), que de forma indireta, sendo ouvidos, ombros, preces, bares ou festas, apoiam e iluminam meu caminho;

Aos meus pais Carlos e Sônia, minha irmã Cibele e minha sobrinha Nina, pelo amor incondicional que sustenta a minha vida. Eu amo vocês com todo o meu coração.

Ao Salomão, meu cachorrinho que “me adotou” e me ensina todos os dias sobre o “amor que não cansa nunca de amar”.

A todos, meus sinceros e ternos agradecimentos.

Moreira, Carla Cristina. **Avaliação das atividades antimicrobiana, leishmanicida e citotóxica dos fungos endofíticos *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. obtidos de mangue e cerrado brasileiros.** 2020. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) - UFSCar, São Carlos, 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Doutorado da candidata Carla Cristina Moreira, realizada em 25/09/2020:



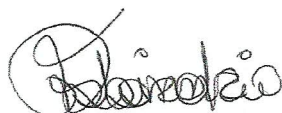
Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Fabiana Cristina Donofrio
Universidade Federal de Mato Grosso



Prof. Dr. Bruno Antonio Marinho Sanchez
Universidade Federal de Mato Grosso

RESUMO

O mangue é um ecossistema de transição entre o ambiente terrestre e o marinho, típico de regiões tropicais e subtropicais. O cerrado é um ecossistema que caracteriza-se principalmente pelo bioma savana, que são zonas de transição entre prados e bosques e são ínsitos de regiões tropicais de estação seca. Nesses dois sistemas, diversos microrganismos já foram isolados, entre eles, os fungos endofíticos, capazes de produzir substâncias com atividades antimicrobianas e leishmanicidas, entre outras. Com base nessas informações, esse trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial biotecnológico dos extratos brutos (EB) obtidos dos fungos endofíticos *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp., isolados de mangue e cerrado brasileiros, respectivamente. Foram realizados *in vitro* ensaios antimicrobianos com patógenos humanos, ensaios leishmanicidas e ensaios citotóxicos. Nos ensaios antimicrobianos foi encontrada a concentração inibitória mínima de 50% (CIM₅₀) entre 756 µg.mL⁻¹ e 949 µg.mL⁻¹ e a concentração inibitória mínima de 90% (CIM₉₀) entre 3.940 e 3.980 µg.mL⁻¹ para o EB do isolado do mangue. Para o EB isolado do cerrado foi encontrada CIM₅₀ entre 4.228 µg.mL⁻¹ e 29.630 µg.mL⁻¹ e CIM₉₀ entre 9.24 µg.mL⁻¹ e 38.250 µg.mL⁻¹. A concentração Bactericida Mínima (CBM) foi encontrada para o microrganismo *Bacillus subtilis*, na concentração de 10.000 µg.mL⁻¹. Nos ensaios leishmanicidas, os resultados apresentam morte celular de 90% nas concentrações de 6.000 e 10.000 µg.mL⁻¹ e de 80% na concentração de 4.000 µg.mL⁻¹ para o EB do isolado do mangue. No EB do isolado do cerrado, os ensaios leishmanicidas apresentaram viabilidade celular acima de 90% nas concentrações de 20.000 e 40.000 µg.mL⁻¹. Para os ensaios de citotoxicidade no EB do isolado do mangue, foram apresentados viabilidade celular entre 55 e 73%. Para o isolado do cerrado foram apresentadas viabilidade celular entre 5,41 a 16,84%. Esses resultados reforçam o potencial biotecnológico dos microrganismos isolados de manguezais e cerrados, representado pelos isolados testados nesse trabalho.

Palavras-chave: mangue; cerrado; fungos endofíticos; ensaios antimicrobianos; ensaios leishmanicidas.

ABSTRACT

The mangrove is a transition ecosystem between the terrestrial and the marine environment, typical of tropical and subtropical regions. The Brazilian savannah is an ecosystem that is mainly characterized by the savanna biome, which are transition zones between meadows and forests and are native to tropical regions of the dry season. In these two systems, several microorganisms have already been isolated, including endophytic fungi, capable of producing substances with antimicrobial and leishmanicidal activities, among others. Based on this information, this study aimed to evaluate the biotechnological potential of crude extracts (EB) obtained from endophytic fungi *Diaporthe* sp. and *Pseudofusicoccum* sp., isolated from Brazilian mangroves and savannah, respectively. In vitro antimicrobial tests with human pathogens, leishmanicidal tests and cytotoxic tests were performed. In antimicrobial assays, the minimum inhibitory concentration of 50% (MIC50) between 756 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 949 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and the minimum inhibitory concentration of 90% (MIC90) between 3.940 and 3.980 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were found for the EB of the mangrove isolate. For EB isolated from the savannah, CIM50 between 4.228 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 29.630 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and CIM90 between 9.24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 38.250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ were found. The Minimum Bactericidal Concentration (CBM) was found for the microorganism *Bacillus subtilis*, at a concentration of 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In leishmanicidal assays, the results show cell death of 90% at concentrations of 6.000 and 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 80% at a concentration of 4,000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the EB of the mangrove isolate. In the EB of the savannah isolate, the leishmanicidal assays showed cell viability above 90% at concentrations of 20.000 and 40.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. For cytotoxicity tests on the EB of the mangrove isolate, cell viability between 55 and 73% was presented. For the savannah isolate, cell viability between 5.41 to 16.84% was presented. These results reinforce the biotechnological potential of microorganisms isolated from mangroves and savannah, represented by the isolates tested in this work.

Keywords: mangrove; savannah; endophytic fungi; antimicrobial assays; leishmanicidal assays.

Lista de ilustrações

Figura 1. Distribuição dos manguezais do Brasil. Fonte: Atlas dos Manguezais do Brasil.	16
Figura 2. Vegetação de manguezal. Fonte: Atlas dos Manguezais do Brasil.	16
Figura 3. Distribuição do Cerrado no Brasil. Fonte: INPE.....	18
Figura 4. Avaliação da viabilidade de (A) <i>E. coli</i> , (B) <i>S. setubal</i> e (C) <i>S. aureus</i> em diferentes concentrações através do ensaio Alamar Blue®, possibilitando visualizar as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas.	34
Figura 5. Avaliação da viabilidade de (A) <i>B. subtilis</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>M. luteus</i> , (D) <i>S. setubal</i> , (E) <i>S. aureus</i> e (F) <i>S. epidermidis</i> em diferentes concentrações através do ensaio Alamar Blue®, possibilitando visualizar as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas.	36
Figura 6. Avaliação da viabilidade de (A) <i>B. cereus</i> , (B) <i>E. coli</i> , (C) <i>S. typhi</i> e (D) <i>S. marcescens</i> em diferentes concentrações através do ensaio MTT®, possibilitando visualizar as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas.....	38
Figura 7. Placa com resultado da Concentração Bactericida Mínima (CBM) apresentando resultado para <i>B. subtilis</i> nas concentrações de 40.000, 20.000 e 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (respectivamente BRA1, BRA2 e BRA3) e crescimento bacteriano na concentração de 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BRA 4).	39
Figura 8. Avaliação da viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania infantum chagasi</i> em diferentes concentrações de EB de <i>Diaporthe</i> sp. a através do ensaio Alamar Blue® em (A) 24 e (B) 48 horas.	40
Figura 9. Avaliação da viabilidade de promastigotas de <i>Leishmania infantum chagasi</i> em diferentes concentrações de EB de <i>Pseudofusicoccum</i> sp. através do ensaio Alamar Blue® em (A) 24 e (B) 48 horas.	41
Figura 10. Avaliação da atividade citotóxica do EB de <i>Diaporthe</i> sp. na linhagem celular HFF-1 (Fibroblasto). (A) viabilidade Celular em 24 horas, (B) viabilidade Celular em 48 horas e (C) viabilidade celular em 72 horas.	42
Figura 11. Avaliação da atividade citotóxica do EB de <i>Pseudofusicoccum</i> sp. na linhagem celular HFF-1 (Fibroblasto). (A) viabilidade Celular em 24 horas, (B) viabilidade Celular em 48 horas e (C) viabilidade celular em 72 horas.	43

Lista de tabelas

Tabela 1. Atividade antibacteriana in vitro do EB de <i>Diaporthe</i> sp., onde é possível visualizar a CIM ₅₀ e a CIM ₉₀	34
Tabela 2. Atividade antibacteriana in vitro do EB de <i>Pseudofusicoccum</i> sp., onde é possível visualizar a CIM ₅₀ e a CIM ₉₀	37
Tabela 3. Atividade antibacteriana in vitro do EB de <i>Pseudofusicoccum</i> sp., onde é possível visualizar a CIM ₅₀ e a CIM ₉₀	39

Sumário

Capítulo 1 - Introdução	15
1.1. O manguezal: aspectos gerais	15
1.2. O cerrado: aspectos gerais	17
1.3. Microrganismos endofíticos	18
1.3.1 Fungos endofíticos	19
1.4. Microrganismos potencialmente patogênicos.....	20
1.5. Substâncias antimicrobianas	22
1.6. Substâncias leishmanicidas	24
1.7. Toxicidade celular.....	25
1.8. Objetivos	26
1.8.1. Geral	26
1.8.2. Específicos	26
Capítulo 2 - Material e métodos	28
2.1. Obtenção de extratos brutos dos cultivos fúngicos.....	28
2.2. Determinação da atividade antimicrobiana.....	28
2.2.1. Microrganismos.....	28
2.2.2. Padronização dos inóculos bacterianos	29
2.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	29
2.2.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima	30
2.3. Atividade leishmanicida	30
2.5. Ensaio de citotoxicidade	31
2.6. Análise estatística.....	32
Capítulo 3 - Resultados e Discussão.....	33
3.1. Resultados dos ensaios antimicrobianos	33
3.1.1. <i>Diaporthe</i> sp.	33
3.1.2. <i>Pseudofusicoccum</i> sp.....	35
3.2. Resultados dos ensaios leishmanicidas.....	40
3.3. Resultados dos ensaios de citotoxicidade.....	41
3.2. Discussão.....	44
Capítulo 4 - Conclusões	48
Referências bibliográficas	49

Capítulo 1 - Introdução

1.1. O manguezal: aspectos gerais

O manguezal é definido como um ecossistema costeiro, de interação entre os ambientes terrestre e marinho, próprio de regiões tropicais e subtropicais. Os manguezais brasileiros possuem uma extensão de cerca de 12.254,44 km², do Oiapoque, no Amapá, até a Laguna em Santa Catarina (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2020). Na Figura 1 é possível observar sua extensão no Brasil.

As florestas de mangue estão entre as mais diversas florestas do mundo; e os três países que possuem a maior abundância de manguezais são o Brasil, a Austrália e a Indonésia (KOVACS et al., 2008; LI et al., 2009; NAGELKERKEN et al., 2008; SEBASTIANES et al., 2012). As condições extremas dos mangues, como marés, inundações, alta salinidade, ventos fortes, alta temperatura e solo anaeróbico faz com que sua flora se adapte de forma fisiológica e morfológica (DE SOUZA SEBASTIANES et al., 2013; SAHOO; DHAL, 2009; SEBASTIANES et al., 2012). A Figura 2 retrata uma vegetação característica de manguezal.

Os microrganismos são responsáveis pela maioria das transformações da vegetação morta em nutrientes para as plantas, de forma cíclica, onde fungos e bactérias compreendem 91% da população microbiana total e os outros 9% são algas e protozoários (KRISTENSEN et al., 2008). Um significativo potencial biotecnológico relacionado à flora dos mangues está na associação mutualística com os fungos endofíticos (ALY et al., 2010; HUNDLEY, 2016; SEBASTIANES et al., 2012; PETRINI, 1991), porém, o conhecimento sobre a diversidade dos microrganismos nos manguezais ainda é limitada (CUZZUOL; CAMPOS ROCHA, 2012; REEF; FELLER; LOVELOCK, 2010), o que reforça o investimento em pesquisas sobre a massa microbiana desse ambiente (DE SOUZA SEBASTIANES et al., 2013; MOREIRA, 2016; SEBASTIANES et al., 2012).

