



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**

**SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE EXO E/OU POLISSACARÍDEOS DE  
ORIGEM MICROBIANA DA AMAZÔNIA PARA O USO EM  
ODONTOLOGIA**

**RACHID PINTO ZACARIAS FILHO**

**MANAUS  
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA**

**RACHID PINTO ZACARIAS FILHO**

**SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE EXO E/OU POLISSACARÍDEOS DE  
ORIGEM MICROBIANA DA AMAZÔNIA PARA O USO EM  
ODONTOLOGIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação – BIONORTE da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor na área de Biodiversidade e Biotecnologia.

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA**

**MANAUS  
2018**



## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Z13s Zacarias Filho, Rachid Pinto  
Seleção e produção de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia para o uso em Odontologia / Rachid Pinto Zacarias Filho. 2018  
111 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza  
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Endófitos. 2. Polissacarídeos fúngicos. 3. Agregado de Trióxido Mineral. 4. Biomateriais. 5. Odontologia. I. Souza, Antonia Queiroz Lima de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## RACHID PINTO ZACARIAS FILHO

“SELEÇÃO E PRODUÇÃO DE EXO E/OU POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM MICROBIANA DA AMAZÔNIA PARA O USO EM ODONTOLOGIA”.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador (a): **Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza**

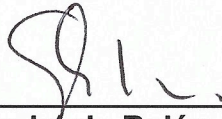
Co -orientador(a):

### Banca Examinadora:



---

**Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza (UFAM)**  
Orientadora – Presidente da banca



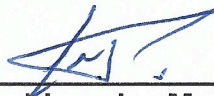
---

**Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM)**  
Membro



---

**Profa. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira (UFAM)**  
Membro



---

**Prof. Dr. Lizandro Manzato (UFAM)**  
Membro



---

**Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira (UFAM)**  
Membro

**MANAUS –AMAZONAS**  
**Dezembro/2018**

## DEDICATÓRIA

A minha querida esposa **Simone**, amor verdadeiro, companheira de décadas, minha incentivadora, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e que sempre me incentivou a seguir em frente. E ao meu filho **Bruno** que me ensinou o sentido do amor incondicional e da felicidade.

## *Agradecimento Especial*

A minha orientadora **Profª. Drª. Antonia Queiroz Lima de Souza**, pela forma simples e direta de mostrar o que significa ser mestre, por me apresentar este “novo mundo” da Biotecnologia, pelos ensinamentos fornecidos, pela paciência nos momentos difíceis e principalmente pela confiança em mim depositada. **Meu muito obrigado!**

## *Agradecimentos*

A Deus, pelas bênçãos concedidas e pelas dificuldades superadas.

Ao **Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza**, pela amizade e convívio.

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA, na pessoa de seu Magnífico Reitor **Prof. Cleinaldo Costa** e **Vice-Reitor Prof. Cleto Cavalcante de Souza Leal**.

Aos professores da **Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal** e a **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (PPG- BIONORTE)**.

Ao coordenador estadual do PPG **Prof. Dr. Jair Max Fortunato Maia**.

À **Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA)** pela liberação concedida.

À **Central Analítica** da Universidade Federal do Amazonas pelo uso dos laboratórios e a todos que auxiliaram na execução dos procedimentos relacionados ao trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioensaios e Microbiologia (LaBMicrA) da Central Analítica da UFAM, **Sarah, Adriana, Sandro, Greiciane, Paulo Henrique, Débora, Ana Paula, Ketlen, Ruan, Alzira, Marta, Paulo e Rafael**, pelo companheirismo demonstrado, pelos momentos de auxílio e cumplicidade vividos ao longo do percurso.

À CAPES pelo financiamento desta pesquisa no projeto Pró-Amazônia.

## RESUMO

Nos últimos anos, vem sendo dada importância aos metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos, em razão de suas diferentes aplicações biotecnológicas e pela possibilidade da transferência vertical, ou seja, dos microrganismos endofíticos serem capazes de produzir as mesmas classes de substâncias de suas hospedeiras. Dentre os polissacarídeos microbianos, o interesse principal encontra-se voltado aos extracelulares ou exopolissacarídeos, por serem biocompatíveis e muitos destes apresentarem atividade antibiótica. Com o objetivo de produzir um cimento experimental a partir de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia para o uso em Odontologia e avaliar a atividade antimicrobiana de seus extratos frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *C. tropicalis* (. Foram selecionadas e cultivadas 21 linhagens de fungos endofíticos e aquáticos, cujos aspectos morfológicos indicavam pertencerem aos gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Xylaria*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis*, em meio de cultura batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura, a 24±1° C por 21 a 28 dias de acordo com o desenvolvimento das colônias. O micélio foi separado por filtração a vácuo e os constituintes fixos extracelulares (meio de cultura fermentado) e intracelulares (micélio) foram extraídos com metanol (MeOH) sob refrigeração a 4° C. Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados em placas de ELISA de 96 poços. Foram confeccionados 6 grupos: GC - cimento de agregado trióxido mineral (MTA) branco Angelus® e G2 a G6 - parte do pó de MTA foi substituído, em diferentes concentrações (5%,10%,15%, 20%, 25%), pela fração extraída do cultivo do fungo *P. microspora*. O gênero *Pestalotiopsis* mostrou-se mais efetivo nos testes antimicrobianos, especificamente o *P. microspora*, fungo endofítico obtido da planta *Annona* sp, da família Annonaceae, com a concentração inibitória mínima de 0,125 para *E. faecalis*, 0,25 para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e 0,5 para *C. tropicalis*. Na avaliação da atividade antimicrobiana do cimento experimental, houve atividade para o *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* nos grupos GC, G5 (MTA + 20%) e G6 (MTA + 25%). O G6 (MTA + 25%) apresentou maiores valores de todos os grupos e não houve diferenças significativas entre os grupos de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Do extrato também foram realizadas análises químicas. A adição do extrato de polissacarídeos intracelular do fungo endofítico *P. microspora* melhorou a atividade antimicrobiana do MTA e também foi produzida uma membrana experimental, constituindo-se alternativas promissoras para o uso odontológico.

**Palavras-chave:** Endófitos, Polissacarídeos fúngicos, MTA, Biomateriais, Odontologia.

## ABSTRACT

In recent years, importance has been given to the metabolites produced by endophytic microorganisms, due to their different biotechnological applications and the possibility of vertical transference, that is, the endophytic microorganisms are able to produce the same classes of substances from their hosts. Among the microbial polysaccharides, the main interest is focused on extracellular or exopolysaccharides, because they are biocompatible and many of them present antibiotic activity. With the objective of producing an experimental cement from exo and / or polysaccharides of microbial origin of the Amazon for the use in Dentistry and to evaluate the antimicrobial activity of its extracts against the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *C. tropicalis* were selected and cultivated 21 lines of endophytic and aquatic fungi, whose morphological aspects indicated that they belong to the gender *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Paecilomices*, *Xylaria*, *Phomopsis* and *Pestalotiopsis*, in potato-dextrose (BD) , plus 0.2% yeast extract at  $24 \pm 1$  ° C for 21 to 28 days according to colon development The mycelium was separated by vacuum filtration and fixed extracellular constituents (fermented culture medium) and intracellular (mycelium) were extracted with methanol (MeOH) under refrigeration at 4°C. Assays for activity determination were performed on 96-well ELISA plates. Six groups were prepared: GC - white mineral trioxide aggregate (MTA) Angelus ® and G2 to G6 - part of the MTA powder was replaced in different concentrations (5%, 10%, 15%, 20%, 25%), by the fraction extracted from the cultivation of the fungus *P. microspora*. The genus *Pestalotiopsis* was more effective in antimicrobial tests, specifically *P. microspora*, an endophytic fungus obtained from the *Annona* sp plant of the Annonaceae family, with a minimum inhibitory concentration of 0.125 for *E. faecalis*, 0.25 for *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* and 0.5 for *C. tropicalis*. In the evaluation of the antimicrobial activity of the experimental cement, there was activity for *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* in the GC, G5 (MTA + 20%) and G6 (MTA + 25%) groups. The G6 (MTA + 25%) presented higher values of all groups and there were no significant differences between the groups of *E. coli*, *S. aureus* and *E. faecalis*. Chemical analyzes were also carried out from the extract. The addition of the intracellular polysaccharide extract from the endophytic fungus *P. microspora* improved the antimicrobial activity of the MTA and also produced an experimental membrane, constituting promising alternatives for dental use.