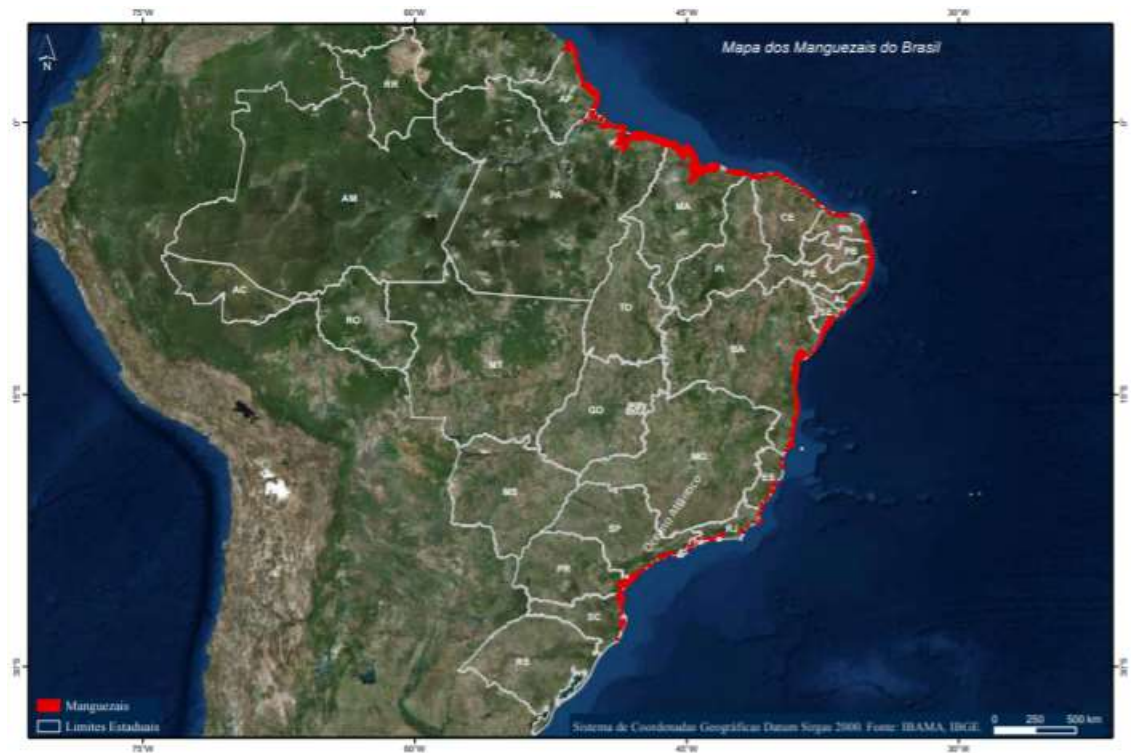


Figura 1. Distribuição dos manguezais do Brasil. Fonte: Atlas dos Manguezais do Brasil.



Figura 2. Vegetação de manguezal. Fonte: Atlas dos Manguezais do Brasil.

1.2. O cerrado: aspectos gerais

O cerrado ocupa uma área de aproximadamente 22% do território nacional, com uma área de 2.036.448 km², sendo o segundo maior bioma da América do Sul. Sua extensão compreende os estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo, Rondônia, Tocantins e também Distrito Federal. Possui encaves no Amapá, Amazônia e Roraima (Figura 3). As três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Amazônica/Tocantins, Prata e São Francisco) encontram-se nesta extensão territorial, resultando numa alta potencialidade aquífera, contribuindo com sua diversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2020).

Esse bioma é caracterizado por grande abundância de espécies endêmicas e é reconhecido como a savana mais rica do mundo, com 11.627 espécies de plantas catalogadas (EMBRAPA, 2008; FERREIRA; JR; MIZIARA, 2012; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2020). Representa aproximadamente 30% do total de reserva brasileira de biodiversidade (FRANÇOSO et al., 2015) e é também uma área de conservação a nível global (SOUZA; SERRANO; LACAVA, 2017).

O clima no cerrado compreende um período chuvoso que dura de outubro a março seguido por um período seco de abril a setembro (KLINK; MACHADO, 2005; LOPES, 2008). A diversidade da flora ocorre em função das adaptações em decorrência dos incêndios naturais que ocorrem eventualmente nesta região (PAUSAS; KM, 2017; PINHEIRO; DURIGAN, 2012) e do pH baixo do solo, por ser rico em alumínio (KLINK; MACHADO, 2005). O cerrado abriga, além de uma variada flora, um número significativo de microrganismos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, este último em menor número (CARRANZA et al., 2020), sendo assim, um bioma expressivo para pesquisa de microrganismos endofíticos.

A variedade de fatores ambientais aos quais a vegetação desta região está submetida favorece o potencial de síntese de novos compostos pelas plantas e também pelos endófitos isolados das mesmas, devido a estes aspectos, o cerrado caracteriza-se como excelente bioma para pesquisa de bactérias e fungos associados a plantas (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; RANGEL; BINI, 2007; SERRANO, 2014).

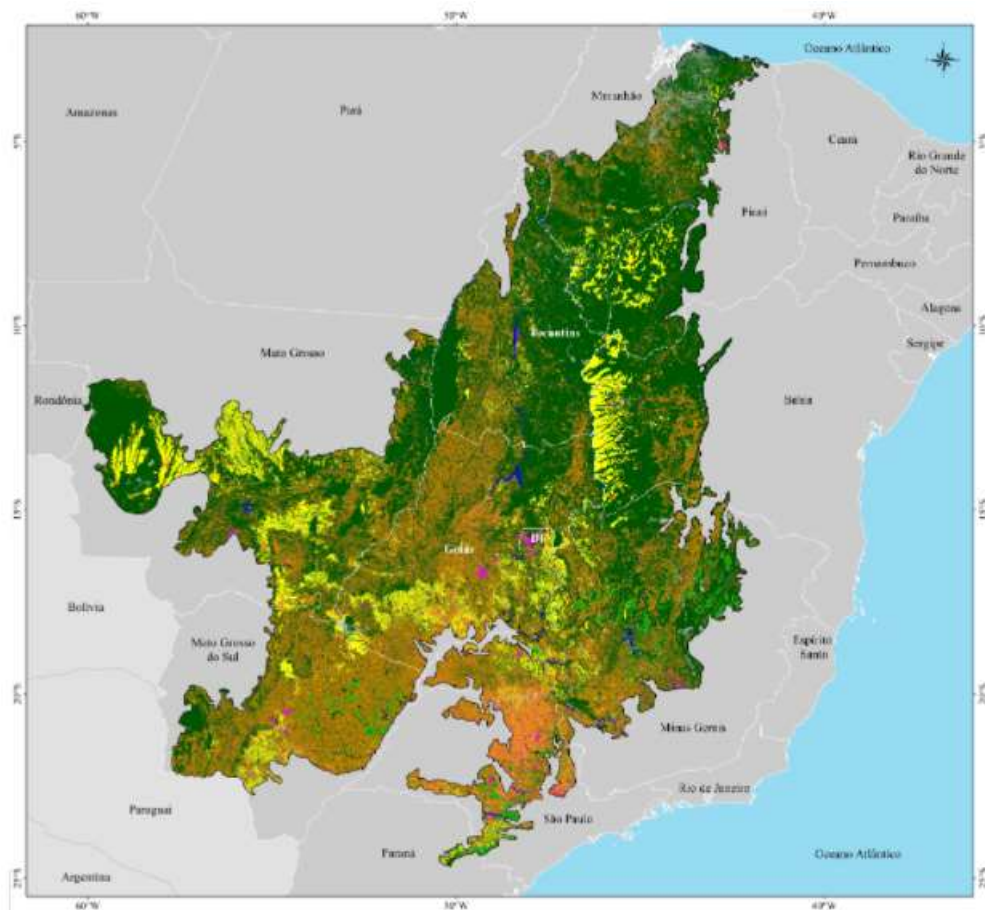


Figura 3. Distribuição do Cerrado no Brasil. Fonte: INPE.

1.3. Microrganismos endófitos

Segundo a etimologia, o termo endófito deriva do Grego, *'éndon'* que significa dentro e *'phytón'*, planta. Os endófitos, descobertos há mais de 100 anos (JALGAONWALA R.E; MOHITE, B.V; MAHAJAN, 2011), são microrganismos que colonizam o interior dos tecidos de plantas onde se relacionam de forma simbiótica (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) e podem produzir substâncias que aumentam a capacidade de defesa, para eles e para o hospedeiro (SILVA, 2017). Eles podem ser isolados das sementes, folhas, flores, frutos, raiz e caule (SANTOS, 2016).

Pesquisas afirmam a importância de estudar os endófitos e demonstram que substâncias isoladas desses microrganismos podem apresentar potencial ação

antimicrobiana, antiparasitária, controle de pragas, anti-inflamatória, antidiabética, produção de enzimas, entre muitas outras (ASSIS, 2018; CARVALHO et al., 2012; CAVICCHIOLI, 2017; LACAVALA; AZEVEDO, 2013; LACAVALA; AZEVEDO, 2014; MARTÍNEZ-LUIS, 2012; MOREIRA, 2016; POLONIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018; SEBASTIANES et al., 2012; SINGH; BARRETT, 2006; TAN; ZOU, 2010; UZOR; OSADEBE; NWODO, 2017; TORRES, 2018). Outro fator que incentiva o estudo dos microrganismos endofíticos é que eles são uma alternativa à exploração vegetal, especialmente as de crescimento lento, ajudando a preservar a diversidade da flora, cada vez mais escassa e também reduzir os custos das alternativas já existentes (LACAVALA et al., 2009; SEBASTIANES et al., 2012; STROBEL; DAISY, 2003; ZHENG et al., 2016).

1.3.1 Fungos endofíticos

O clássico exemplo da descoberta do paclitaxel (taxol) como produto natural derivado do endofítico *Taxomyces andreanae* em 1993, foi o ponto alto do reconhecimento dos fungos endofíticos como uma importante fonte de produção de substâncias bioativas (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Após essa descoberta, muitos outros fungos endofíticos, isolados de diferentes espécies vegetais, foram identificados como sintetizadores de taxol, comprovando que a produção deste importante composto se tornou muito maior em fungos do que em plantas (ALY et al., 2010).

Do litoral do estado de São Paulo, foram isolados 4.300 fungos endofíticos e 344 foram identificados por Sebastianes et al. (2013). Destes foram distinguidos 35 gêneros diferentes sendo que os mais frequentes foram *Diaphorte*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Xylaria* e *Colletotrichum*. Uma substância antibiótica, o ácido 3-hidroxipropiônico, produzida pelo fungo *Diaphorte phaseolorum*, foi identificada como sendo o primeiro relato como antimicrobiano (SEBASTIANES et al., 2012), um grande avanço para o uso desses compostos (SEBASTIANES et al., 2017)

Da reserva do cerrado da UFSCar, entre fragmentos de folhas e ramos de *Solanum lycocarpum* (popularmente chamada de lobeira) foram isolados 45 fungos

endofíticos e, desses, 22 foram identificados por Torres (2018), onde os mais frequentes foram *Nigrospora* sp e *Pseudofusicoccum* sp. e a maioria dos isolados apresentou alguma atividade antagonica em relação à fitopatógenos, produção de enzimas e solubilização de fosfato (BOGAS et al., 2020).

Conforme descrito acima, os fungos endofíticos podem produzir uma infinidade de compostos e a produção destas substâncias com potencial medicinal, tem despertado o interesse pelo estudo e descoberta de novos endófitos e seus metabólitos (GUO et al., 2008; MAHESHWARI; AERON; SARAF, 2013; PIMENTEL et al., 2010). Por essa razão, fazer a bioprospecção desses compostos a partir desses endófitos é de grande importância para a descoberta de novas moléculas, as quais poderão contribuir para o tratamento de muitas doenças e para o controle de pragas na agricultura como avanço biotecnológico desse século (ASSIS, 2018; AZEVEDO, 2014; CAVICCHIOLI, 2017; FERRAZ, 2016; LACAVAL et al., 2009; LACAVAL; AZEVEDO, 2014; MOREIRA, 2016; SEBASTIANES et al., 2012; SEBASTIANES; AZEVEDO, LACAVAL, 2017; RIBEIRO et al., 2018).

1.4. Microrganismos potencialmente patogênicos

Bacillus cereus é uma bactéria Gram-positiva e em formato de bacilo que vive no solo (RYAN & RAY, 2004). Algumas cepas não apresentam toxicidade e outras são patogênicas, podendo causar desde síndrome diarreica e emética até infecções oportunistas (EHLING-SCHULZ; FRICKER; SCHERER, 2004; SCHOENI & WONG, 2005; STENFORS ARNESEN; FAGERLUND; GRANUM, 2008). A diarreia está associada a enterotoxinas presentes em alimentos contaminados e a emese ocorre em função de uma toxina chamada cereulida (PRÜSS et al., 1999; EHLING-SCHULZ et al., 2005; STARK et al., 2013; JERBERGER et al., 2005). Em alguns casos, essas síndromes se agravam e os infectados necessitam de internação e, eventualmente, podem ir a óbito (EHLING-SCHULZ & MESSELHÄUSSER, 2012; MESSELHÄUSSER et al., 2014). Isso ocorre porque a toxina cereulida pode causar insuficiência hepática aguda e encefalopatia aguda (DIERICK et al., 2005). As infecções oportunistas que normalmente ocorrem em hospitais podem ser locais ou sistêmicas, onde neonatos e indivíduos imunossuprimidos são a população mais suscetível, podendo

apresentar endocardite, infecção no aparelho respiratório, urinário, entre outros, e sepse (BOTTONNE, 2010; LOTTE et al., 2017; EHLING-SCHULZ; LERECLUS; KOEHLER, 2019). *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva em forma de bacilo e produtora de esporos. Não é considerada uma bactéria patogênica (SOUZA, 2014).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo que vive no trato gastrointestinal inferior compondo a microbiota do ser humano, sendo assim, a grande maioria das cepas de *E. coli* são inofensivas. É através da perda ou aquisição de características associadas à virulência que se diferenciam as cepas patogênicas das não patogênicas. As que são patogênicas podem causar infecções intestinais e extra intestinais, como no trato urinário, sepse, entre outras (FOXMAN & BROWN, 2003). Essas infecções podem acontecer tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade (YAMAMOTO et al., 1997; FOXMAN & BROWN, 2003; RUSSO & JOHNSON, 2003). As cepas causadoras de infecções podem ser resistentes a várias classes de antibióticos.