Key words: Endophytes, fungal polysaccharides, MTA, Biomaterials, Dentistry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A - <i>Annona muricata</i> ; B - <i>Annona coriácea</i> ; C - <i>Rollinia mucosa</i> .....	39
Figura 2: Esquema do sistema de eletrofiação.....	45
Figura 3: Placas de Petri com BDA+L e inóculo central.....	50
Figura 4: Método para conservação dos fungos sexuados - BDA+L e palitos.....	50
Figura 5: Conservado de <i>Trichoderma sp.</i> pronto.....	51
Figura 6 A: Microcultivos em placa de Petri com meio BDA dos fungos 461.....	52
Figura 6 B: Microcultivos em placa de Petri com meio BDA dos fungos 455.....	52
Figura 6 C: Microcultivos em placa de Petri com meio BDA dos fungos 84.....	52
Figura 7 A: Proporção de inóculos (1:100mL).....	53
Figura 7 B: Meio de crescimento BDL.....	53
Figura 8: Crescimento do fungo <i>Trichoderma sp.</i> em meio BDL após 21 dias em meio BDL.....	53
Figura 9 A: Separação do meio líquido por filtração a vácuo em cabine de segurança biológica .....	54
Figura 9 B: Micélio separado.....	54
Figura 10: Protocolo de extração dos exo e polissacarídeos.....	55
Figura 11: Representação esquemática da reativação e cultivo dos microrganismos teste .....	56
Figura 12: <i>Screening</i> das amostras para determinação da atividade antimicrobiana.....	57
Figura 13: Esquema das concentrações das diluições sucessivas nos poços.....	58
Figura 14: Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco.....	60
Figura 15 A: Matriz de aço inoxidável para confecção dos corpos de prova.....	62
Figura 15B: Dimensão do CP.....	62
Figura 16: Esquema da disposição dos CPs na placa de Petri.....	63
Figura 17: Sistema para Eletrofiação LPQI-UFAM.....	64



Figura 18 A: Eletrofiação .....	65
Figur 18 B: Folha de alumínio com a membrana.....	65
Figura 19: Figuras 19: Screening do teste antimicrobiano contra <i>E. faecalis</i> dos extratos dos fungos 84, 342, 461, 265 e 590, onde 19A-frente da placa, 19B-dorso da placa.....	77
Figura 20: Screening do teste antimicrobiano contra <i>P. aureoginosa</i> dos extratos dos fungos 84, 342, 461, 265 e 590, onde 20A-frente da placa, 20B-dorso da placa.....	77
Figura 21: Screening do teste antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> dos extratos dos fungos 84, 590, 461, 265 e 334, onde 21A-frente da placa, 21B-dorso da placa .....	78
Figura 22: Screening do teste antimicrobiano contra <i>C. albicans</i> dos extratos dos fungos 882, 345, 314, 325 e 84, onde 22A-frente da placa, 22B-dorso da placa.....	78
Figura 23: Screening do teste antimicrobiano contra <i>C. tropicalis</i> dos extratos dos fungos 342, 461, 265, 902 e 84, onde 23A-frente da placa, 23B-dorso da placa .....	79
Figura 24: Teste CIM do extrato 84 contra <i>E. faecalis</i> . 24A-frente da placa, 24B-dorso da placa.....	80
Figura 25: Teste CIM do extrato 84 contra <i>P. aureoginosa</i> . 25A-frente da placa, 25B-dorso da placa.....	80
Figura 26: Teste CIM do extrato 84 contra <i>S. aureus</i> . 26A-frente da placa, 26B-dorso da placa.....	81
Figura 27: Teste CIM do extrato 84 contra <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	81
Figura 28: Consumo de açúcar, pH e crescimento micelial do fungo <i>P. microspora</i> .....	85
Figura 29: A - Espectro de massa obtido do 5 o dia de cultivo; B - Espectro obtido do 20 o dia de cultivo; C - Espectro obtido do 30 o dia de cultivo.....	86
Figura 30: Substâncias previamente isoladas de <i>Annona cacans</i> .....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens de fungos endofíticos e aquáticos selecionadas para o estudo.....	48
Tabela 2: Composição do meio de cultura BDA .....	49
Tabela 3: Composição do meio de cultura BDA+L para 1 L .....	49
Tabela 4: Composição do meio de cultura BDL para 1 L .....	52
Tabela 5: Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco – Composição e Função.....	60
Tabela 6: Materiais e composição dos corpos de prova.....	61
Tabela 7: Características macroscópicas dos grupos dos fungos endofíticos e aquáticos.....	66
Tabela 8: Características microscópicas dos fungos endofíticos e aquáticos..	71
Tabela 9: Rendimentos dos extratos de fungos endofíticos e aquáticos.....	75
Tabela 10: Atividade antimicrobiana dos extratos frente aos patógenos.....	76
Tabela 11: Concentrações inibitórias mínimas do extrato de <i>Pestalotiopsis</i> contra os patógenos testados.....	82
Tabela 12: Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos de acordo com o microrganismo e os grupos estudados.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila  
Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Trióxido de Alumínio  
BDA - Batata Dextrose e Ágar  
BDL - Batata Dextrose e Levedura  
BMTA - MTA Branco  
BRM - Modificadores da Resposta Biológica  
°C - Graus Celsius  
cm – Centímetro  
CMTA - MTA Cinza  
EPS – Exopolissacarideo  
FeO - Óxido Férrico  
g - Grama  
GLC - Cromatografia em Fase Gasosa  
h – Horas  
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido Sulfúrico  
L – Levedura  
LaBMicra – Laboratório de Bioensaios e Microrganismos  
MeOH - Metanol  
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura  
mg – Miligrama  
MgO - Óxido de Magnésio  
MID - Dosagem Mínima Inibitória  
mL – Mililitro  
mm - Milímetro  
MTA - Agregado de Trióxido Mineral  
NBT - Nitroazul de Tetrazólio  
nm – Nanômetro  
% - Por cento  
® - Marca registrada  
RMN - Ressonância Magnética Nuclear  
sp. - Espécie  
SPE - Extração em fase sólida  
™ - *Trade Mark*  
TTC - 2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio  
UFAM- Universidade Federal do Amazonas  
µL - Microlitro  
µg – Micrograma  
v/v - Volume/Volume

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
1.1.FUNGOS.....	16
<b>1.1.1 Biodiversidade, Características e Importância</b> .....	16
<b>1.1.2 Interações com outros organismos</b> .....	19
1.1.2.1 Algas e fungos.....	19
1.1.2.2 Bactérias e fungos.....	20
1.1.2.3 Plantas e fungos.....	20
1.1.2.4 Fungos e fungos.....	22
<b>1.1.3 Fungos Endofíticos</b> .....	22
1.1.3.1 Aplicações Biotecnológicas.....	25
<b>1.1.4 Fungos Aquáticos</b> .....	27
<b>1.1.5 Biossíntese de compostos em fungos</b> .....	27
1.1.5.1 Produção de polissacarídeos e de exopolissacarídeos de origem fúngica.....	27
1.2 ARQUITETURA DENTAL, PERFURAÇÃO RADICULAR E AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA).....	32
1.3 RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EPS FÚNGICOS.....	37
1.4 A FAMÍLIA ANNONACEAE.....	39
1.5 O GÊNERO <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	40
<b>1.5.1 A importância biotecnológica do gênero <i>Pestalotiopsis</i></b> .....	41
1.6 ELETROFIAÇÃO DE MEMBRANA FUNCIONAL.....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	47
2.1 GERAL.....	47
2.2 ESPECÍFICOS.....	47
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	48
<b>3.1. SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS</b> .....	48
<b>3.1.1. Manutenção das cepas</b> .....	50
<b>3.1.2. Caracterização macro e micromorfológica</b> .....	51
<b>3.1.3 Cultivo fúngico</b> .....	52
<b>3.1.4 Obtenção dos metabólitos fúngicos</b> .....	53
3.2. ENSAIOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS.....	56
<b>3.2.1. Reativação e cultivo dos microrganismos teste</b> .....	56
<b>3.2.2 Preparo das amostras</b> .....	56
<b>3.2.3 Preparo dos controles</b> .....	57
<b>3.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana – Ensaio em Placas de Microdiluição</b> .....	57
3.3 PERFIL QUÍMICO E METABÓLICO DO <i>P. microspora</i> .....	58
3.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS EM ESCALA PREPARATIVA DO <i>P. microspora</i> .....	59

3.5 CONFEÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DO CIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
3.6 ENSAIOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS - CORPOS DE PROVA.....	62
3.7 ELETROFIAÇÃO DE MEMBRANA A PARTIR DE EXTRATO FÚNGICO DE <i>P. microspora</i> .....	63
<b>4. RESULTADOS</b> .....	66
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	93
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	94

## INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca de 20 % da biodiversidade mundial principalmente, na floresta Amazônica, a maior floresta tropical úmida do planeta e fonte inestimável de matérias primas para os mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus organismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004). Isso significa que, devido à alta biodiversidade existente em regiões tropicais, possivelmente há inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos ainda por serem descobertas (OLIVEIRA, 2013; BANHOS et al., 2014).

Nos últimos anos, uma importância maior vem sendo dada aos microrganismos associados às plantas, principalmente os endófitos, como fungos e bactérias, que habitam o interior de diferentes tecidos das plantas sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro. Embora tenham sido mais investigados a partir do século passado, estes microrganismos só receberam uma maior atenção há pouco mais de vinte anos, quando verificou-se que eles podem desempenhar funções importantes no processo de adaptação da planta, na proteção do hospedeiro contra herbívoros e patógenos, além de produzir uma infinidade de metabólitos de interesse econômico, tanto primários quanto secundários, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos e outros) (AZEVEDO; ARAÚJO, 2005; RODRIGUEZ et al., 2009; PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011; TEITEN et al., 2013; MAPPERSON et al., 2014).

Das aproximadas trezentas mil espécies de plantas superiores existentes na terra, cada uma é hospedeira de um ou mais endófitos. Fungos endofíticos são micro-organismos que vivem nos espaços intra e intercelulares dos tecidos vegetais sem causar efeitos adversos aparentes à planta hospedeira (STROBEL et al., 2004). Podem estar em interações variadas com seus hospedeiros, e podem afetar significativamente diferentes graus de desempenho dos mesmos. Em alguns casos, podem aumentar a capacidade das plantas de tolerar estresses abióticos e bióticos (KRINGS et al., 2009).

O grande interesse em microrganismos endofíticos tem surgido da percepção de que eles ocupam os mesmos nichos ecológicos de patógenos de plantas e,

portanto, têm um grande potencial para uso no controle biológico. A relação estrita entre endófitos e seus hospedeiros os torna naturais candidatos para uso como agentes de doenças e controle de insetos (MILLER et al., 2010). Ao longo dos últimos anos, outras evidências têm justificado esse interesse enfatizando que os fungos endofíticos podem ser ecologicamente importantes para seu hospedeiro, às vezes dando-lhes apoio, e outras vezes sendo os protagonistas em processos fundamentais de sobrevivência das plantas (ARTURSSON; FINLAY; JANSSON, 2006).