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva em forma de bacilo que vive em diversos ambientes, suportando condições de sobrevivência com baixas temperaturas, baixo pH e altas concentrações de sal, sendo encontrada também em alimentos industrializados, fonte comum de contaminação de seres humanos (DE LAS HERAS et al., 2011; GANDHI & CHIKINDAS, 2007; TASARA & STHEPAN, 2006). Acomete principalmente gestantes, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos podendo causar complicações para o feto e até aborto, meningite e infecção generalizada. A mortalidade é em torno de 25% dos infectados desse grupo e são resistentes a algumas classes de antibióticos (RADOSHEVICH & COSSART, 2017; PALMA, 2016; DE NOORDHOUT et al., 2014; MCLAUCHLIN, 1990).

Micrococcus luteus é uma bactéria Gram-positiva presente na microbiota da pele e mucosas. Também está presente em vários outros ambientes como o solo, água e produtos lácteos (Madigan & Martinko, 2005). É considerada um contaminante nosocomial, afetando principalmente indivíduos imunossuprimidos (SENA, 2014).

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo. Pode ser encontrada na cavidade oral, onde causa lesões teciduais de difícil regeneração, pois causa desregulação imunológica e inflamatória. É o agente etiológico de alguns tipos de periodontite (NAITO; HIRAKAWA; YAMASHITA, 2008; LORENZO, 2004).

Salmonella é um gênero de bactérias Gram-negativas em forma de bacilo. É um dos problemas de saúde pública mais alarmantes envolvendo microrganismos e transmissão via alimentos. No período de um ano, a nível mundial, pode ocorrer mais de 150.000 óbitos (WANG, et al 2020).

Serratia marcescens é uma bactéria Gram-negativa em forma de bacilo. Pode causar infecções de urina e hospitalares, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. Um ponto relevante é que ela é resistente a grande parte dos antibióticos conhecidos (KONEMAN et al., 2001).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva em forma de cocos. É um microrganismo que pode estar presente na microbiota da pele de aproximadamente 50% da população. Sendo assim, é considerado um patógeno oportunista, pois pode causar infecções de pele, pneumonias, meningites, endocardites, entre outras doenças, quando ocorre uma baixa do sistema imunológico (RÖHRIG, et al 2020; Tong et al., 2015).

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva em forma de cocos. Pode estar presente na microbiota da pele e pode ser um contaminante nosocomial importante, em função da sua capacidade de produzir biofilmes. Seu tratamento clínico é embasado em conhecimentos com o *S. aureus*, bactéria do mesmo gênero (LEE et al., 2018; ZIEBUHR et al., 2016).

Candida albicans é um fungo leveduriforme que pode causar, de forma oportunista, infecções orais e vaginais. Pacientes imunocomprometidos podem ir a óbito em decorrência de infecções causadas por fungos. A *Candida* pode ser encontrada em 80% da população, como parte da microbiota. As infecções ocasionadas pela *Candida* são chamadas de candidíase (Mayer; Wilson; Hube, 2013; Brown et al., 2012).

1.5. Substâncias antimicrobianas

Os antimicrobianos correspondem a uma classe de fármacos que é consumida frequentemente em hospitais e na população em casos de infecções por microrganismos ou na prevenção dessas infecções em algumas situações específicas, como a pós cirurgia. Portanto, pode ser prescrito de maneira profilática ou terapêutica. Para a escolha do antimicrobiano, é necessário considerar algumas características do paciente, como gravidez e/ou lactação, sensibilidade ao fármaco, terapia prévia com outros antimicrobianos, condição imunológica, hepática e renal, idade, identificar os agentes etiológicos e os possíveis mecanismos de resistência, o

mecanismo de ação do medicamento, toxicidade, interações medicamentosas e custos. Cerca de 50% das prescrições médicas são inadequadas (ANVISA, 2020).

O uso indiscriminado de substâncias antimicrobianas, como por exemplo antifúngicos, antivirais, antiparasitários e antibióticos pode gerar resistência dos microrganismos, o que é um problema de saúde pública tanto de países em desenvolvimento quanto de países desenvolvidos. Embora a resistência ocorra com diversas classes de fármacos, ela é mais comum em antibióticos, uma vez que o uso indiscriminado desse composto é maior. Esse fenômeno ocorre quando as bactérias são expostas a determinado antibiótico e um grupo sobrevive e se multiplica, originando outras também resistentes. Outro mecanismo de ocorrência se dá pela troca de material genético entre microrganismos. Quando um microrganismo é resistente a algumas classes de antimicrobianos, é denominado multirresistente (ANVISA, 2020; OPAS, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de agentes infecciosos prioritários de acordo com a urgência da necessidade de novos antibióticos, distribuídos em três níveis: crítico, alto e médio. No nível crítico estão o *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e Enterobacteriaceae. Fazem parte do nível alto *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Neisseria gonorrhoeae* e no nível médio estão pontuados o *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Shigella* spp. (ANVISA, 2020; OMS, 2017).

Em razão da urgente necessidade de novos antibióticos, torna-se primordial a busca de biocompostos, sendo que os produtos naturais são os recursos mais importantes e mais utilizados (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014; BUATONG et al., 2011; DAS; PATRA; BAEK, 2016; MATSUMOTO; TAKAHASHI, 2017; NEWMAN; CRAGG, 2015). Nesse sentido, os microrganismos podem ser potenciais opções na produção desses biocompostos. A literatura evidencia relatos de microrganismos endofíticos, em especial os fungos endofíticos isolados de vegetações de manguezais e de cerrado como promissores produtores de metabólitos antimicrobianos (ASSIS, 2018; BUATONG et al., 2011; CAVICCHIOLI, 2017; CHAEPRASERT et al., 2010; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2016; CHEN et al., 2019; FERNANDES et al., 2009; LIN et al., 2005; MOREIRA, 2016; SEBASTIANES et al., 2012; TORRES, 2018).

1.6. Substâncias leishmanicidas

As leishmanioses podem ser classificadas em duas vertentes: zoonoses quando infectam animais e antropozoonose ao infectar o homem. Essa doença parasitária possui ampla distribuição territorial, ocorrendo nas Américas, África, Ásia, Europa e Oriente Médio e está classificada pela OMS entre as seis endemias prioritárias no mundo. Na América latina, 90% dos casos ocorrem no Brasil, em especial no Nordeste. O padrão de transmissão da doença é característico de zonas rurais e periurbanas, mas pode ocorrer também em centros urbanos. A leishmaniose visceral (LV) possui alta mortalidade em crianças desnutridas, indivíduos imunossuprimidos e não tratados, onde a letalidade pode atingir até 10% (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2012).

A LV é causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. No Brasil o mais comum é a *Leishmania chagasi*. A principal forma de transmissão se dá pelas fêmeas infectadas de mosquitos conhecidos genericamente por flebotomíneos. O flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora (MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL, 2012).

Até o momento não foram desenvolvidas vacinas eficazes para a doença (SILVA et al., 2013). Os fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses são o Antimoniato de N-metil glucamina, Desoxicolato de anfotericina B e Anfotericina B lipossomal. A dose e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e, muitas vezes, os pacientes evoluem para cura após diversas tentativas de esquemas terapêuticos. O diagnóstico precoce também influencia na possibilidade de cura. Embora os fármacos utilizados tenham eficácia na cura da doença, são tóxicos e podem apresentar reações adversas significativas. Outro fator importante em relação a esses medicamentos é que algumas cepas apresentam resistência a eles. (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; GÓES; JERALDO; OLIVEIRA, 2013; GONTIJO et al., 2012; MACIEL-REZENDE et al., 2013; PELISSARI et al., 2011; ROSENTHAL et al., 2009). Dessa forma, a busca de novos metabólitos que contribuam com o tratamento da LV é de grande importância para a saúde pública.

Alguns estudos demonstraram a detecção de biocompostos, oriundos de fungos endofíticos, que atuam sobre o protozoário causador da leishmaniose,

incentivando a pesquisa inter-relacionada entre esses microrganismos (ASSIS, 2018; CAMPOS et al., 2008; CAVICCHIOLI, 2018; MOREIRA, 2016; SANTIAGO et al., 2012).

1.7. Toxicidade celular

Os testes de toxicidade celular iniciaram - se no início do século XX, a fim de garantir a segurança da população, pois até então ocorriam muitos acidentes toxicológicos, desde efeitos colaterais leves e que não ocasionavam grandes riscos até má formação do feto e óbito do paciente. Para validação e avaliação de fármacos, vacinas e produtos para a saúde em geral, é necessário caracterizar a citotoxicidade *in vitro* (LEMOS, 2018; MASSON; LOMBELLO, 2016; VIEIRA, 2009). Partindo dessa premissa, os ensaios em cultura de células se mostram seguros e eficazes para determinar a citotoxicidade (RATNER, 2004).

Um dos tipos celulares mais comumente utilizados para ensaios da citotoxicidade em culturas de células são os fibroblastos. Esses são células constituintes do tecido conjuntivo que apresentam citoplasma ramificado e rodeado de um núcleo contendo um ou dois nucléolos. Eles estão envolvidos em processos metabólicos e sintetizam colágeno e elastina. São também responsáveis pelo processo de regeneração e essa é uma das razões para eles serem as células comumente utilizadas para ensaios de citotoxicidade. Outras características tais quais: fácil obtenção que se dá por biopsia celular, rápida e contínua proliferação na presença de soro fetal bovino (SFB) e particularidades do seu ciclo celular são outros fatores importantes para a escolha dessas células nesse tipo de ensaio (AMIT et al., 2003; JACOB, 2011; LEMOS, 2018; SOARES, 2017).

1.8. Objetivos

1.8.1. Geral

Avaliar a atividade dos extratos brutos (EB) obtidos dos fungos endofíticos *Diaporthe* sp., isolado do ramo de *Avicennia nitida* (conhecida popularmente mangue branco), do mangue da região de Bertioga e Cananéia, São Paulo, Brasil e *Pseudofusicoccum* sp., isolado do ramo de *Stryphnodendron adstringens* (conhecido popularmente por Barbatimão), da região do cerrado, para ação antimicrobiana, antiparasitária e citotoxicidade. Os dois isolados fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Moléculas e Biomoléculas (LaMiB), Departamento de Morfologia e Patologia (DMP), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

1.8.2. Específicos

- a) Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos brutos obtidos dos isolados *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. contra os microrganismos patogênicos: *Bacillus cereus* ATCC 3508, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 43895, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49471, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Serratia marcescens* ATCC 1953, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228;
- b) Verificar a atividade leishmanicida *in vitro* dos EBs obtidos dos isolados *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. contra *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD);

- c) Avaliar a citotoxicidade dos EBs obtidos dos isolados *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. na linhagem HFF-1 (fibroblastos de pele humana).

Capítulo 2 - Material e métodos

2.1. Obtenção de extratos brutos dos cultivos fúngicos

Para a obtenção dos EBs, foram utilizados os isolados endofíticos do manguê (*Diaporthe* sp.) e do cerrado (*Pseudofusicoccum* sp.), ambos da biblioteca de microrganismos do Laboratório de Biomoléculas e Biologia Molecular (LaMiB), Departamento de Morfologia e Parasitologia (DMP), UFSCar. Os isolados foram cultivados em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (KASVI, BRA) durante 7 dias à temperatura de 28 °C. Posteriormente, 8 discos de 5 mm de micélio dessas culturas foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyers de 500 mL contendo 350 mL de caldo batata dextrose (BD) (KASVI, BRA) e incubados durante 12 dias a 28 °C, na ausência de luz e em condições estáticas.

2.2. Determinação da atividade antimicrobiana

2.2.1. Microrganismos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no LaMiB e no Laboratório de Biotecnologia Microbiana, Universidade de São Paulo (USP), Campus II, São Carlos, SP a fim de abranger um maior número de microrganismos. As cepas patogênicas testadas do LaMiB foram *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Candida albicans* ATCC 10231. As cepas testadas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, cedidas gentilmente pela professora doutora Márcia Nitschke, foram *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Escherichia coli* ATCC 43895, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49471, *Salmonella typhi* ATCC 6539 e *Serratia marcescens* ATCC 1953.

2.2.2. Padronização dos inóculos bacterianos

Para padronizar os inóculos bacterianos, foi utilizado o mesmo protocolo para os ensaios realizados no LaMiB e para os ensaios realizados no Laboratório de Biotecnologia Microbiana. As cepas selecionadas estocadas em freezer a - 20 °C foram transferidas para caldo infusão-cérebro-coração (BHI) (KASVI, BRA) por 24 horas a 37 °C. Posteriormente foram transferidas para Mueller Hinton (MH) (KASVI, BRA) sólido e incubadas por 24 horas a 37 °C. Para a padronização do inóculo bacteriano, foram transferidas colônias da cepa a ser testada para salina 0,9% até atingir 0,5 na escala de Mc Farland, correspondentes a $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL. A densidade ótica (DO) foi obtida em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-22) no comprimento de onda de 620 nanômetros (nm). A partir desta solução, foi realizada uma diluição 1:10 em salina 0,9% para que o inóculo inicial do teste fosse $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Para a padronização do inóculo da levedura, foram transferidas colônias para salina 0,9% até atingir 0,5 na escala de MC Farland. A DO foi obtida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm. A partir dessa solução, foi realizada uma diluição 1:10 em salina e a partir dessa solução, foi realizada mais uma diluição, de 1:20, para que fosse obtida uma suspensão de $2,5 \times 10^3$.

2.2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Com base no CLSI (2012), a metodologia utilizada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em bactérias, foi a microdiluição em caldo em placa de 96 poços (KASVI, BRA). Foi preparada a diluição seriada dos EBs em caldo MH nas concentrações de 10.000, 8.000, 6.000 e 4.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o EB do endofítico *Diaporthe* sp. e 40.000, 20.000, 10.000, 5.000 e 2.5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o EB do endofítico *Pseudofusicoccum* sp.. As concentrações utilizadas foram iguais em um primeiro ensaio. Após análise dos resultados, as concentrações do EB do isolado do cerrado foram aumentadas para observar se haveria maior atividade. Como agente

antimicrobiano de referência foram utilizados os antibióticos Penicilina e Estreptomicina (GIBCO, EUA). Foram adicionados 100 µL de cada componente (inóculo padronizado e EB) na microplaca, obtendo-se um volume final de 200 µL por poço. As microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, foram adicionados 20 µL do revelador Alamar blue® (SIGMA-ALDRICH, EUA) diluído com tampão salino fosfato (PBS) a 0,04% em cada poço. Posteriormente, as placas foram submetidas a leitura de absorbância a 620 nm, no leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®) (CLSI, 2012). A mesma metodologia foi utilizada para determinação da CIM em parceria com o Laboratório de Biotecnologia Microbiana, exceto o revelador, que foi utilizado o (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT) diluído em água destilada na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Para a levedura, o protocolo também é o mesmo, exceto que a adição do agente revelador e a leitura em leitor de microplacas é feito após 48 h de incubação.

2.2.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é a menor concentração que não há crescimento de microrganismo, foi escolhida a linha A da placa dos ensaios da CIM. Foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada poço e plaqueado em ágar MH. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h e observadas visualmente.

2.3. Atividade leishmanicida

Os ensaios leishmanicidas foram realizados no Laboratório de Inflamações e Doenças Infecciosas (LIDI), Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar. As cepas de *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) utilizadas nos ensaios fazem parte da biblioteca de microrganismos do LIDI. A cepa *L. infantum chagasi*,

em sua forma promastigota, foi cultivada em frascos T (KASVI, BRA) de 25 cm² contendo meio 199 (SIGMA-ALDRICH, EUA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (LGC, BRA), antibióticos Penicilina e Estreptomicina (GIBCO, EUA) e L-glutamina (SIGMA-ALDRICH, EUA). Em cada poço da placa de 96 poços, do ensaio continha uma suspensão de células previamente ajustadas à 1×10^6 e o EB do endófito *Diaporthe* sp. foi diluído em quatro concentrações diferentes: $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O EB do endófito *Pseudofusicoccum* sp foi diluído em $40.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As placas de 96 poços, nas quais foram realizados os ensaios, foram incubadas a 23 °C por 24 e 48 horas. Para a avaliação da viabilidade celular foi utilizado o teste colorimétrico do Alamar blue[®] (SIGMA-ALDRICH, EUA). Após cada período de incubação, foram adicionados 20 μL a 1,5 mM de Alamar blue[®] e as placas foram incubadas em câmara de CO₂ entre 5 e 10%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Multiskan FC (Thermo Scientific[®]) no comprimento de onda de 650 nm.

2.5. Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Investigação Endócrino Metabólica (LIEM), Departamento de Medicina, UFSCar. Foram utilizadas células da linhagem HFF-1 (fibroblastos de pele humana), cedidas gentilmente pela professora doutora Ângela Merice de Oliveira Leal. As células foram colocadas em frascos T (GREINER, EUA) de 75 cm² contendo meio DMEM (SIGMA-ALDRICH, EUA), suplementado com SFB (HYCLONE, EUA), antibióticos Penicilina e Estreptomicina (GIBCO, EUA), L-glutamina, HEPES e Bicarbonato (SIGMA-ALDRICH, EUA). Foram semeadas 2×10^5 por poço em placas de 96 (KASVI, BRA), e mantidas em meio de cultivo com o EB do fungo endofítico *Diaporthe* sp. diluído nas concentrações de $20.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $8.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $6.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com o EB do fungo endofítico *Pseudofusicoccum* sp. nas concentrações de $40.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $20.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $5.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2.500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o inóculo, as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO₂, por 24, 48 e 72 horas. Para a

avaliação da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico pelo 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) (SIGMA-ALDRICH, EUA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific®) em comprimento de onda de 570 nm.

2.6. Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Levene e homogeneidade de Shapiro Will. Os testes de ANOVA e teste post hoc de Tukey foram utilizados para indicar as diferenças existentes entre os grupos experimentais. Os valores foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$, utilizando o software GraphPd Prism (Versão 7.04 for Windows). Os gráficos e cálculos da CIM₅₀ e CIM₉₀ (curva de regressão linear) foram construídos com o software Origin Pro versão 9.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1. Resultados dos ensaios antimicrobianos

3.1.1. *Diaporthe* sp.

Para os testes antimicrobianos com o EB do isolado *Diaporthe* sp., foram obtidos os valores da CIM₅₀ e a CIM₉₀ para *E. coli* ATCC 11775, *S. setubal* ATCC 19196 e *S. aureus* ATCC 29213 (Tabela 1). Não foi observada atividade contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Candida albicans* ATCC 10231. A figura 4 ilustra os resultados de cada concentração e suas diferenças estatísticas graficamente. Os resultados detalhados dos ensaios para as quatro concentrações testadas (10.000, 8.000, 6.000 e 4.000 µg.mL⁻¹) foram:

- a) *E. coli* ATCC 11775: inibição de crescimento celular de 93,50% em 10.000 µg.mL⁻¹, 92,02% em 8.000 µg.mL⁻¹, 88,73% em 6.000 µg.mL⁻¹ e 36,45% em 4.000 µg.mL⁻¹;
- b) *S. setubal* ATCC 19196: inibição de crescimento de 93,95% em 10.000 µg.mL⁻¹, 93,53% em 8.000 µg.mL⁻¹, 91,95% em 6.000 µg.mL⁻¹ e 90,47% em 4.000 µg.mL⁻¹;
- c) *S. aureus* ATCC 29213: inibição de crescimento de 94,84% em 10.000 µg.mL⁻¹, 94,69% em 8.000 µg.mL⁻¹, 94,03% em 6.000 µg.mL⁻¹ e 86,63% em 4.000 µg.mL⁻¹.

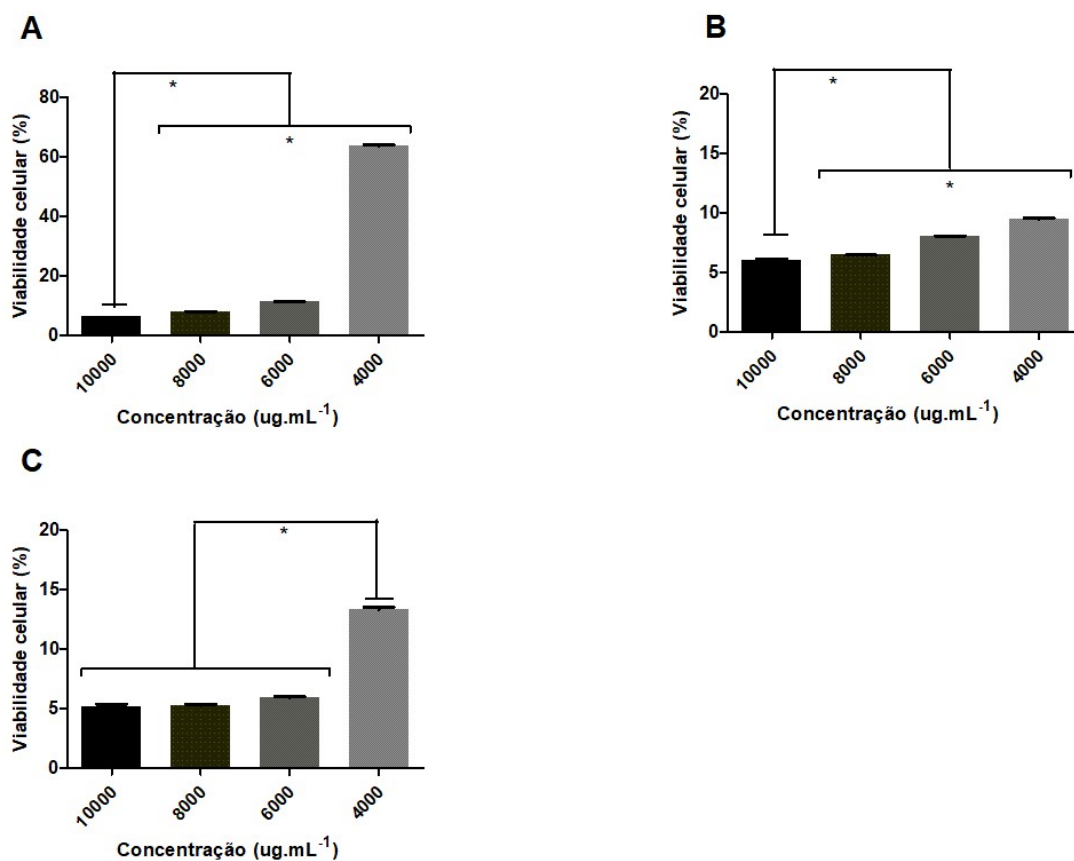


Figura 4. Avaliação da viabilidade de (A) *E. coli*, (B) *S. setubal* e (C) *S. aureus* em diferentes concentrações através do ensaio Alamar Blue®, possibilitando visualizar as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas.

<i>Diaporthe</i> sp.	MIC ₅₀ (μg.mL ⁻¹)	MIC ₉₀ (μg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i>	4.319	6.141
<i>S. setubal</i>	0.156	3.557
<i>S. aureus</i>	1.043	4.614

Tabela 1. Atividade antibacteriana *in vitro* do EB de *Diaporthe* sp., onde é possível visualizar a CIM₅₀ e a CIM₉₀.

3.1.2. *Pseudofusicoccum* sp.

Para os testes antimicrobianos com o EB do isolado *Pseudofusicoccum* sp. no LaMiB, foram obtidos os valores da CIM₅₀ e da CIM₉₀ do *B. subtilis*, *M. luteus* ATCC 4698 e *S. aureus* ATCC 6538 (Tabela 2). Não foi observado atividade contra *S. aureus* ATCC 29213 e *C. albicans* ATCC 10231. A Figura 5 ilustra os resultados de cada concentração e suas diferenças estatísticas graficamente. Os resultados detalhados dos ensaios para as cinco concentrações testadas (40.000, 20.000, 10.000, 5.000 e 2.500 µg.mL⁻¹) foram:

- a) *B. subtilis*: inibição de crescimento celular de 100% nas concentrações de 40.000, 20.000 e 10.000 µg.mL⁻¹ e 20,46% em 5.000 µg.mL⁻¹. Não houve inibição de crescimento celular para a concentração de 2.500 µg.mL⁻¹;
- b) *E. coli* ATCC 25922: inibição de crescimento celular de 39,33% em 40.000 µg.mL⁻¹, 36,08% em 20.000 µg.mL⁻¹, 35,18% em 10.000 µg.mL⁻¹, 19,49% em 5.000 µg.mL⁻¹ e 1,94% em 2.500 µg.mL⁻¹;
- c) *M. luteus* ATCC 9341: inibição de crescimento celular de 74,62% em 40.000 µg.mL⁻¹, 51,89% em 20.000 µg.mL⁻¹, 28% em 10.000 e 5.000 µg.mL⁻¹ e 10,71% em 2.500 µg.mL⁻¹;
- d) *S. setubal* ATCC 19196: inibição de crescimento celular de 73,75% em 40.000 µg.mL⁻¹, 72,96% em 20.000 e 10.000 µg.mL⁻¹, 71,50% em 5.000 µg.mL⁻¹ e 64,54% em 2.500 µg.mL⁻¹;
- e) *S. aureus* ATCC 6538: inibição de crescimento celular de 69,82% em 40.000 µg.mL⁻¹, 66,05% em 20.000 µg.mL⁻¹, 17,79% em 10.000 µg.mL⁻¹, 12,03% em 5.000 µg.mL⁻¹ e 11,38% em 2.500 µg.mL⁻¹;
- f) *S. epidermidis* ATCC 12228: inibição de crescimento celular de 39,22% em 40.000 µg.mL⁻¹. Não houve inibição de crescimento celular para as concentrações de 20.000, 10.000, 5.000 e 2.500 µg.mL⁻¹.