O potencial biotecnológico de fungos endofíticos é enfatizado pela quantidade de investigações científicas nesta área, mostrando que esses microrganismos podem produzir um número muito grande de compostos, muitos dos quais têm atividades biológicas de interesse, tais como fitormônios (VIDAL; JABER, 2009), antimaláricos, antivirais (SURYANARAYANAN et al., 2009), antioxidantes, antileishmaniais (KHIDIR et al., 2010), citotóxicos (DAVIS et al., 2008) e antimicrobianos (ALY et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Dentre as biomoléculas secretadas pelos fungos endofíticos, destacam-se os polissacarídeos. A classificação dessas macromoléculas se dá conforme sua localização no organismo produtor, em polissacarídeos citosólicos (fontes de carbono e energia para a célula), polissacarídeos de parede celular, ligados ou não a proteínas, e polissacarídeos secretados para o meio extracelular, formando cápsulas ou biofilme, denominados exopolissacarídeos (EPS). Em destaque, os exopolissacarídeos produzidos por bactérias e fungos têm sido amplamente aplicados nas indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outras (FACUNDO et al., 2008; OLIVEIRA, 2010; DOMINATO, 2017).

Desta forma, tornam-se cada vez mais necessárias pesquisas científicas que contribuam para a elucidação de novos compostos de fungos que tenham potenciais aplicações na indústria farmacêutica, tendo em vista que tais microrganismos compreendem uma enorme diversidade de espécies, e a sua aplicação é mais vantajosa já que os processos operacionais são relativamente mais simples. Em comparação com as plantas, os fungos possuem crescimento mais rápido, em menor tempo e ocupam menor espaço, além de ter um menor custo (BORGES, 2008).

A perda dentária decorrente de comunicações do tecido pulpar com o periodonto, resultante de processos patológicos advindos de lesões cariosas

profundas ou mecanismos iatrogênicos durante as manobras da terapia endodôntica ou oriundos de procedimentos restauradores protéticos, pode ser evitada por meio de materiais obturadores que tenham como características serem reparadores, seladores, inertes, biocompatíveis, radiopacos e apresentem boa aderência à dentina. Dentre os materiais odontológicos, o que vem sendo largamente utilizado para o vedamento de tais perfurações dentais é o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), mas apesar de apresentar boas características, já relatadas na literatura, apresenta um custo elevado (KATSAMAKIS et al., 2013; SIEW et al., 2015). Considerando a necessidade de um produto que atenda os requisitos necessários para utilização na reparação de perfurações endo-periodontais, bem como o vasto campo de materiais que podem ser obtidos à base de exopolissacarídeos e/ou polissacarídeos de origem microbiana, faz-se necessária a busca de um material com a finalidade de selar tais perfurações, com propriedades semelhantes àquelas disponíveis comercialmente para o uso odontológico, entretanto com menor custo, com igual ou superior qualidade e que portanto possa beneficiar os pacientes em geral.



## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. FUNGOS

#### 1.1.1 Biodiversidade, Características e Importância

Estima-se que, mundialmente, o reino Fungi apresente cerca de 1,5 milhão de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (AZEVEDO; SERAFINI; BARROS, 2001; SILVA; MALTA, 2016), mas apenas 8% delas são conhecidas (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos são o segundo maior grupo de espécie sobre a Terra, perdendo apenas para os insetos, apresentam grande diversidade entre si, porém possuem características em comum que os distinguem dos demais reinos (AZEVEDO; SERAFINI; BARROS, 2001). São organismos historicamente comparados às plantas, com destacada habilidade para usar qualquer fonte de carbono como alimento. Entretanto, não produzem clorofila, não possuem celulose nas paredes das suas células e não armazenam amido, mas por outro lado as paredes de suas células possuem quitina e os fungos armazenam glicogênio. Isto os coloca mais próximo do reino Animalia do que do reino Plantae, no qual eram classificados até algumas décadas atrás (STEPHENSON, 2010).

Como não produzem clorofila, não são capazes de fotossintetizar seus nutrientes, necessitando obtê-los de outros organismos. Desse modo, fungos sempre são, de uma maneira ou outra, dependentes de outras formas de vida. Eles são capazes de sobreviver em praticamente todos os ambientes onde existam outros organismos que lhes forneçam as substâncias de que necessitam. Estão presentes no solo, nas plantas, em organismos em decomposição e na água, mas também em ambientes mais extremos, como os de baixas temperaturas, os muito quentes, os de alta salinidade ou mesmo os muito ácidos (MACCHERONI JR; ARAÚJO; LIMA, 2004), o que denota uma alta capacidade adaptativa, tornando-os bastante atraentes em pesquisas para a produção de substâncias naturais, evidenciando, assim, a possibilidade de produção de muitos compostos orgânicos diferentes (MARCON, 2013).

Os fungos são seres eucariotos, o que os distingue das bactérias que não possuem núcleo, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; têm parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos, dependendo das substâncias orgânicas disponíveis. São altamente eficientes na

degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de substâncias de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores dos componentes primários da madeira - lignina e celulose - o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MINAMI, 2003)

Até alguns anos atrás, Loguercio-Leite (2004) agrupava os fungos em quatro filós, de acordo com as estruturas sexuais presentes: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Do primeiro, faziam parte os fungos mais simples e com dimensões muito pequenas, que normalmente apresentavam esporos dotados de flagelos para locomoção (zoósporos). Era considerada a linhagem mais primitiva de fungos. O filo Zygomycota apresentava duas classes: Zygomycetes e Trichomycetes. A classe Zygomycetes era distinguida pela produção de um esporo de resistência, de origem sexual, o zigósporo. Algumas espécies são utilizadas na fabricação de produtos industriais como amilases (*Mucor racemosus*),  $\beta$ -caroteno (*Blakeslea trispora*), ácido cítrico (*Mucor piriformes*), ácido fumárico (*Rhizopus oryzae*) e alguns alimentos. O filo Ascomycota, produtor de ascósporos (bolsas contendo esporos), possui o maior número de espécies até agora encontradas, e devido à variabilidade estrutural e numérica, ainda não possuía uma delimitação mais precisa das suas categorias taxonômicas superiores. Por fim, o filo Basidiomycota, onde a maioria das espécies produzia estruturas protetoras macroscópicas (basidiósporos). São utilizados como fonte de proteínas, sendo cultivados comercialmente. Outros são comestíveis, produtores de antibióticos ou podem ser tóxicos (LOGUERCIO-LEITE, 2004). Existem também os fungos que não produzem estruturas sexuais, denominados mitospóricos ou “fungos imperfeitos”. Alguns autores colocam-no no filo Ascomycota (MARCON, 2013).

Devido às mudanças nas análises genéticas, esta classificação sofreu modificações: os filós Chytridiomycota e Zygomycota não representam grupos homofiléticos e foram divididos. Um grupo de fungos denominado Glomales, antes classificado como zigomiceto, passou a constituir um clado ao lado dos cladós Basidiomycota e Ascomycota, passando estes três grupos a formarem o grupo dos fungos “verdadeiros”. O filo Zygomycota (sem o fungo Glomales) foi mantido e o Chytridiomycota foi dividido em três: Chytridiomycota, Monoblepharidales e Blastocladales, todos zoospóricos (BLACKWELL; SPATAFORA, 2004).

Em 2007, Hibett et al. realizaram um estudo onde propuseram um subreino Dikarya para reunir os Ascomycota e Basidiomycota por estes possuírem hifas com células dicarióticas. As maiores mudanças, entretanto, ocorreram nos antigos grupos Chytridiomycota e Zygomycota. Os microsporídios foram também incluídos no Reino Fungi.

Um estudo filogenético recente (EBERSBERGER et al., 2012) colocou Nuclearia e Microsporidia como os parentes mais próximos aos fungos, mas com posição ainda incerta. Os fungos mais antigos seriam os Blastocadiomycota, seguidos dos Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Entomophthoromycotina, Glomeromycota, Mucoromycotina, Basidiomycota e Ascomycota.

Os fungos podem se reproduzir de forma sexuada e/ou assexuada. Na reprodução sexuada, os esporos se formam por meiose enquanto na assexuada, constituem-se por mitose. Os fungos também podem desenvolver-se a partir de fragmentos do micélio (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

A utilização desses microrganismos pode ser através do seu material celular (biomassa) ou então de macro e micromoléculas isoladas. Há uma forte tendência em se explorar comercialmente a biomassa fúngica para isolamento de seus componentes celulares e conseqüentemente de seus principais constituintes, tais como enzimas (invertases, glucosidades), nucleotídeos, proteínas (manoproteínas) e principalmente polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas), além de lipídeos, como fosfolipídeos e ergosterol, pois estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e, conseqüentemente, de grande valor agregado (BEROVIC et al., 2003; PAVLOVA; PANCHEV; HRISTOZOVA, 2005).

Os fungos representam uma promissora fonte de produtos naturais bioativos, pois possuem uma alta capacidade de produção metabólica diversificada. Com a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, têm-se dado maior ênfase aos estudos de descoberta e aplicação dos metabólitos oriundos de microrganismos (STROBEL et al., 2004).

Devido à capacidade de produção de metabólitos bioativos por fungos, são relatados muitos medicamentos provenientes de substâncias produzidas por estes (SCHULZ; BOYLE, 2005). Os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas são os antibióticos penicilinas e cefalosporinas. Outros exemplos mais recentes são a mevinolina, um agente redutor de colesterol, ciclosporinas e alcalóides do Ergot. As substâncias isoladas de fungos destacam-se

também como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas) (PINTO et al., 2002).

Nos últimos anos, os microrganismos receberam atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores em produtos naturais. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação e triagem na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu potencial em fornecerem novas substâncias químicas bioativas (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI, 2006).