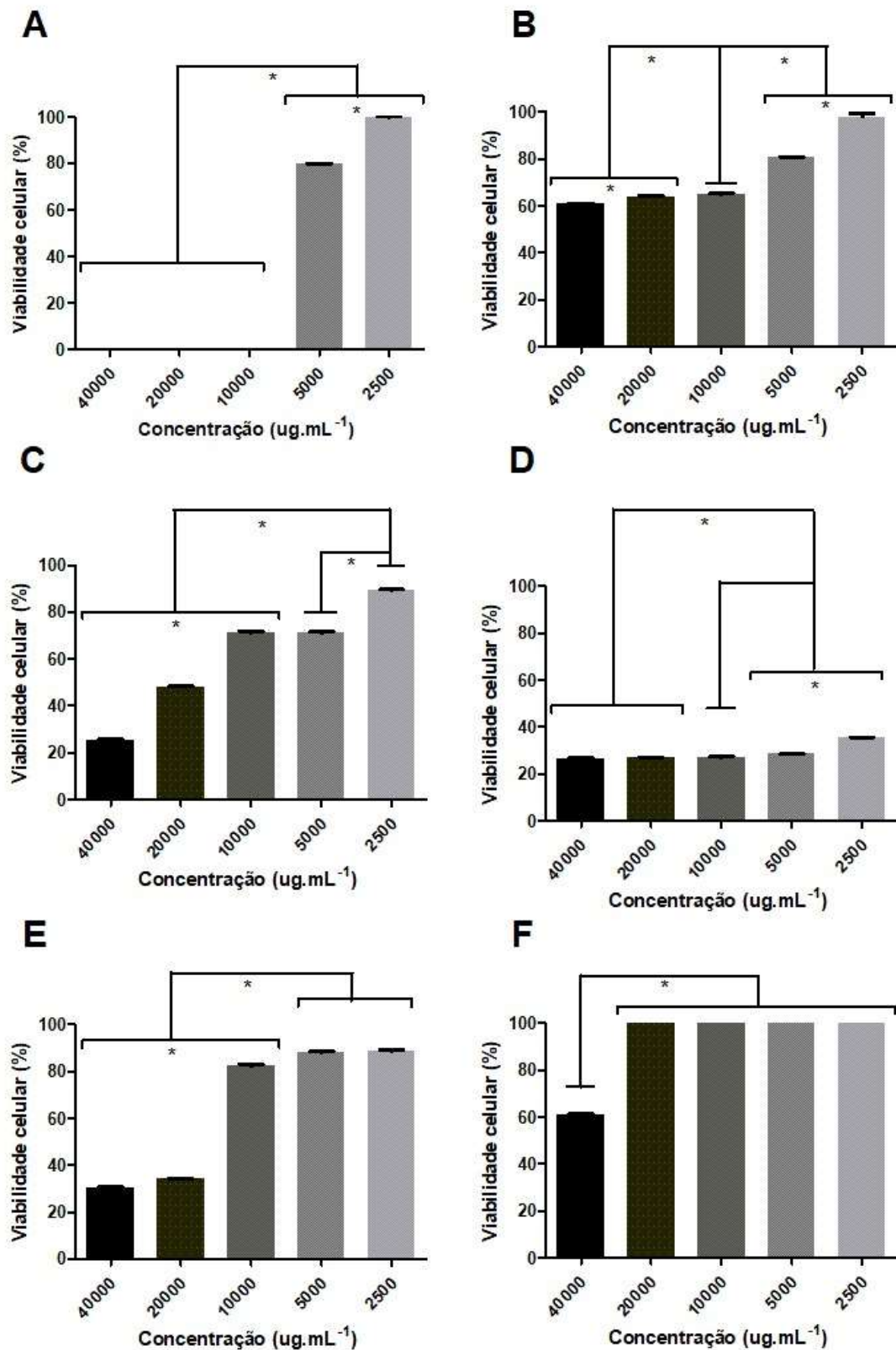


Figura 5. Avaliação da viabilidade de (A) *B. subtilis*, (B) *E. coli*, (C) *M. luteus*, (D) *S. setubal*, (E) *S. aureus* e (F) *S. epidermidis* em diferentes concentrações através do ensaio Alamar Blue®, possibilitando visualizar as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas.

<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	CIM50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CIM90 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>B. subtilis</i>	4.228	19.140
<i>M. luteus</i>	19.190	92.800
<i>S. aureus</i>	16.680	91.520

Tabela 2. Atividade antibacteriana *in vitro* do EB de *Pseudofusicoccum* sp., onde é possível visualizar a CIM₅₀ e a CIM₉₀.

Para os testes antimicrobianos com o EB do isolado *Pseudofusicoccum* sp. no Laboratório de Biotecnologia Microbiana, foram obtidos valores da CIM₅₀ e da CIM₉₀ do *B. cereus* ATCC33018, *E. coli* ATCC 43895, *S. typhi* ATCC 6539 e *S. marcescens* ATCC 1953 (Tabela 3). Não foi observada atividade contra *B. subtilis* ATCC 21332, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *M. luteus* ATCC 4698 e *P. gingivalis* ATCC 49417. A Figura 6 ilustra os resultados de cada concentração e suas diferenças estatísticas graficamente. Os resultados detalhados dos ensaios para as cinco concentrações testadas (40.000, 20.000, 10.000, 5.000 e 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram:

- a) *B. cereus* ATCC 33018: inibição de crescimento celular de 100% em 40.000 e 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 89,43% em 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 88,02% em 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 39,25% em 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- b) *E. coli* ATCC 43895: inibição de crescimento celular de 100% em 40.000 e 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 96,65% em 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 52,99% em 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e não houve inibição de crescimento celular em 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- c) *S. typhi* ATCC 6539: inibição de crescimento celular de 100% em 40.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 92,89% em 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 90,59% em 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 69,35% em 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 58,71% em 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$;
- d) *S. marcescens* ATCC 1953: inibição de crescimento celular de 98,20% em 40.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5,27% em 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4,78% em 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0,58% em 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e não houve inibição de crescimento celular em 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

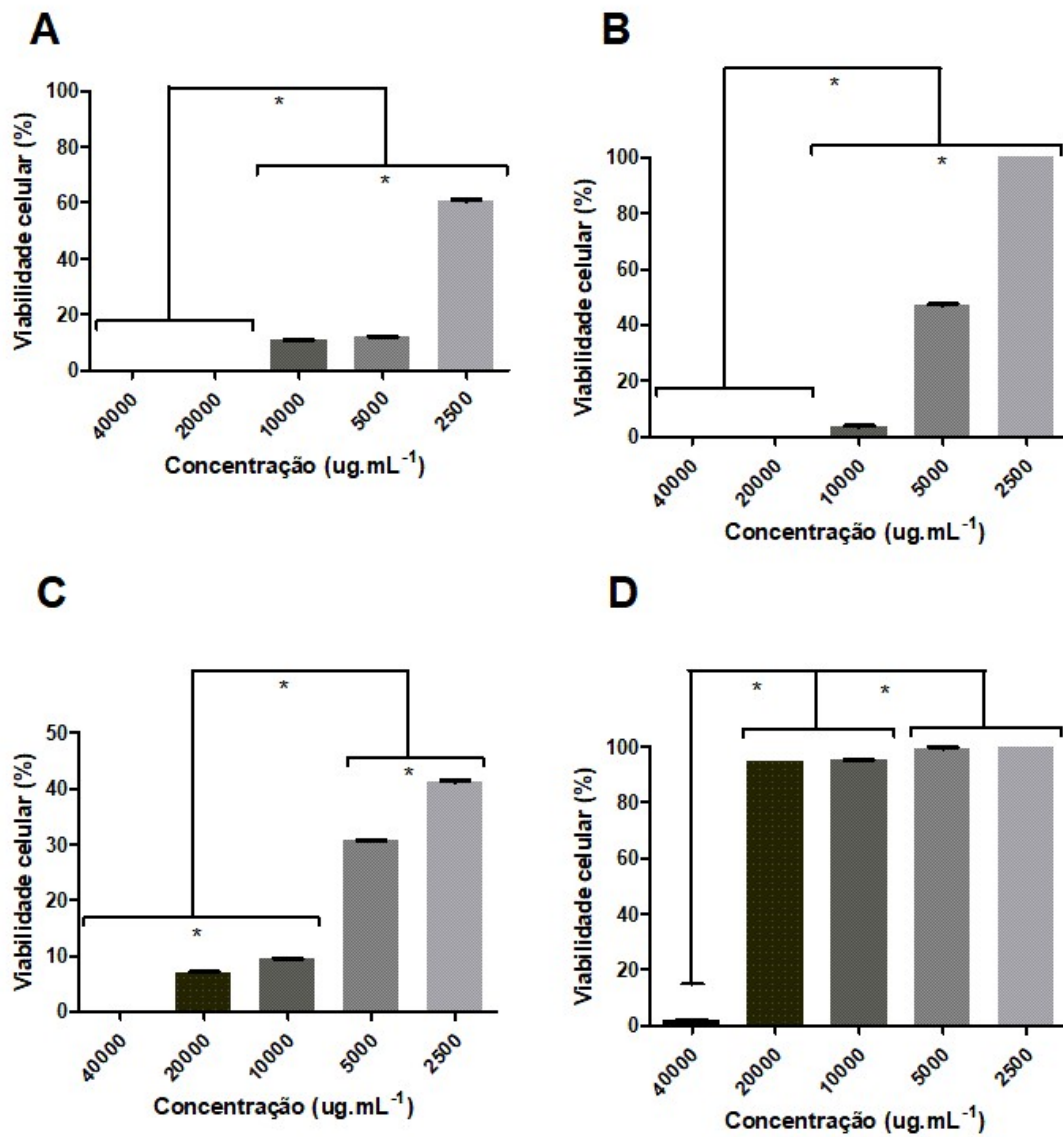


Figura 6. Avaliação da viabilidade de (A) *B. cereus*, (B) *E. coli*, (C) *S. typhi* e (D) *S. marcescens* em diferentes concentrações através do ensaio MTT®, possibilitando visualizar as diferenças estatísticas entre as concentrações testadas.

<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	MIC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>B. cereus</i>	3.052	10.560
<i>E. coli</i>	4.861	9.240
<i>S. typhi</i>	1.390	9.870
<i>S. marcescens</i>	29.630	38.250

Tabela 3. Atividade antibacteriana *in vitro* do EB de *Pseudofusicoccum* sp., onde é possível visualizar a CIM₅₀ e a CIM₉₀.

Para os testes da CBM, foi observado resultado do EB do isolado do cerrado (*Pseudofusicoccum* sp.) para o *B. subtilis* a partir da concentração de $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, como é possível observar na Figura 7.

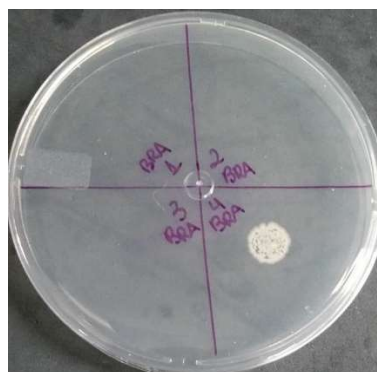


Figura 7. Placa com resultado da Concentração Bactericida Mínima apresentando resultado para *B. subtilis* nas concentrações de 40.000 , 20.000 e $10.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (respectivamente BRA1, BRA2 e BRA3) e crescimento bacteriano na concentração de $5.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (BRA 4).

3.2. Resultados dos ensaios leishmanicidas

O EB de *Diaporthe* sp. foi testado para atividade leishmanicida na forma promastigota de *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) nos períodos de 24 e 48 h nas concentrações de 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 8.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 6.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os períodos de 24 e 48 horas apresentaram uma alta taxa de mortalidade, acima de 90% nas concentrações entre 6.000 e 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e acima de 80% na concentração de 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 8).

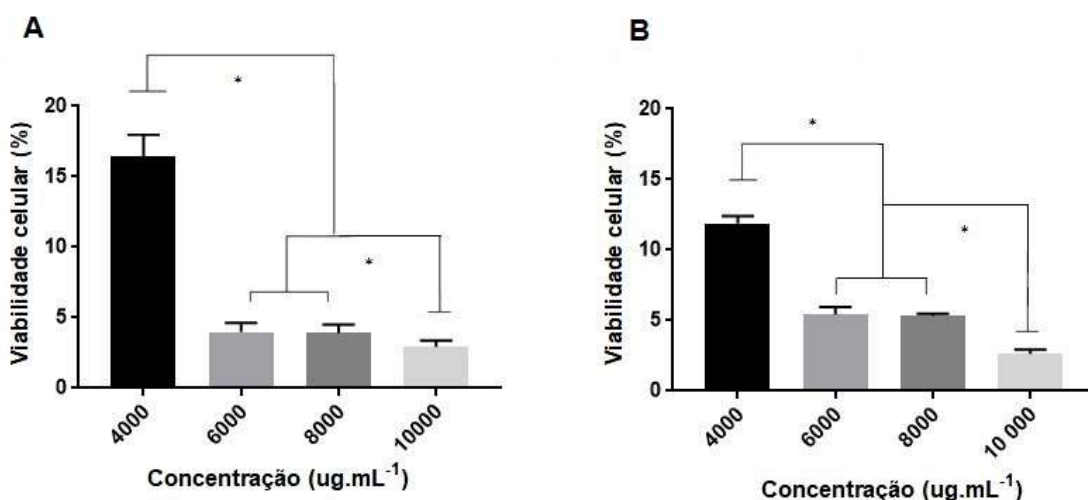


Figura 8. Avaliação da viabilidade de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* em diferentes concentrações de EB de *Diaporthe* sp. a através do ensaio Alamar Blue® em (A) 24 e (B) 48 horas.

O EB de *Pseudofusicoccum* sp. foi testado para atividade leishmanicida na forma promastigota de *L. infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) nos períodos de 24 e 48 h nas concentrações de 40.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2.500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os períodos de 24 e 48 horas apresentaram uma baixa taxa de viabilidade celular, abaixo de 10%, nas concentrações entre 40.000 e 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ou seja, nessas concentrações a mortalidade foi superior aos 90% (Figura 9).

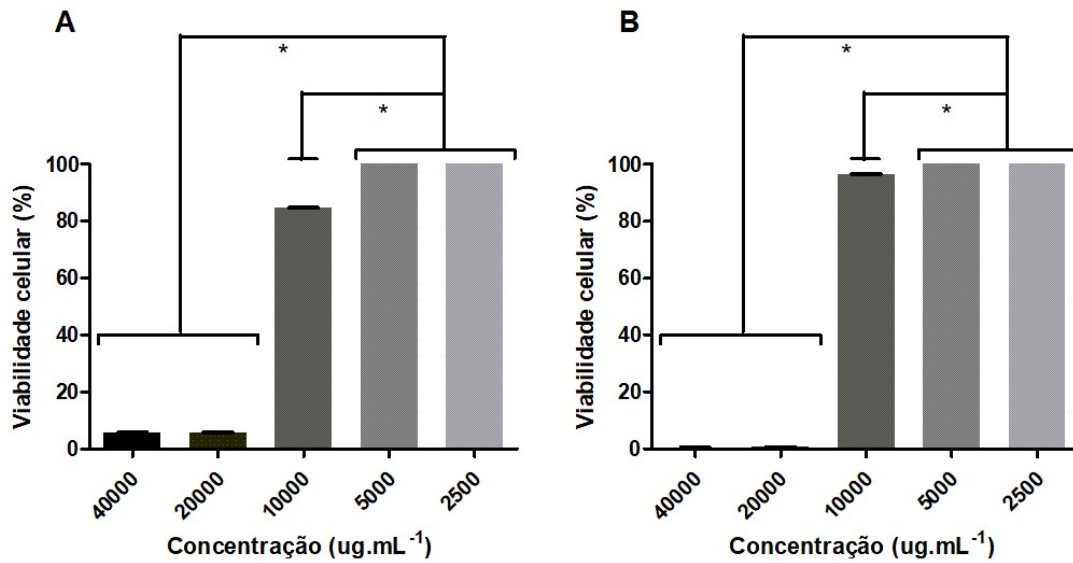


Figura 9. Avaliação da viabilidade de promastigotas de *Leishmania infantum chagasi* em diferentes concentrações de EB de *Pseudofusicoccum* sp. através do ensaio Alamar Blue® em (A) 24 e (B) 48 horas.

3.3. Resultados dos ensaios de citotoxicidade

Os ensaios para citotoxicidade do EB de *Diaporthe* sp. apresentaram viabilidade celular entre 73 e 55% nas concentrações de 4.000 a 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 horas; 69 e 56% nas concentrações de 4.000 a 8.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 horas e 59% nas concentrações de 4.000 a 6.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 horas (Figura 10).

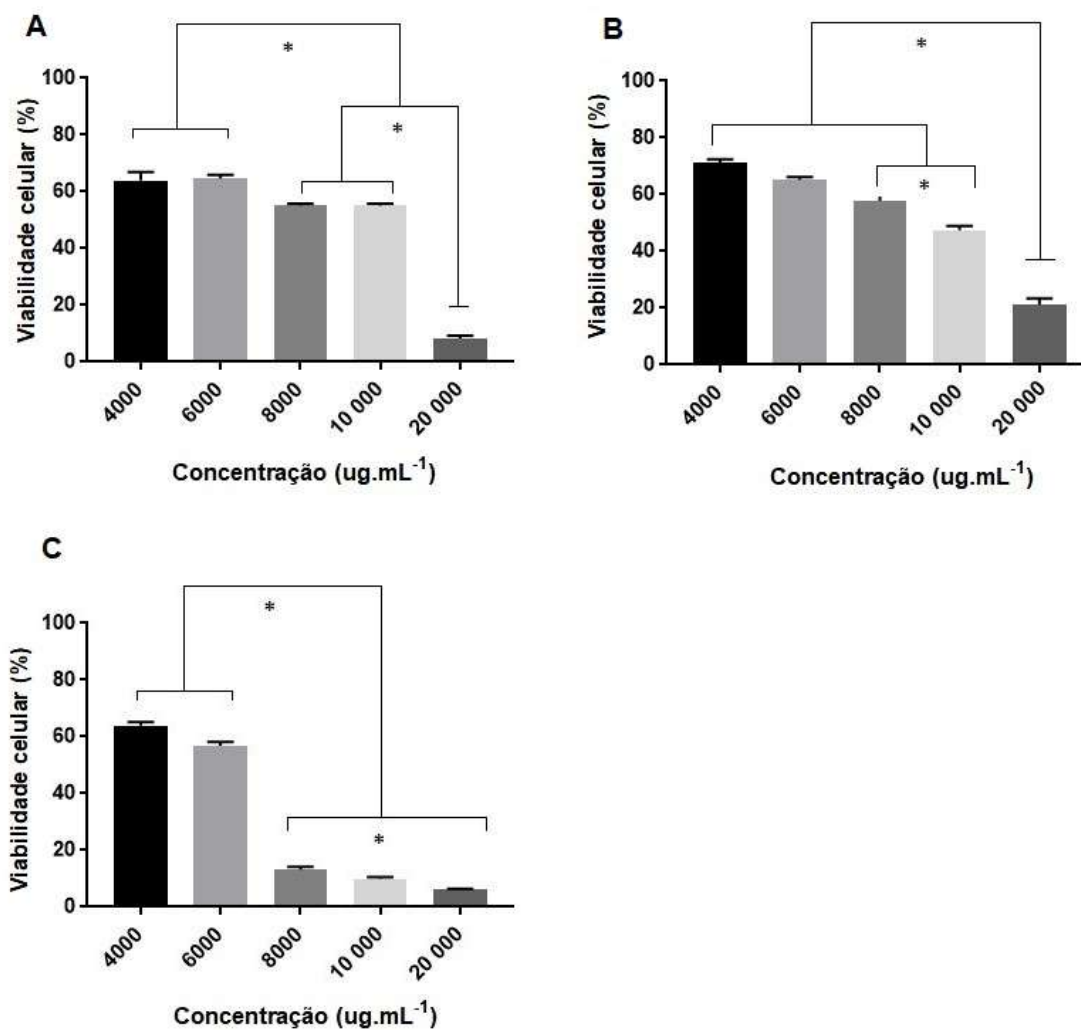


Figura 10. Avaliação da atividade citotóxica do EB de *Diaporthe* sp. na linhagem celular HFF-1 (Fibroblasto). (A) viabilidade Celular em 24 horas, (B) viabilidade Celular em 48 horas e (C) viabilidade celular em 72 horas.

Os ensaios para citotoxicidade de *Pseudofusicoccum* sp. apresentaram viabilidade celular entre 11,63 e 9,73% nas concentrações de 40.000 e 20.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 horas; 16,86 a 13,68% nas concentrações de 40.000 a 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 horas e 8,11 a 5,41% nas concentrações de 40.000 a 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 horas (Figura 11).

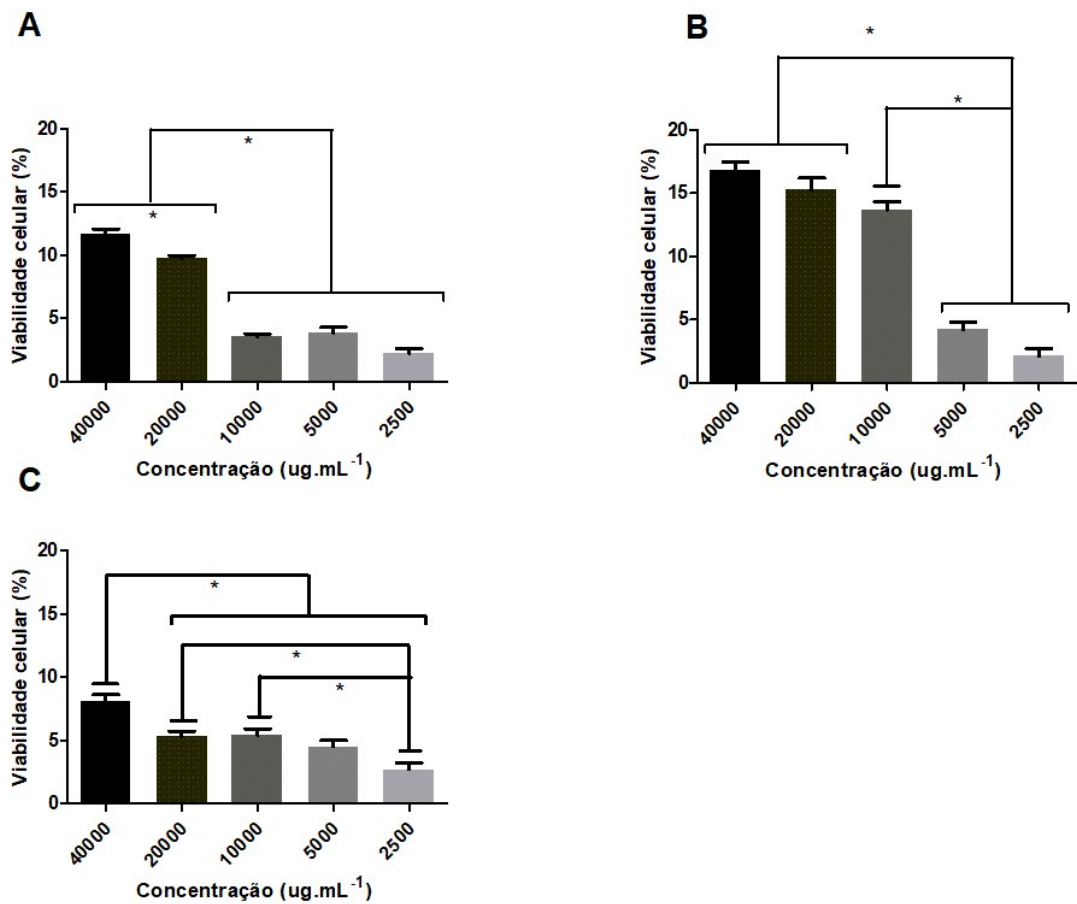


Figura 11. Avaliação da atividade citotóxica do EB de *Pseudofusicoccum* sp. na linhagem celular HFF-1 (Fibroblasto). (A) viabilidade Celular em 24 horas, (B) viabilidade Celular em 48 horas e (C) viabilidade celular em 72 horas.

3.2. Discussão

A necessidade de novas moléculas potenciais para a descoberta e produção de fármacos, em especial aqueles que combatem microrganismos causadores de infecções hospitalares e aqueles que fazem parte do grupo de doenças que são classificadas como negligenciadas, nunca se mostrou tão importante e urgente. Alguns desses microrganismos são colocados como prioritários em pesquisas por sua capacidade de resistência e letalidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; OMS, 2017).

É sabido que a maior fonte de biomoléculas são os produtos naturais e há algumas décadas os microrganismos endofíticos têm sido explorados e descritos como grandes produtores de metabólitos bioativos (ALY et al., 2010; CAMPOS et al., 2008; SEBASTIANES et al., 2012; SILVA et al., 2018; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993; ASSIS, 2018; CAVICCHIOLI, 2017, TORRES, 2018; PRINCE, 2008).

Os microrganismos endofíticos isolados de ambientes caracterizados por condições extremas de sobrevivência tem se destacado na produção de compostos com bioatividades em ensaios de bioprospecção (SEBASTIANES et al., 2012; ASSIS, 2016; CAVICCHIOLI, 2017; MOREIRA, 2016; TORRES, 2018).

O gênero *Diaporthe* sp. tem sido descrito como importante produtor de metabólitos secundários, expressando atividades antimicrobianas, antifitopatogênicos leishmanicidas, antiproliferativas e na produção de enzimas (SEBASTIANES et al., 2012; GOMES, 2012; MOREIRA, 2016, RABAL, 2016, SOUZA, 2019).