### **1.1.2 Interações com outros organismos**

Como os fungos são incapazes de produzir seu próprio alimento, eles necessitam interagir com outros organismos vivos para obter os nutrientes de que precisam. Grande parte dos fungos são saprófitas, alimentando-se da matéria orgânica de indivíduos mortos mas também são comuns casos de parasitismo e simbiose, e nesses casos os fungos interagem com organismos vivos, como algas, bactérias, plantas, animais e mesmo outros fungos (MARCON, 2013).

Durante os processos da interação fungo/hospedeiro, diversas moléculas podem ser produzidas para favorecer essa ligação, como enzimas, pigmentos, ácidos orgânicos e polissacarídeos (DOMINATO, 2017).

#### **1.1.2.1 Algas e fungos**

O exemplo mais clássico e representativo dessa interação é o líquen, resultante da simbiose entre uma alga verde unicelular ou filamentosa, ou uma cianobactéria, e um fungo, em geral um ascomiceto. A alga produz compostos de carbono que são repassados para o fungo, que os utiliza como fonte de energia para seu crescimento, mas também são transferidos outros compostos essenciais, como as vitaminas biotina e tiamina, que o fungo não é capaz de sintetizar. A alga recebe em troca um ambiente protegido contra a redução da umidade ambiental e alguns compostos produzidos pelo fungo a protegem do excesso de luz (WILL-WOLF et al., 2004).

### 1.1.2.2 Bactérias e fungos

Como bactérias e fungos coexistem em todos os ambientes, as interações entre eles são frequentes. Muitas vezes, estes microrganismos se associam a fim de que as bactérias possam capturar o nitrogênio do ar e produzir compostos que são repassados aos fungos, permitindo que estes cresçam mais rápidos e possam decompor mais matéria orgânica, repassando parte dos compostos degradados para as bactérias. Existem casos de simbiose entre bactérias e fungos em que a bactéria se localiza dentro do citoplasma ou de organelas das células fúngicas (endossimbiontes) podendo influenciar a fisiologia do fungo hospedeiro. Fungos podem ainda se alimentar de bactérias, especialmente no solo, mas também podem ser atacados por bactérias patogênicas (MACCHERONI JR.; ARAÚJO; LIMA, 2004).

### 1.1.2.3 Plantas e fungos

Qualquer interação planta-fungo é precedida por um encontro físico entre uma planta e um fungo, seguido por várias barreiras físicas e químicas que devem ser superadas para que tal associação ocorra com sucesso (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Uma das hipóteses inicialmente proposta para explicitar tal colonização assintomática, denominada “antagonismo equilibrado” evidencia como um endófito evita ativar as defesas do hospedeiro, garante auto-resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos deste e consegue crescer dentro de seu hospedeiro sem causar manifestações visíveis de infecção ou doença (SCHULZ; BOYLE, 2005; AL-MANHEL, 2017). Assim, endófitos e patógenos, ambos, possuem muitos fatores de virulência que se opõem aos mecanismos de defesa da planta. Se a virulência do fungo e a defesa da planta encontram-se equilibradas, a associação permanece aparentemente assintomática e avirulenta. Esta fase é apenas um período transitório em que fatores ambientais desempenham um papel importante para desestabilizar o delicado equilíbrio de antagonismos. Se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência de fungos, o fungo irá perecer. Inversamente, se a planta sucumbe à virulência do fungo, um relacionamento planta-patógeno levaria à doença da planta. Para que muitos endófitos possam se tornar patógenos latentes, a influência de certos fatores intrínsecos ou ambientais é essencial (EATON et al., 2010; EATON; COX; SCOTT, 2011). Recentemente, revelou-se que a interação endófito-planta pode não ocorrer apenas pelo equilíbrio entre a virulência e a defesa, mas devido a uma interação

muito mais complexa e precisamente controlada, onde em razão da coevolução planta-endófito (JI; LI; ZHANG, 2009), torna-se possível que endófitos desenvolvam mecanismos de resistência e ajudem na defesa química da planta através da produção de metabólitos secundários bioativos (KUSARI et al., 2011), que desempenham papéis fundamentais para a sanidade da planta como a proteção contra herbivoria, controle de outros microrganismos e aumento da tolerância às modificações ambientais (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; GUNATILAKA, 2006; KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006).

Uma das interações realizadas por microrganismos há muito conhecida ocorre com vegetais, em que fungos são responsáveis pelo processo de fixação do nitrogênio, sendo denominados genericamente de micorrizas. Os fungos se alimentam de restos de vegetais mortos, sejam folhas, frutos, madeira ou raiz, decompondo o material vegetal e permitindo sua reutilização pelas plantas. Os fungos podem viver na superfície das plantas (fungos epifíticos), seja nas folhas, caule, tronco ou na raiz. Estes fungos podem produzir substâncias úteis para a planta ou impedir sua colonização por organismos patogênicos. As plantas possuem também fungos vivendo no seu interior (fungos endofíticos) que não lhes causam doenças. Estes fungos recebem compostos essenciais para sua sobrevivência e em troca podem, por exemplo, produzir alcalóides tóxicos que afetam os herbívoros que se alimentam da planta, protegendo-a (SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004). Existem evidências de que a presença de fungos endofíticos pode provocar um aumento da resistência da planta a insetos, nematóides e bactérias (MARCON, 2013; STEPHENSON, 2010),

Os fungos também podem ser patogênicos para plantas, causando sua morte ou retardo no desenvolvimento. Estes fungos necessitam de nutrientes que são obtidos de células vivas ou a partir de sua morte e degradação (MACCHERONI JR.; ARAÚJO; LIMA, 2004).

Azevedo, Serafini e Barros (2001) consideraram que não há uma exata distinção entre os microrganismos endofíticos, epifíticos e patogênicos, existindo apenas um gradiente de interfaces entre eles, ou seja, eventualmente um microrganismo epifítico pode ser encontrado dentro do vegetal; um endófito, por sua vez, em certas condições pode atuar como patógeno; e um patógeno poderia ser considerado um endófito, quando não afetasse o hospedeiro.

De todas as espécies vegetais estudadas até o momento, todas apresentaram microrganismos endofíticos, o que demonstra que a presença destes é um fenômeno geral e comum e corrobora com a possibilidade de se encontrar novos e importantes endófitos a partir de estudos nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos (MOREIRA; MAY-DE-MIO, 2009). A simbiose entre a planta e o endofítico está associada à proteção e à alimentação dos fungos, que por sua vez, produzem substâncias bioativas que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro no meio ambiente, como hormônios reguladores de crescimento, antibióticos, inseticidas, etc. (LU et al., 2000).

#### 1.1.2.4 Fungos e fungos

Os fungos podem interagir também entre si, sendo denominados fungícolas. Tal interação pode se dar por saprofitismo, parasitismo ou simbiose. Uma das interações mais estudadas é o microparasitismo, quando um fungo obtém alimento a partir dos tecidos de outro fungo. Existem fungos microparasitas que obtém seu alimento unicamente de outros fungos, os quais são de grande interesse no controle biológico de doenças causadas por fungos nas plantações (GAMS; DIEDERICH; OLDMAN, 2004).

#### 1.1.3 Fungos Endofíticos

Os fungos denominados de endofíticos são fungos que habitam o interior dos tecidos aparentemente saudáveis de um hospedeiro vegetal. Estes podem permanecer em um hospedeiro por um período do seu ciclo de vida, mas também podem se instalar em uma planta por toda sua vida, onde a transmissão ocorre verticalmente, por meio de sementes do hospedeiro (PETRINI et al., 1992; AZEVEDO, 1999).

Eles tiveram sua primeira menção no século XIX, mas foi De Bary (apud PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002), em 1866, que fez a distinção entre eles e microrganismos patogênicos. A princípio, foram definidos como assintomáticos, não produzindo efeitos benéficos ou prejudiciais ao seu hospedeiro. Por esses motivos, além de não produzirem estruturas externas visíveis e o conhecimento a respeito de suas reais funções ser muito pequeno, esses microrganismos ficaram por volta de um século esquecidos. Apenas no final dos anos 70, os estudos se intensificaram sendo impulsionados pelas descobertas de

funções importantes como a produção de toxinas, antibióticos, alcalóides, enzimas, fatores de crescimento, e outras substâncias com potencial interesse biotecnológico; e a proteção contra insetos-praga, herbívoros e microorganismos patogênicos. Algumas dessas funções são imprescindíveis para a defesa e sobrevivência do hospedeiro (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

A primeira espécie identificada foi o *Herbaspirillum seropedicae*, por Baldani et al. em 1986 (apud RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004).

O maior número de espécies de endofíticos que pode ser encontrado em diferentes nichos ecológicos está localizado no filo Ascomycota (DOMINATO, 2017).

A colonização dos microrganismos endofíticos pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ; BOYLE, 2005). Em geral, para entrar nas plantas os microrganismos utilizam aberturas naturais ou feridas. As raízes são consideradas sua principal porta de entrada, por apresentarem arranhões, decorrentes do crescimento vegetal, da própria penetração no solo e do surgimento das raízes secundárias laterais. As aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas, feridas causadas por insetos e fungos patogênicos também são utilizados na entrada dos microrganismos. Além disso, os próprios endófitos possuem estratégias como a produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração na planta. Após a entrada, eles podem atingir diversos órgãos dentro da planta (folha, caule, etc.), entretanto, usualmente os fungos habitam as partes superiores das plantas como folhas, galhos, casca, pecíolo e estruturas reprodutivas (FAETH; FAGAN, 2002). Os endófitos também podem passar de uma planta para outra nos organismos onde ocorre propagação vegetativa (AZEVEDO, 1999; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

A relação entre fungos endofíticos e hospedeiros pode ser descrita em termos de especificidade, recorrência, seletividade ou preferência. A especificidade ocorre por restrição do micro-organismo a um único hospedeiro ou a um grupo de espécies afins e implica em interação bioquímica complexa interpretada como uma forma de adaptação ecológica. A recorrência, seletividade ou preferência ocorre quando há fungos endofíticos predominantes em um ou mais hospedeiros vegetais, localizados num mesmo habitat (SELIM et al., 2012).