O gênero *Pseudofusicoccum* sp. também foi descrito como produtor de compostos antimicrobianos, antifitopatogênicos, antiproliferativos e enzimáticos (GUBIANI, 2015; TORRES, 2018; MONFARDINI, 2020).

As referências acima corroboram com o presente trabalho, onde foram testados extratos de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* sp. e *Pseudofusicoccum* sp. e obtidos resultados antimicrobianos de diferentes cepas, leishmanicidas. Outro resultado interessante nesse trabalho é que o gênero *Diaporthe* sp. apresentou baixa toxicidade quando testado em fibroblastos.

Huang e colaboradores (2019) testaram extrato purificado do endofítico *Diaporthe* sp. isolado de *Sophora tonkinensis* em cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthraci*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Salmonella paratyphi* e obtiveram CIM₅₀ de 12,5 µg/mL⁻¹ para *E. coli* e *Bacillus anthraci*. O presente trabalho apresentou CIM₅₀ de 767 µg/mL⁻¹ para a *E. coli*, porém o extrato testado não era purificado. Possivelmente nosso extrato continha um número maior de resíduos e, conseqüentemente, foi necessária uma concentração maior do extrato para atingir a letalidade de 50%. Por essa razão, os dados obtidos podem ser considerados complementares. Um diferencial entre os dois estudos é que o presente trabalho apresentou atividade antimicrobiana, com MIC₅₀ de 949 µg/mL⁻¹ para a bactéria do gênero *Salmonella* enquanto o outro extrato não apresentou nenhuma atividade para essa bactéria.

Medeiros e colaboradores (2019) também testaram o extrato fracionado do endofítico *Diaporthe* e obtiveram como resultado MIC₅₀ de 125 µg/mL⁻¹ para *S. aureus* e 500 µg/mL⁻¹ para *E. coli*. Esse dado consolida os resultados do presente trabalho, onde possivelmente em ensaios com o extrato fracionado os valores de MIC₅₀ seriam menores, pois os metabólitos estariam mais concentrados.

Brissow e colaboradores (2017) testaram extrato particionado obtido do endofítico *Diaporthe* e obtiveram uma taxa de morte celular de 78,39% em *L. amazonensis* numa concentração de 10 µg/mL⁻¹, enquanto o presente trabalho apresentou mortalidade acima de 90% para *L. infantum chagasi* na concentração de 4.000 µg/mL⁻¹, é possível inferir, mais uma vez, que o extrato particionado possui menos resíduos, portanto, as moléculas ativas estão mais concentradas. Não foram encontrados trabalhos que relacionam o fungo *Diaporthe* sp. à atividade leishmanicida de *L. infantum chagasi*.

Em ensaios qualitativos, Abba e colaboradores (2018) isolaram o endofítico *Pseudofusicoccum* sp. de *Annona muricata* (popularmente conhecida como Graviola) e testaram seus extratos em ensaios qualitativos contra alguns microrganismos, obtendo como resultado, leve atividade para *B. subtilis*, *S. Typhi* e *C. albicans* e nenhuma atividade para *S. aureus* e *A. niger*. O presente trabalho, com o EB produzido pelo *Pseudofusicoccum* sp. apresentou atividade para *B. subtilis*, *S. typhi* e *S. aureus*.

Em revisão literária, um dado interessante de alguns trabalhos, é que bactérias endofíticas isoladas de vegetações do cerrado, não apresentaram atividade para a *E. coli*, uma bactéria Gram negativa. Azevedo et al (2004) isolaram *Actinoplanes* do cerrado goiano e, em ensaio para a determinação da atividade antimicrobiana, observaram que seus metabólitos apresentaram atividade apenas para bactérias Gram positivas.

Carrim et al (2016) isolaram bactérias endofíticas de *Jacaranda decurrens* (popularmente conhecido como carobinha do campo) e observaram uma atividade maior frente a microrganismos Gram positivos.

Assis (2018) isolou seis bactérias de *Caryocar brasiliense* (popularmente conhecido como pequiheiro), nativa do Cerrado de São Carlos e testou os EBs contra *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus* e como resultado, 1 deles apresentou atividade contra *C. albicans*, 5 deles apresentaram atividade contra *S. aureus* e nenhum apresentou atividade contra *E. coli*, bactéria Gram negativa. Piza et al. (2015) também teve como resultado da determinação antimicrobiana de seu composto obtido de bactérias endofíticas de solo e vegetação do cerrado, respectivamente, nenhuma inibição para a *E. coli*.

Pesquisas com fungos endofíticos do cerrado não apresentam esse perfil, onde são encontradas atividades contra microrganismos Gram negativos e Gram positivos (SOUZA, 2004; SADANANDA, 2011) incluindo a *E. coli*, dado que o presente trabalho reforça.

Amorim (2018), isolou fungos endofíticos do pantanal de Mato Grosso, Brasil e entre esses isolados, foi também identificado o *Pseudofusicoccum* sp. Os ensaios antiparasitários com os extratos não apresentaram resultados significativos contra *L. amazonensis*. Em contra partida, o presente trabalho obteve resultados relevantes com o EB do isolado desse gênero, considerando ainda que os testes foram realizados com o extrato não particionado e não purificado, onde existe a possibilidade de melhorar o seu desempenho.

Não foram encontradas pesquisas que relacionam o *Pseudofusicoccum* sp. à *L. infantum chagasi*, demonstrando a importância e o ineditismo deste trabalho.

Simultaneamente às pesquisas de determinações das atividades dos metabólitos dos compostos, é necessário realizar ensaios de citotoxicidade, que permita avaliar a segurança das moléculas que compõem o EB (WILSON, 2000).

Neste trabalho, foram realizados ensaios de citotoxicidade com os dois EBs. O EB proveniente do isolado do mangue apresentou alta viabilidade celular em todas as concentrações testadas, se mostrando pouco tóxico. O EB proveniente do isolado do cerrado já se apresentou tóxico, com menos de 20% das células viáveis considerando todas as concentrações e horários dos ensaios (24, 48 e 72 horas). No entanto, de acordo com SMEE et al (2002), pode ser de grande valor realizar testes com outros reagentes colorimétricos que diferem do MTT®, visto que em seu processo de conversão enzimática, por interferência do próprio EB, ele possa superestimar a toxicidade. Também deve ser considerado a análise visual no decorrer do experimento, observando a coerência dos resultados obtidos após a adição do reagente colorimétrico MTT®. Na análise visual foi observada perda da morfologia celular, porém, não em 80% das células dispostas nos poços.

Os resultados deste trabalho reforçam o potencial de moléculas bioativas presentes em isolados endofíticos de vegetação de ecossistemas que apresentam condições extremas de sobrevivência.

Capítulo 4 - Conclusões

- a) O EB do isolado *Diaporthe* sp. apresentou atividade contra três microrganismos, sendo eles *E coli* ATCC 11775, *S. setubal* ATCC 19169 e *S. aureus* ATCC 29213;
- b) O EB do isolado *Pseudofusicoccum* sp. apresentou atividade contra 10 microrganismos, sendo eles: *B. subtilis*, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus* ATCC 9341, *S. setubal* ATCC 19196, *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 12228, *B. cereus* ATCC 33018, *E. coli* ATCC 43895, *S. typhi* ATCC 6539 e *S. marcescens* ATCC 1953;
- c) O EB do isolado *Pseudofusicoccum* sp. apresentou CBM para *B. subtilis* na concentração de 10.000 µg.mL⁻¹.
- d) O EB do isolado *Diaporthe* sp. apresentou atividade para *L. infantum chagasi* em concentrações menores que o EB do isolado *Pseudofusicoccum* sp;
- e) O EB do isolado *Diaporthe* sp. apresentou menor citotoxicidade em relação ao EB do isolado *Pseudofusicoccum* sp.

Levando em consideração os resultados dos ensaios farmacológicos e do ensaio de citotoxicidade, conclui-se que, apesar do EB do isolado do cerrado (*Pseudofusicoccum* sp.) apresentar atividade sobre um maior número de microrganismos, o EB do isolado do mangue (*Diaporthe* sp.) apresentou atividade em uma concentração menor e dentro da faixa de baixa citotoxicidade. Por outro lado, ainda é possível explorar os dois EBs, dando a possibilidade de diminuir tanto as concentrações quanto a citotoxicidade dos extratos testados.

Referências bibliográficas

- ABBA, C. et al. Phenolic Compounds from Endophytic *Pseudofusicoccum* sp.. Isolated from *Annona muricata*. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 3, p. 332-337, 2018.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the Potential of Endophytes from Medicinal Plants as Sources of 2 Antimycobacterial Compounds. **Microbiological Research**, v. 169, 9. 483-495, 2014.
- ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.
- AMIT, M. et al. Human Feeder Layers for Human Embryonic Stem Cells 1. **Biology of reproduction**, v. 2156, p. 2150-2156, 2003.
- ASSIS, P. C. P. Bactérias endofíticas isoladas de *Caryocar brasiliense*: atividade enzimática, antimicrobiana, leishmanicida e co-cultura com microrganismos patogênicos. **Dissertação de mestrado**, UFSCar, 2018.
- ANVISA. Disponível em [http:// anvisa.gov.br/antimicrobianos](http://anvisa.gov.br/antimicrobianos). Acesso em 14 de Agosto de 2020.
- ATLAS DOS MANGUEZAIS DO BRASIL. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**, p. 1-176, 2018.
- AZEVEDO J. L. et al. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: Kharwar RN, Upadhyay R, Dubey N, Raghuwansh R (eds) Microbial diversity and biotechnology in food security, **Springer, New Delhi**, p. 17-22, 2014.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI B. N; DESHMUKH, S.H. (Ed.). Fungi: multifaceted microbes. **Boca Raton: CRC Press**, p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, R. C. L. S.; PIMENTA, F. C.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da atividade antimicrobiana de Actinoplanes isolados do solo de cerrado goiano e o efeito citotóxico do extrato etanólico bruto dos isolados. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, p. 217-226, 2004.

AZEVEDO, J. L. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**, p. 17-22 2014.

BOGAS, A. C.; TORRES, F. L.; DE SOUSA, C. P.; LACAVA, P. T. Bioactivity of Endophytes from the Brazilian Tropical Savannah. **Acta scientific microbiology**, v. 3(9), p. 15-22, 2020.

BOTTONE E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 23, p. 382-398, 2010.

BRISSOW, E. R. et al. 18-Des-hydroxy Cytochalasin : an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum* -92C , an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum*. Pohl ex Eichler. **Parasitology Research**, v. 116(7), 9. 1823-1830, 2017.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4(165), p. 165, 2012.

BUATONG, J. et al. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27(12), p. 3005–3008, 2011.

CAMPOS, F. F. et al. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2(12), p. 1–11, 2008.

CARRANZA, T. et al. Protected area effectiveness in reducing conversion in a rapidly vanishing ecosystem: the brazilian cerrado. **Conservation Letters**, v. 7(3), p. 216-223, 2020.

CARRIM, A. G. I. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de *Jacaranda decurrens* Cham. (CAROBINHA-DO-CAMPO). **Enciclopédia Biosfera**, p. 1374-1385, 2016.

CARVALHO, P. L. N. et al. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: Antioxidant and Antiproliferative Activities an Endophytic Fungus Associated with *Rheedia brasiliensis* Plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, p. 172–176, 2012.

CAVICCHIOLI, R. Potencial biotecnológico do *paenibacillus polymyxa* rnc-d, endofítico isolado de *Prunus* sp. (cerrado), para atividade antimicrobiana e inflamação aguda. **Dissertação de mestrado**, UFSCAR, 2017.

CHAEPRASERT, S. et al. Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand : their antimicrobial and anticancer potentials. **Botanica Marina**, v. 53(6), p. 555-564, 2010.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy os Sciences**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. Review article new delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48(3), p. 235-242, 2015.

CHEN, G. et al. The metabolites of a mangrove endophytic fungus *Penicillium thomi*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9(2), p. 159-164, 2007.

CHEN, S. et al. Cytotoxic and antibacterial preussomerins from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Journal of Natural Products**, v. 79(9), p. 2397-2402, 2016.

CHEN, Y. et al. Fitoterapia Bioactive polyketides from the mangrove endophytic fungi *Phoma* sp . SYSU-SK-7. **Fitoterapia**, v. 139, p. 4-8, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M7-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Wayne, PA**, 2012.

CUZZUOL, G. R. F.; CAMPOS ROCHA, A. Interação do regime hídrico com as relações nutricionais em ecossistema manguezal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26(1), p. 11–19, 2012.

DAS, G; PATRA, J K; BAEK, K. Antibacterial properties of endophytic bacteria isolated from a fern species *Equisetum arvense* L. against foodborne pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Foodborne pathogens and disease**, v. 14(1), p. 1-9, 2016.

DE LAS HERAS, A. et al. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* v. 14, p. 118-127, 2011.

DE LORENZO, J. L. *Microbiologia para o estudante de odontologia*. Editora Atheneu, 2004.