A diversidade dos fungos endofíticos em uma planta pode ser muito alta, podendo ser encontradas mais de 100 espécies em somente um tecido (BORGES, 2008). Em algumas plantas investigadas, pôde-se notar a predominância de uma ou



algumas espécies de endófitos, evidenciando a especificidade de algumas espécies de fungos com a espécie hospedeira. A especificidade de um endófito em relação a uma espécie vegetal pode ser influenciada pelas condições ambientais (ZHANG; SONG; TAN, 2006; MORICCA; RAGAZZI, 2008; WALI et al., 2008; ROSA et al., 2009). Essa especificidade pode trazer grandes perdas da biodiversidade, uma vez extinguido-se uma espécie vegetal, haverá a eliminação de toda flora microbiana (GUNATILAKA, 2006). As plantas tropicais apresentam uma grande diversidade de microrganismos endofíticos, muitos deles ainda não estudados e que podem pertencer a novos gêneros e espécies (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; STROBEL, 2002).

Os fungos endofíticos são separados em quatro classes com base na ampla gama de hospedeiros, no tipo de tecido colonizado, colonização na planta, nos benefícios e na transmissão (RODRIGUEZ et al., 2009). Os endófitos de classe I são normalmente limitados a algumas gramíneas de estações frias e quentes (STONE; POLISHOOK; WHITE, 2004; BISCHOFF et al., 2005), cuja transmissão é vertical, com plantas maternas passando fungos para a descendência através de infecções de sementes (SAIKKONEN; ION; GULLENBERG, 2002). As vantagens proporcionadas por estes fungos parecem depender da espécie e do genótipo do hospedeiro, bem como das condições ambientais (FAETH et al., 2006). Os endófitos da classe II compreendem uma diversidade de espécies, todos os quais são membros da Dikarya (Ascomycota ou Basidiomycota). Eles têm capacidade de conferir tolerância ao estresse das plantas hospedeiras (RODRIGUEZ et al., 2009). Os endófitos Classe III, de transmissão horizontal, incluem plantas vasculares e avasculares, além de angiospermas herbáceas de florestas tropicais da Antártida e são conhecidos por sua grande variedade no interior de tecidos de plantas hospedeiras (DAVIS; SHAW, 2008). Assim, uma única planta pode abrigar centenas de diferentes fungos endofíticos desta classe. Os endófitos Classe IV, restritos às raízes das plantas, são geralmente fungos Ascomycetos encontrados em ecossistemas tropicais, que formam estruturas melanizadas como hifas inter e intracelulares, bem como microsclerotia nas raízes (REKHA; MANJU; ARYA, 2013).

Schulz; Boyle (2005) ressaltaram que os fungos endofíticos possuem alto grau de variabilidade, o que significa que essas interações têm potencial para o desenvolvimento evolucionário recíproco: a simbiose pode evoluir para um mutualismo mais especializado, por exemplo. Nas interações mutualísticas, os

fungos são capazes de induzir a planta hospedeira a produzir fitoalexinas, podem produzir metabólitos que conferem diversas vantagens às plantas, como resistência aos estresses bióticos e abióticos. Também podem produzir metabólitos que não interferem no metabolismo do vegetal, mas sim na defesa contra outros microorganismos (comensalismo). Nessa associação, a planta hospedeira protege e alimenta o endófito, que em resposta produz metabólitos bioativos para aumentar o crescimento e competitividade do hospedeiro e protegê-lo contra herbívoros e fitopatógenos (GUNATILAKA, 2006; YAN et al., 2015).

#### 1.1.3.1 Aplicações Biotecnológicas

O metabolismo dinâmico dos fungos endofíticos tem estimulado seu estudo com o intuito de obter importantes componentes bioativos, que são aplicáveis nas áreas industriais. Muitos metabólitos secretados por fungos podem ser utilizados como produtos biotecnológicos, entre eles os exopolissacarídeos (DOMINATO, 2017).

Os fungos endofíticos, até hoje ainda pouco estudados, constituem o grupo mais produtivo quimicamente entre os fungos filamentosos, apresentando uma produção de diversidade metabólica 73 % superior a outros fungos. A alta produtividade destes fungos pode estar associada a dois fatores ecológicos: o alto nível de estresse ambiental e intensas interações com outros organismos, tendo em vista que os microrganismos submetidos a ambos os fatores possuem maior capacidade de produzir metabólitos secundários biologicamente ativos (STROBEL; DAISY, 2003).

Durante as últimas três décadas, mais de 500 microrganismos endofíticos foram cultivados e submetidos a investigações para a caracterização química e avaliação biológica de um grande número de produtos naturais, que têm demonstrado novas estruturas químicas e atividades biológicas interessantes (GUNATILAKA, 2006; SOUZA et al., 2006).

Os fungos endofíticos produzem metabólitos similares ou igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, como o taxol, utilizado para o tratamento de câncer de útero e mama, obtido tanto da planta medicinal *Taxus brevifolia*, como do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STROBEL et al., 2004) e os meroterpenos isolados de *Penicillium brasilianum* que foi isolado de *Melia azedarach*, a qual produz este grupo raro de substâncias (FILL et al., 2009; GERIS et al., 2007). Isto

indica uma possível coevolução dos fungos com a espécie hospedeira, onde os fungos tem se adaptado ao seu microambiente por variação genética, ocorrendo uma transposição de genes entre a planta e o fungo em uma verdadeira engenharia genética *in vivo* (ZHANG; SONG; TAN, 2006; GUNATILAKA, 2006).

Representam uma fonte rica de novos compostos químicos com potencial de exploração em uma grande variedade de áreas como médica, agrícola e industrial (STROBEL et al., 2004; GUO et al., 2008; ZHANG et al., 2017).

Os micro-organismos endofíticos podem produzir diversas substâncias com potenciais aplicações biotecnológicas e exercer papéis fundamentais para a sobrevivência e o desenvolvimento do seu hospedeiro. Eles podem agir como agentes no controle de pragas e doenças, produzir substâncias bioativas como fitohormônios que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza, induzindo, por exemplo, a produção de sementes (YUE et al., 2000; OLIVEIRA, 2013), além de poderem ser utilizados como micoherbicidas no controle de ervas daninhas, competirem com fitopatógenos por nutrientes, produzirem substâncias antagônicas, parasitarem o patógeno ou induzirem a planta a desencadear resistência. Em razão de possuírem genes associados ao controle biológico, os microrganismos endofíticos podem produzir enzimas, participar na biorremediação de compostos tóxicos e produzir metabólitos secundários com atividades terapêuticas (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; ORLANDELLI et al., 2017).

Na área de saúde, metabólitos secundários de origem fúngica têm sido de extrema utilidade para indústria farmacêutica. São utilizados como princípio ativo e ajudam a prevenir e curar inúmeras doenças. Estes são formados geralmente nas fases finais do crescimento celular, e embora sejam substâncias não essenciais para o desenvolvimento do organismo, estão relacionadas com a adaptação ao meio ambiente. Dentre estes podem ser citados antibióticos, anticancerígenos, pigmentos e toxinas (GUIMARÃES, 2006; ALY et al., 2010; KHARWAR et al., 2011; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Estudos de metabólitos secundários têm mostrado que fungos endofíticos produzem um número significativo de compostos ainda não conhecidos na sua totalidade, mais com diversas atividades biológicas. Tem sido demonstrado que novas moléculas produzidas por endófitos (51 %) e seus extratos contendo atividades biológicas (80 %) ocorrem em número consideravelmente mais elevado

do que as produzidas por microrganismos do solo (38% das novas moléculas e 64% de extratos bioativos) (YANG et al., 2013; SILVA, 2014).

#### **1.1.4 Fungos Aquáticos**

Os fungos aquáticos podem ser definidos como aqueles em que todo o seu ciclo de vida está completamente adaptado ao ambiente aquático, incluindo a esporulação em substratos submersos (SHEARER et al., 2007). Representantes dos mais diversos grupos de fungos como os quitridiomycetos, ascomycetos, fungos conidiais, basidiomycetos, zigomicetos e tricomycetos (associados ao trato digestivo de larvas com vida aquática) estão presentes em diferentes habitats aquáticos sejam dulcícolas ou marinhos (BENCH; WHITE, 2012).

A definição de fungo aquático está diretamente relacionada ao grau de adaptação das espécies aos habitats tipicamente aquáticos ou de origem alóctone, como partes de vegetais que entram nestes ambientes. Vários sistemas de classificação foram propostos, porém definir o grau de adaptação dos fungos a ambientes aquáticos pode ser controverso em muitos casos, mas de um modo geral, dados sobre a ausência/presença de fungos em diversos habitats aquáticos permitem inferir quais grupos estão mais bem adaptados a estes ambientes e hipotetizar como a pressão seletiva vem agindo sobre eles (VIJAYKRISHNA; HYDE, 2006; SHEARER et al., 2007). Dentre os representantes do reino Fungi, quitridiomycetos, ascomycetos, fungos conidiais e basidiomycetos estão entre os mais comuns em ambientes aquáticos.

#### **1.1.5 Biossíntese de compostos em fungos**

##### **1.1.5.1 Produção de polissacarídeos e de exopolissacarídeos de origem fúngica**

Polissacarídeos são macromoléculas naturais, constituídas de unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas, diferindo entre si na unidade monomérica, no grau de ramificação, no tipo de ligações que as unem e no comprimento de suas cadeias, sendo encontrados em todos os organismos vivos e constituindo um dos grupos de compostos mais abundantes e importantes da biosfera. Podem ser obtidos a partir de biomassa vegetal, algas marinhas ou de microrganismos. Atualmente, os polissacarídeos extraídos de plantas, de algas marinhas e de crustáceos ainda dominam o mercado, sendo que os polissacarídeos

microbianos ainda representam uma pequena fração do mercado de biopolímeros (FREITAS et al., 2009).

Os polissacarídeos constituem uma importante percentagem da biomassa fúngica, onde a parede da hifa é formada por mais de 75 % deste tipo de biomolécula, principalmente em basidiomicetos. Além de atuarem como elemento de suporte para as hifas, alguns polissacarídeos constituem uma “capa” extracelular ao redor do micélio, proporcionando um suporte para adesão das enzimas excretadas e participando na degradação da lignina, como uma fonte indireta de peróxido de hidrogênio (SILVA et al., 2006; FUKUDA et al., 2009).

A composição e estrutura química dos polissacarídeos de parede celular são variáveis entre as diferentes espécies de microrganismos. Com base nos resultados provenientes da caracterização química dessas macromoléculas, alguns autores propõem a sua utilização como marcadores para a classificação taxonômica de fungos filamentosos e leveduras (CARBONERO et al., 2005; PESSONI et al., 2005).

Diferentes parâmetros físico-químicos, como solubilidade, estrutura, massa molecular e ramificações da cadeia estrutural podem influenciar a atividade biológica (SOLTANIAN et al., 2009). Devido a essa diversidade, os polissacarídeos possuem um amplo campo de aplicações nas indústrias de alimentos, biomédicas, farmacêuticas e cosméticas (CUNHA et al., 2012).

Na área biológica, são aplicados em engenharia de tecidos, em processos de imobilização de enzimas e como veículo de liberação de fármacos. Atividades biológicas como ação antiviral, antitumoral, antioxidante, hipoglicemiante, anticoagulante e antitrombótica também vêm sendo investigadas em polissacarídeos oriundos de diferentes fontes (FEITOSA; CUNHA, 2009). Atuação na diminuição da pressão arterial e na concentração de lipídios sanguíneos, na inibição da ação inflamatória e microbiana também têm sido analisadas (ALQUINI et al., 2004; ZHANG; SONG; TAN, 2006; FREITAS et al., 2017; LIU et al., 2017).

Os biopolímeros, de maneira geral, têm sido objetos de pesquisas devido ao seu potencial de aplicação. Estudos realizados com os polissacarídeos da parede celular fúngica demonstraram que essas moléculas apresentaram uma variedade de respostas biológicas de defesa, mas sua aplicação terapêutica parece estar relacionada com a estrutura química e a conformação espacial de cada macromolécula, sendo que pequenas diferenças estruturais entre polímeros

resultam em características peculiares para novas aplicações biotecnológicas (SILVA et al., 2006).

A aplicação clínica de alguns polissacarídeos pode apresentar limitações, devido ao elevado peso molecular e viscosidade dos mesmos e, ainda, à baixa solubilidade de alguns. Nesse sentido, a modificação química pode ser uma oportuna estratégia para aplicação como agentes terapêuticos (SARANGI et al., 2006; ZONG; CAO; WANG, 2012; ZHANG et al., 2013).

Polissacarídeos fúngicos podem ser comumente extraídos de corpos de frutificação de cogumelos, sendo os mais comuns as homoglicanas, como as  $\beta$ -D-glucanas, às quais foram atribuídas diversos efeitos biológicos (SMIRDELE et al., 2013). Os polissacarídeos também podem ser obtidos por fermentação de líquido submerso e recuperados a partir do caldo de cultura, como exopolissacarídeos, ou extraídos do micélio como já citado anteriormente. Esta é uma abordagem biotecnológica que permite um melhor controle da produção de polissacarídeos bioativos por fungos (GE et al., 2008).

Na produção de polissacarídeos microbianos, o interesse principal é voltado aos polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPSs). Os EPSs são definidos comumente como polissacarídeos extracelulares, produzidos por fungos e bactérias, excretados para o meio extracelular e têm sido reconhecidos como biomacromoléculas de elevado valor agregado. Dependendo do sistema microbiano, alguns polissacarídeos permanecem associados à superfície celular, enquanto outros são encontrados no meio extracelular (SILVA; HASHIMOTO, 2006; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Desta forma, alguns EPSs formam cápsulas ao redor da célula tornando-se parte da parede celular, enquanto outros formam limos fora da parede celular e têm habilidade para se difundirem dentro da fase líquida durante o processo de fermentação. Como resultado da produção do exopolissacarídeo, a viscosidade e a reologia da fermentação podem produzir mudanças no meio de cultivo, começando como um fluido Newtoniano de baixa viscosidade e finalizando como um fluido não-Newtoniano de elevada viscosidade. Os microrganismos que produzem grandes quantidades de limo têm maior potencial para comercialização, considerando ser um processo mais simples a recuperação dos exopolissacarídeos do meio de fermentação (SILVA et al., 2006).

Os estudos sobre produção de EPS fúngicos têm se diversificado, incluindo osendofíticos, principalmente pela capacidade de síntese e secreção de metabólitos

com ações biológicas específicas que estes micro-organismos apresentam (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; SELIM et al., 2012). Esta síntese pode ser explicada devido à intensa atividade metabólica dos endofíticos, causada pela necessidade de adaptação ao hospedeiro, especialmente devido aos mecanismos de defesa que estes últimos apresentam (SURYANARAYANAN et al., 2009).

A biossíntese de alguns EPSs está diretamente associada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente. Desempenham diversas funções na célula, tais como, proteção contra dessecação, constituem uma barreira impedindo a união de vírus a sítios específicos da parede celular, neutralizam toxinas, atuam como fonte de carbono e energia, são importantes na conversão do excesso de substrato em um material pouco metabolizável por outros micro-organismos, além de interagirem com células de animais ou plantas com relações específicas, simbióticas ou patogênicas (SOMENSE, 2014).

Segundo Mahapatra; Banerjee (2013), a produção de EPSs por fungos depende principalmente do tipo de cepa utilizada, da composição do meio de cultivo, bem como das condições físicas e do modo de extração. A produção de EPSs por fungos tem a vantagem de ser independente de condições climáticas, visto que sua produção pode ser controlada em laboratório, ao contrário das algas e plantas; possibilitam a utilização de matérias-primas regionais e mesmo de subprodutos industriais, apresentam grande agilidade de obtenção do produto acabado e necessitam de um espaço relativamente pequeno. Além disso, por serem produzidos sob condições controladas de pH, temperatura, taxa de aeração, concentração de nutrientes e utilizando espécies selecionadas, os problemas com variação estrutural dos polissacarídeos podem ser evitados, obtendo-se polissacarídeos com alta regularidade estrutural, o que não é comum naqueles vindos de outras fontes. Para poderem ser utilizados industrialmente, é preciso que os EPSs sejam produzidos em grandes quantidades pelos microrganismos, estando estes adaptados a variações de pH e temperatura relativamente amplas, além de apresentarem composição química compatível com o metabolismo humano (PINHEIRO, 2014).

A síntese do EPS pode ser dividida em três fases: assimilação de substrato carbônico; síntese intracelular de polissacarídeo e exsudação do polissacarídeo para o meio extracelular (DONOT et al., 2012).

A presença dos EPS no meio extracelular, em culturas fúngicas, pode ser explicada de duas formas. A primeira relaciona-se com a polimerização do EPS no espaço extracelular, após passagem dos monossacarídeos pela parede celular fúngica. A segunda hipótese refere-se à presença de vesículas capazes de carregar as macromoléculas, sintetizadas no interior da célula, através da parede celular, para o meio extracelular. As vesículas são geralmente ovoides, compostas por bicamada lipídica, com diâmetros que variam de 60 a 300 nm, o que facilita sua compressão para passar pelos canais na parede celular fúngica. Esses canais possuem tamanho adequado para a passagem das vesículas que, possivelmente, necessitam de um “motor molecular”. Para a manutenção destes motores, necessita-se de fontes energéticas, que estão presentes no interior das vesículas como as macromoléculas (carboidratos) envolvidas no metabolismo energético. Embora o conceito do uso de vesículas, pelos fungos, para o transporte de produtos através da parede celular seja recente, a ideia do transporte vesicular entre a membrana celular e a parede celular está bem estabelecida. Os caminhos de transporte vesiculares podem ser uma estratégia evolutiva para que a célula fúngica seja capaz de infectar o tecido de seus hospedeiros, causando alterações na sua fisiologia, o que caracteriza a patogenicidade. O transporte de vesículas transmembrana ocorre da mesma forma para os fungos ascomicetos e basidiomicetos (RODRIGUES et al., 2013).

Os exo e os polissacarídeos produzidos por fungos podem ser heteropolissacarídeos ou homopolissacarídeos e dentre estes últimos, destacam-se as  $\beta$ -glucanas cuja principal função estrutural é auxiliar na manutenção da rigidez e integridade da parede celular de fungos e leveduras. No ambiente natural em que os microrganismos são encontrados, tais polímeros podem estar relacionados à patogenicidade, ou também estarem associados à interação planta-microrganismo, proporcionando proteção à célula microbiana contra a dessecação ou ao ataque por bacteriófagos e protozoários (BAUERMEISTER, 2010).