DE NOORDHOUT, C. M. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 14, p. 1073-1082, 2014.

DE PRINCE, K. A. Determinação da atividade anti *Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA. 2008. 71 f. **Dissertação de mestrado**, UNESP, 2008.

DE SOUZA SEBASTIANES, F. L. et al. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 153–166, 2013.

DIERICK K. et al. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4277-4279, 2005.

DISTRIBUIÇÃO DO CERRADO NO BRASIL. Disponível em: <http://cerrado.obt.inpe.br/>. Acesso em 12 de Agosto de 2020.

EHLING-SCHULZ M., FRICKER M., SCHERER S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 479-487, 2004.

EHLING-SCHULZ M. et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. **Microbiology**, v. 151, p. 183-197, 2005.

EHLING-SCHULZ M.; MESSELHÄUSSER U. One pathogen but two different types of food borne outbreaks; *Bacillus cereus* in catering facilities in Germany, p 63–70. In Hoorfar J (ed), *Case Studies in Food Safety and Quality Management: Lessons from Real-Life Situations*. **Woodhead Publishing**, Cambridge, United Kingdom, 2012.

EHLING-SCHULZ, M., LERECLUS, D., KOEHLER, T. M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with pathogenic potential. **Gram-Positive Pathogens**, v. 7(3) p. 875-902, 2019.

EMBRAPA. **EMBRAPA CERRADO:VI Plano Diretor da EMBRAPA Cerrados**. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publico/pdu2008-2011.pdf>. 2008. Acesso em 14 de Agosto de 2020.

FERNANDES, M. D. R. V. et al. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45(4), p. 677–685, 2009.

FERREIRA, M. E.; JR, L. G. F.; MIZIARA, F. Journal of land use science modeling landscape dynamics in the central Brazilian savanna biome : future scenarios and perspectives for conservation. **Journal of Land Use Science**,v. 8(4), p. 403-421, 2012.

FOXMAN B.; BROWN P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, p. 227-241, 2003.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1–15, 2007.

GÓES, M. A. O.; JERALDO, V. DE L. S.; OLIVEIRA, A. S. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9(31), p. 119–126, 2013.

GOMES, R. R. Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros. **Tese de doutorado**, UFPR, 2012.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GUBIANI, J. R. Bioprospecção de fungos endofíticos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma* sp. **Tese de doutorado**, Unesp, 2015.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44(2), p. 136-142, 2008.

HUANG, X. et al. Cytochalasins from endophytic *Diaporthe* sp . **Natural Product Research**, p. 1-8, 2019.

JACOB, V. P. Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 β -estradiol. 73f. **Dissertação de Mestrado**, UBI, 2011.

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

JEßBERGER N. et al. From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 560, 2015.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. v. 1(1), 2005.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico microbiológico. **São Paulo**, 2001

KRISTENSEN, E. et al. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany**, v. 89(2), p. 201–219, 2008.

LACAVA, P. T.; SEBASTIANES, F.L.S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: Elisa Esposito; João Lúcio Azevedo. (Org.). **Fungos, uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, v. 1, p. 533-569, 2009.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic Bacteria: A biotechnological potential in agrobiology system. In: Dinesh K. Maheshwari; Meenu Saraf; Abhinav Aeron. (Org.). **Bacteria in Agrobiology: Crop Productivity**, v. 8, p. 1-44, 2013.

LACAVA, P T; AZEVEDO, J. L. Advances in endophytic research. **Advances in Endophytic Research**, p. 1-454, 2014.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, Vijay C.; Gange, Alan C.. (Org.). **Advances in Endophytic Research Advances in Endophytic Research**, p. 231-243, 2014.

LEE, J. Y. H. et al. Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*. **Nature Microbiology**, v. 3, p. 1175-1185, 2018.

LEMONS, R. C. Testes de citotoxicidade in vitro no controle da qualidade de biomateriais empregados em luvas utilizadas por profissionais da FIOCRUZ. 119f. **Dissertação de Mestrado**, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

LI, M. et al. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. *Natural Products Reports*, v. 26(2), p. 281-298, 2009.

LIN, X. et al. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 53-58, 2005.

LOTTE R. et al. Virulence analysis of *Bacillus cereus* isolated after death of preterm neonates, Nice, France, 2013. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 23, p. 845-848, 2017.

MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3114-3119, 2013.

MADIGAN M. & MARTINKO J. Brock Biology of Microorganisms. **Prentice Hall**, 2005.

MAHESHWARI, R. What is an endophytic fungus? **Current Science**, v. 90(10), p.25, 2006.

MANUAL DA VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral. Acesso em 20 de Agosto de 2020.

MASSON, A O; LOMBELLO, C. B. Metodologias de avaliação citotóxica: estudo comparativo segundo tempo de exposição. **COLAOAB**, v. 5(2009), p. 939-948, 2016.

MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y. Endophytic actinomycetes : promising source of novel bioactive compounds. *The Journal of Antibiotics*, v. 70, p. 514-519, 2017.

MAYER, F. L., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4(2) p. 119-128, 2013.

MCLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. **Epidemiology Infection**, v. 104, p. 181-189, 1990.

MEDEIROS, C. et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. **Journal of Biotechnology**, v. 294, p. 30-37, 2019.

MESSELHÄUSSER U. et al. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013). **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://brasil.gov.br>. Acesso em 12 de Agosto de 2020.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Manguezal**. Disponível em: <http://mma.gov.br/biomas/manguezal>. Acesso em 14 de Agosto de 2020.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <http://mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em 22 de Agosto de 2020.

MONFARDINI, J. D. Modulação da produção metabólica de *Botryosphaeria parva* utilizando a abordagem OSMAC , e sua co-cultura com o endófito *Pseudofusicoccum stromaticum*. **Tese de doutorado**, Unesp, 2020.

MOREIRA, C. C. Bioprospecção de fungos endofíticos de manguezais com atividade antimicrobiana, enzimática, antiparasitária e antitumoral. **Dissertação de mestrado**, UFSCar, 2016.

NAGELKERKEN, I. et al. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. **Aquatic Botany**, v. 89, p. 155–185, 2008.

NAITO M. et al. Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis*. **DNA Research**, C v. 15 (4), p. 215-25, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1–13, 2015. **C**

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAUDE. OMS, 2017. Disponível em <http://www.paho.org.br>. Acesso em 22 de Agosto de 2020.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87 (2), p. 79-99, 2004.

PALMA, J. M. Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* oriundas de corte bovino e abatedouros frigoríficos de bovinos localizado no distrito federal. **Dissertação de Mestrado**, 2016.

PAUSAS, J. G.; KM, C. D. N. Homage to L . M . Coutinho : fire adaptations in cerrado plants. **International Journal of Wildland**, v. 26, p. 249-251, 2017.

PELISSARI, D M; CECHINEL, M P; SOUZA-GOMES, M L; LIMA JÚNIOR, F. E. F. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. Berlin: Springer-Verlag, p.179-197, 1991.

PIMENTEL, M. R. et al. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–11, 2010.

PINHEIRO, E S; DURIGAN, G. Diferenças florísticas e estruturais entre fitofisionomias do cerrado. **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 181–193, 2012.

PIZA, A C M T; HOKKA, C O; SOUZA, C. P. Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw .) *Triana* (Melastomataceae) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. **Journal of Scientific Research & Reports**, v. 4(4), p. 281–291, 2015.

POLONIO, J. C. et al. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**, v. 14(3), p. 7297-7309, 2015.

PRÜSS B. M. et al. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5436-5442, 1999.

RABAL, B. C. Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. **Tese de Doutorado**, UNESP, 2016.

RADOSHEVICH, L., & COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16(1), p. 32-46, 2017.

RANGEL, T. F. L. V. B.; BINI, L. M. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. **Applied Geography**, v. 27, p. 14–27, 2007.

RATNER, B. D. et al. Biomaterials science a multidisciplinary endeavor, in biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **Elsevier Science**, v. 2, p. 864, 2004.

REEF, R.; FELLER, I. C.; LOVELOCK, C. E. Nutrition of mangroves. **Tree physiology**, v. 30, n. 9, p. 1148–60, 2010.

RIBEIRO, S. et al. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the Ornamental Plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v. 75, p. 588-596, 2018.

RÖHRIG, C. et al. Targeting Hidden Pathogens: Cell Penetrating Enzybiotics Eradicate Intracellular Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Bio American Society for Microbiology**, v.11, p. 1-19, 2020.

ROSENTHAL, E. et al. Le traitement de la leishmaniose viscérale en Europe en 2009 . Place de l ' amphotéricine B liposomale. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 39, p. 741–744, 2009.

RUSSO T. A. & JOHNSON J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbes Infect**, v. 5, p. 449-456, 2003.

RYAN, K.J. & RAY, C.G. Sherris medical microbiology. **McGraw Hill**, p. 551-552, 2004.

SADANANDA, T. S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5(16), p. 3643-3652, 2011.

SAHOO, K.; DHAL, N. K. Potential microbial diversity in mangrove ecosystems:A review. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 38(2), p. 249-256, 2009.

SANTIAGO, I. F. et al. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica*. **Extremophiles**, v. 16(1), p. 95–103, 2012.

SANTOS, C. M. Prospecção enzimática e atividade antagonística in vitro de fungos endofíticos isolados de folhas de *Sapindus saponaria* L. **Dissertação de Mestrado**, UEM, 2016.

SCHOENI J. L. & WONG A. C. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 636-648, 2005.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 622-632, 2012.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, p. 153-166, 2013.

SEBASTIANES, F.S.; DE AZEVEDO, J.L.; LACAVA, P.T. Diversity and Biotechnological Potential of Endophytic Microorganisms Associated with Tropical Mangrove Forests. In: João Lucio de Azevedo; Maria Carolina Quecine. (Org.). Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. **Gewerbestrasse: Springer International Publishing**, v. 1, p. 37-56, 2017.

SEBASTIANES, F.L.S. et al. Isolation of the Antibacterial Agent Viridiol from the Mangrove Endophytic Fungus *Hypocrea virens*, as Monitored by a Biologic Assay Against *Escherichia coli* and NMR Spectroscopy. **Current Biotechnology**, v. 6, p. 1-1, 2017.

SENA, C. M. S. Estudo do perfil microbiológico da seção de envasamento e acondicionamento de soros e vacinas desenvolvidos no Instituto Butantan. **Monografia**, Instituto Butantan, 2014.

SERRANO, N. Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos. **Tese de doutorado**, UFSCar, 2014.

SILVA, P. H. F. Bioprospecção de fungos endofíticos contra células de melanoma e patógenos humanos. 2017. 66 f. **Dissertação de mestrado**, UEA, 2017.

SILVA, K. L. O. et al. Vacinas Contra Leishmaniose: Uma Revisão. **Archives of Health Investigation**, v. 2(4), p. 18-28, 2013. (

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 1006–15, 2006.

SMEE, D. F. et al. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **Journal of Virological Methods**. v.106, p.71-79, 2002.

SOARES, A. S. A ação da lectina nativa de *Bauhinia variegata* na regeneração tecidual. 64f. **Trabalho de Conclusão de Curso**, UFPel, 2017.

SOUZA, R. D. Esporos de *Bacillus subtilis* como adjuvante vacinal. **Tese de Doutorado**, 2014.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 345, p. 345-351, 2014.

STARK T. et al. Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 191– 201, 2013.

STENFORS ARNESEN L. P., FAGERLUND A., GRANUM P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 579-606, 2008.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 11, p. 2–4, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67(4), p. 491–502, 2003.

SOUSA, C.P.; SERRANO, N.F.G.; LACAVA, P.T. Endophytic Microorganisms of the Tropical Savannah: A Promising Source of Bioactive Molecules. Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. **Springer**, p. 57-70, 2017.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia : *Palicourea longiflora* (aubl .) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, v. 34(2), p. 185-195, 2004.

TAN, R X; ZOU, W. X. ChemInform Abstract: Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. **ChemInform**, 2010.

TASARA, T. & STEPHAN, R. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1473-1484, 2006.

TONG S. Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28(3), p. 603-61, 2015.

TORRES, F. L. Isolamento, caracterização e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados à plantas do cerrado. **Dissertação de mestrado**, UFSCar, 2018.

UZOR, P F; OSADEBE, P O; NWODO, N. J. Antidiabetic Activity of Extract and Compounds from an Endophytic Fungus *Nigrospora oryzae*. **Drug Research**, v. 67(5), p. 308-311, 2017.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v.33, p.406-414, 2009.

WALTERS, B. B. et al. Ethnobiology , socio-economics and management of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, v. 89(2), p. 220-236, 2008.

WANG, W. et al. Epidemiological study on prevalence, 1 serovar diversity, multi-drug resistance and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases of *Salmonella* spp. from patients with diarrhea, food of animal origin, and pets in several provinces of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability. Animal Cell Culture. **Oxford University**. p. 175-219, 2000.

YAMAMOTO S. et al. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. **Journal of Urology**, v. 157, p. 1127-1129, 1997.

ZHENG, Y. K. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, v. 66(2), p. 529-542, 2016.

ZIEBUHR, W. et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 14-20, 2006.