As  $\beta$ -D-glucanas de origem fúngica são polissacarídeos constituídos de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas (comumente  $(1\rightarrow3)$ ), mas também por ligações do tipo  $(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ ,  $(1\rightarrow6)$ ,  $(1\rightarrow3;1\rightarrow4)$ . Elas têm sido isoladas da parede celular de leveduras, micélio fúngico, corpo de frutificação de fungos e também podem ser produzidas extracelularmente por fungos em cultivos submersos. Pertencem ao grupo dos compostos fisiologicamente ativos, coletivamente



denominados Modificadores da Resposta Biológica (BRM) (ZONG; CAO; WANG, 2012). Estes biopolímeros não são sintetizados pelos seres humanos, portanto não são reconhecidos pelo sistema imunológico como auto-moléculas e, conseqüentemente, induzem tanto à resposta imune inata como a adaptativa (CHEN; SEVIOUR, 2007; GRABAUM et al., 2012). Assim, devido à capacidade das  $\beta$ -glucanas em estimular o sistema imunológico, elas podem ser utilizadas como adjuvantes de quimioterápicos no tratamento de pacientes imunocomprometidos (LEUNG et al., 2006; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

As  $\beta$ -glucanas fúngicas têm demonstrado atividade antiproliferativa (FANG et al., 2012; ZABULYTE et al., 2012), imunomodulatória (KIM et al., 2011; ZYCOVA et al., 2013), como probióticos (LAM; CHEUNG, 2013) e antioxidante (DENG et al., 2012), além de proteção contra infecções microbianas de alguns patógenos como *Escherichia coli*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergilosos*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei*, *Mesocestoides corti*, *Trypanosoma cruzi* e *Eimeria vermiformis* (NOVAK; VETVICKA, 2009).

Várias são as fontes de carbono estudadas para a produção de EPSs fúngicos: glucose, sacarose, maltose, frutose, galactose, xilose, sorbitol, xilitol, manitol, arabinose e inositol, sendo observado que a glucose e sacarose têm sido as fontes de carbono mais utilizadas para a produção de EPSs fúngicos. Outro fator nutricional importante para a produção de EPS é a fonte de nitrogênio; altos níveis deste composto no meio de cultivo podem reprimir a sua formação (BURJACK, 2010).

## 1.2 ARQUITETURA DENTAL, PERFURAÇÃO RADICULAR E AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA)

Os dentes humanos são órgãos extremamente importantes na estética, fonética, sendo também essenciais para a mastigação; portanto, todos os esforços devem ser tomados para que permaneçam na cavidade bucal em condições saudáveis. São formados por três partes: coroa, colo e raiz. Dentre os tecidos que revestem a coroa dentária, destacam-se o esmalte, altamente mineralizado, a dentina e a polpa. A polpa dentária, localizada abaixo do esmalte e da dentina, é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, sendo abundantemente innervada e

vascularizada. Fixam-se aos ossos por meio do periodonto (cimento, ligamento periodontal, osso alveolar e cimento) (PATEL et al., 2014).

O periodonto e o tecido pulpar encontram-se anatomicamente interligados. Os acessos de comunicação não incluem somente aspectos anatômicos (foraminas apicais, canais acessórios) mas também envolvem linhas de fratura e perfurações radiculares, de origem iatrogênica ou patológica (cárie dentária e reabsorções radiculares externa/interna). A presença destas vias de comunicação possibilita a transferência de agentes inflamatórios do tecido pulpar afetado ao periodonto, o que conduz à formação de uma zona de defesa do tecido periodontal adjacente a estas vias (KATSAMAKIS et al., 2013).

As perfurações radiculares iatrogênicas ocorrem em aproximadamente 2 % a 12 % dos dentes tratados endodonticamente. A cirurgia de acesso, a pesquisa ou localização da entrada dos canais, remoção excessiva de dentina nas zonas de perigo ou fragilidade, desvios radiculares durante a exploração do canal, tentativa de remoção de instrumentos fraturados se enquadram em procedimentos odontológicos que podem levar a perfurações (TSESIS et al., 2010).

As perfurações radiculares rompem a barreira biológica entre o endodonto (sistema de canais radiculares) e o espaço periodontal, podendo em razão da sua extensão e localização, causar dor, supuração, abscessos, fístulas e reabsorção óssea, além de comprometerem, irreversivelmente, a longevidade do elemento dentário (TSESIS; FUSS, 2006). Estudos que investigaram as causas da extração de dentes tratados endodonticamente sugeriram que cerca de 4,2% foram extraídos em razão de perfurações iatrogênicas (TOURE; FAYE; KANE, 2011).

O prognóstico das perfurações endodônticas depende de fatores como: tamanho e localização da comunicação, comprimento da raiz, facilidade de acesso para reparação, presença ou ausência de comunicação periodontal com o defeito, tempo decorrido entre a sua ocorrência e o seu fechamento, material utilizado no preenchimento da perfuração e presença ou não de contaminação por agentes microbianos (COGO et al., 2009).

Ao longo dos anos, muitos materiais odontológicos foram propostos para o tratamento de perfurações radiculares, como o amálgama de prata, a guta-percha, os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (IRM<sup>®</sup> e SuperEBA<sup>™</sup>), as resinas compostas, dentre outros; entretanto, na presença de umidade, não apresentavam bom selamento, além de questionável biocompatibilidade (BRITO JÚNIOR et al.,

2013). A concepção atual de que o material ideal usado no tratamento de perfurações radiculares permita o selamento adequado, seja biocompatível, bactericida, induza formação e regeneração óssea, remineralização e cementogênese, além de que seja radiopaco, insolúvel em fluidos bucais, de fácil manipulação e uso clínico favoreceu a introdução de novos produtos no mercado odontológico (SINKAR et al., 2015).

Atualmente, o agregado de trióxido mineral (MTA), introduzido por Torabnejad et al., em 1993, mostra-se como o mais promissor material odontológico usado no tratamento de sítios com perfurações ou comunicações endoperiodontais. O MTA é largamente utilizado como medicação intra-canal ou em capeamentos pulpare. É composto de cimento de Portland refinado, um material usado em construções, e óxido de bismuto, que atua como radiopacificador. Outros constituintes do pó do MTA são o silicato tricálcico, alumínio tricálcico, trióxido de cálcio e óxido de silicato.

O MTA é um material hidrofílico, cuja apresentação comercial consiste em misturar o pó à água destilada na proporção recomendada pelo fabricante, resultando em um gel coloidal que deve ser aplicado diretamente no sítio da perfuração. Após a mistura, ocorre a hidratação e a dissolução dos óxidos, liberando no local íons hidroxila e metálicos, determinando uma elevação drástica no pH e liberação de íons cálcio que reagem com o gás carbônico presente nos tecidos a fim de produzir carbonato de cálcio cristalino (MAEDA et al., 2010). Outros autores sugerem que os íons de cálcio liberados reagiriam com os íons de fósforo dos fluidos teciduais, determinando a formação de uma camada de hidroxiapatita (GANDOLFI et al., 2010).

Até 2002, somente o pó do MTA em uma textura granulosa e de coloração cinza, das marcas ProRoot® MTA (Dentsply Endodontics, Tulsa, OK, USA) e MTA-Angelus® (Angelus, Londrina, PR, Brasil), encontrava-se disponível no mercado (CMTA). Entretanto, seis anos depois, um pó de MTA com coloração branca foi introduzido para preencher o requisito estético (BMTA). Análises por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microanálise de prova de elétron caracterizaram as diferenças entre os dois tipos de MTA e ressaltaram que a principal reside nas concentrações de  $Al_2O_3$ , MgO e FeO. O BMTA possui concentrações menores de  $Al_2O_3$ , MgO, e FeO, com reduções de 54,9 %, 56,5 % e

90,8 %, respectivamente, mostrando que a alteração de cor se deve à redução de FeO (ROBERTS et al., 2008).

Por meio de um estudo *in vitro* realizado em 60 molares humanos extraídos, Patel et al. (2014) compararam o B-MTA (de cor branca) com o MTA (de cor cinza) no reparo de perfurações de furca dentária e concluíram que não houve diferenças significativas no desempenho satisfatório de ambos em selar perfurações radiculares, visto que a absorvância do B-MTA, mensurada por espectrofotometria, foi de 0,127% enquanto a do MTA foi de 0,125%.

A biocompatibilidade do MTA, a eficaz capacidade do material para vedar perfurações radiculares (HASHEM e HASSENIEN, 2008), a capacidade de promover a regeneração perirradicular (TORABINEJAD ; PARIROKH, 2010) e as suas propriedades de fixação na presença de umidade, como o sangue, são características importantes que podem resultar em maiores taxas de sucesso e melhores prognósticos quando usado para o tratamento de perfurações.

A liberação de íons hidroxila, um pH elevado sustentado por períodos prolongados, e a formação de uma camada mineralizada intersticial podem proporcionar um ambiente desafiador para a sobrevivência de bactérias. Estas propriedades antibacterianas podem ser um potente inibidor do crescimento em espécies como *Enterococcus faecalis*, um microrganismo prevalente em falhas no tratamento de canais radiculares. Além disso, a *Candida albicans*, vulgarmente presente na doença endodôntica refratária, é suscetível à ação antifúngica do MTA. O cimento cria uma vedação impermeável que potencialmente poderia ser difícil para a penetração de microrganismos. Esta propriedade única de vedação, combinado com um pH inicial elevado que aumenta para 12,5 após a presa, pode fornecer um mecanismo adequado para o sepultamento bacteriano, neutralização e inibição no sistema de canal (BOGEN; KUTTLER, 2009).

Além da biocompatibilidade, o MTA é anti-mutagênico, não-neurotóxico e não produz efeitos adversos na microcirculação do tecido conjuntivo (TORABINEJAD; PARIROKH, 2010).

Com o objetivo de avaliar a taxa de sucesso do reparo de perfurações radiculares tratadas com o MTA, Krupp et al. (2013) realizaram um estudo retrospectivo em 90 dentes de pacientes atendidos por um endodontista entre os anos de 1999 a 2009 em seu consultório odontológico. A taxa de sucesso foi avaliada por meio de dados clínicos analisados e de radiografias tomadas 1 a 10

anos após o tratamento, por dois examinadores previamente calibrados. A medida de desfecho foi dicotomizada em: regeneração periodontal e falha. Em 63,3 % dos dentes houve a regeneração do tecido periodontal. Dois fatores foram identificados como essenciais no prognóstico do tratamento de perfurações radiculares: a presença de lesão pré-operatória no sítio da perfuração e o contato direto entre a perfuração e o meio bucal. Quando presentes, estes fatores conduzem a baixas taxas de sucesso no tratamento.

Katsamakidis et al. (2013) realizaram uma revisão sistemática com 24 estudos histológicos com animais para analisar a resposta pulpar do periodonto frente ao uso do MTA e observaram reações inflamatórias mínimas, regeneração óssea, presença de ligamento periodontal e formação significativa de cimento. O lapso temporal após a mistura, a contaminação bacteriana, a desinfecção do canal radicular e a presença de inflamação influenciaram nas propriedades de cementogênese do MTA. Estudos adicionais *in vivo*, como ensaios clínicos bem desenhados necessitam ser implementados a fim de elaborar revisões sistemáticas e meta-análises acerca das interações biológicas e moleculares do MTA com o periodonto (NAIK; PUDAKALKATTI; HATTARKI, 2014).

Em razão das limitações do MTA, como a dificuldade de manipulação, a reação lenta de presa, que dura aproximadamente 3 horas, a presença de elementos tóxicos em sua composição, a possibilidade de reabsorção do material antes da ocorrência do reparo, principalmente nos casos em que uma contaminação pode tornar o ambiente demasiadamente ácido, e o alto custo, novos materiais têm sido formulados como o RetroMTA<sup>®</sup> (BioMTA, Seoul, Korea) e o Biodentine<sup>™</sup> (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França).

O RetroMTA<sup>®</sup> foi recentemente introduzido no mercado como um novo material biocerâmico proposto para uso em aplicações endodônticas semelhantes ao MTA (capeamento pulpar, perfuração ou reabsorção radicular, apexificação e cirurgia apical). No entanto, ao contrário de MTA, este material não contém cimento Portland, é incluído zircônia de cálcio hidráulico como um agente radiopaco. De acordo com o fabricante, RetroMTA<sup>®</sup> é ideal para a reparação estética, uma vez que não tem nenhuma descoloração e tem endurecimento rápido (presa inicial de 150 segundos), o que seria benéfico considerando o ambiente úmido da cavidade oral (SOUZA et al., 2015).

O Biodentine™ foi desenvolvido na França em 2009, baseado na composição química do MTA e nos estudos sobre biocompatibilidade e materiais bioativos. Foi introduzido na Odontologia com a finalidade de substituir dentina em capeamentos pulpare, pulpotomias e restaurações posteriores (KOUBI et al., 2013). Esse cimento bioativo é composto basicamente por silicato tricálcico, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de cálcio e óxido de zircônio. Este último age como radiopacificador de modo análogo ao óxido de bismuto no MTA. A parte líquida é composta por água, cloreto de cálcio e uma mistura de policarboxilato para acelerar o tempo de presa (LAURENT et al., 2008; BIODENTINE SCIENTIFIC FILE, 2010).

### 1.3 RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS EPS FÚNGICOS

Os principais parâmetros utilizados para a obtenção de EPSs fúngicos em meio de cultura são os macronutrientes (fonte de carbono e nitrogênio), e micronutrientes (vitaminas, sais minerais). Os fatores físico-químicos (pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação) devem acompanhar os nutricionais para que o crescimento e o metabolismo do fungo sejam favoráveis à secreção de EPS. Por isso, aperfeiçoar o processo de obtenção de qualquer metabólito microbiano é essencial para que o rendimento do mesmo seja favorável à sua aplicação (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Nem sempre as condições utilizadas geram resultados desejados, mas as características metabólicas dos fungos permitem explorá-las para maximizar o seu aproveitamento. Por isso, para cada processo existe a necessidade de manutenção das condições bióticas e abióticas, além do correto estágio de desenvolvimento fúngico, para a obtenção do máximo de produção do metabólito de interesse (PAPAGIANNI, 2004).

O cultivo *in vitro* é um dos procedimentos utilizados para que os microorganismos sintetizem e secretem moléculas de interesse. A síntese biológica é um recurso que facilita a obtenção de produtos que, por métodos químicos, seriam difíceis ou dispendiosos devido à complexidade dos precursores e catalisadores como as enzimas. Entretanto, o metabolismo deve estar integrado e coordenado para assegurar que os produtos sejam sintetizados em quantidades suficientes e não interfiram na manutenção do metabolismo e na vida do fungo (DOMINATO, 2017).

Alguns fatores são imprescindíveis na formação da biomassa fúngica e para secreção de polissacarídeos: (1) velocidade de agitação dos cultivos, que interfere na cinética e na transferência de calor. O movimento acelerado favorece a esporulação do micro-organismo com diminuição do crescimento celular, além de afetar a agregação micelial, formando *pellets*. Ao contrário, a baixa velocidade de agitação pode inibir a transmissão do calor e, conseqüentemente, retardar o crescimento micelial; (2) a concentração de inóculo é inversamente proporcional ao tamanho dos *pellets*, ou seja, os maiores podem ser obtidos com baixas concentrações de inóculo; (3) as concentrações de íons H<sup>+</sup> presentes no meio de cultivo afetam a função da membrana celular, a morfologia da célula, a solubilidade dos sais, a ionização dos substratos, a captação de vários nutrientes, a biossíntese de produtos e a formação dos sedimentos celulares. A manutenção do pH ideal também favorece o processo de cultivo *in vitro*, tanto na obtenção da quantidade e formato da massa celular, como na produção de biopolímeros e na reologia do caldo (GRIMM et al., 2005).

Os EPSs fúngicos são recuperados do meio de cultivo através de centrifugação, filtração, agentes precipitantes, diálise e liofilização. As centrifugações são utilizadas para separar as células, sedimentando-as do EPS solúvel presente no meio extracelular. Também são utilizadas para auxiliar na precipitação posterior dos EPS presentes no sobrenadante, após tratamento com agentes precipitantes (BARBOSA et al., 2004).

O etanol é o agente precipitante mais comum, embora isopropanol ou acetonas podem também ser utilizados. A relação de etanol e sobrenadante do meio de cultivo mais utilizada tem sido 2:1 (v/v). Porém um, três ou até mesmo quatro vezes o volume de etanol também têm sido empregados (BAE et al., 2000; MAZIERO; CAVAZZONI; BONONI, 2009).

Os EPSs fúngicos têm sido quantificados através de pesagem após liofilização, pela quantificação de seus açúcares redutores após digestão enzimática ou determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (BAE et al., 2000; BARBOSA et al., 2004). O método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) é utilizado para detectar e quantificar a concentração de carboidratos totais em cada amostra. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela, e cuja leitura pode ser realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

#### 1.4 FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae, da ordem Magnoliales, abrange mais de 135 gêneros e, aproximadamente 2.500 espécies, no Brasil podemos encontrar cerca de 250 espécies distribuídas em 33 gêneros, mas apenas cinco gêneros (*Annona*, *Rollinia*, *Uvaria*, *Melodorum* e *Asimina*) são capazes de produzir frutos comestíveis. Os mais conhecidos são: graviola (*Annona muricata*), atemóia (cruzamento de *Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.), pinheira ou fruta-pinha (*Annona reticulata*), fruta-do-conde ou ata (*Annona coriácea*), biribá (*Rollinia mucosa*) e cherimóia (*Annona cherimola*) (Figura 1A, B e C) (LOBÃO, MELLO-SILVA e FORZZA, 2012; MASS et al., 2013).

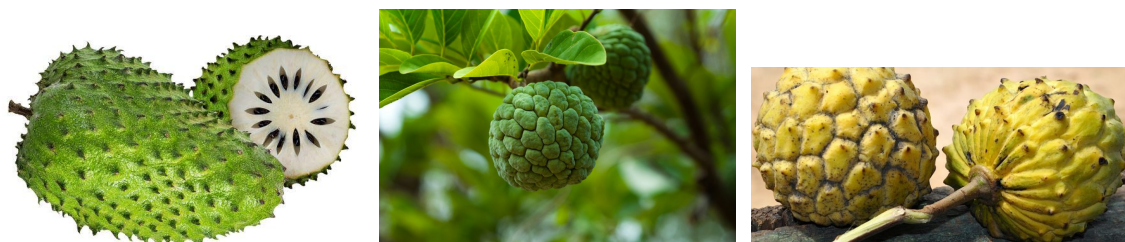


Figura 1: A - *Annona muricata*; B - *Annona coriácea*; C - *Rollinia mucosa*  
 Fonte: [www.frutíferas.com.br](http://www.frutíferas.com.br)

As anonáceas são potenciais produtoras de substâncias com atividades biológicas, tais como: anti-cancerígena, antiprotozoários (leishmanicida e antimalárica) e inseticida. Estas atividades são atribuídas a dois importantes grupos de moléculas: as acetogeninas e os alcalóides. As acetogeninas apresentam diversas atividades biológicas como, por exemplo, antitumoral, imunossupressor, pesticida, antiprotozoário, anti-helmíntico e antimicrobiano, o que faz deste constituinte bioativo alvo de diversas pesquisas (BERMEJO et al., 2005; FAGUNDES et al., 2005).

Ainda outros metabólitos secundários como flavonóides, alcaloides, óleos essenciais, lactonas e cumarinas demonstram relevância em termos de moléculas biologicamente ativas. Estudos de suas atividades já foram descritos frente à microorganismos como bactérias, fungos e protozoários (COSTA et al., 2010; TASCO, 2016).

O gênero *Annona* é constituído por 65 espécies, que ocorrem principalmente na América do Sul e com poucas espécies no México, Caribe e América Central



(LEBOUF et al., 1982). Existem poucos relatos de investigações fitoquímicas sobre este gênero quando comparado com outros gêneros da família (*Annona*, por exemplo), o que torna o seu estudo relevante (KUO et al., 2001). Resultados obtidos de *R. laurifolia* levou ao isolamento de três acetogeninas já descritas em outros gêneros de Annonaceae, a uvariamicina-I, a solamina e a gonionenina, mas relatadas pela primeira vez em *Rollinia* (NASCIMENTO et al., 2003).

### 1.5 O GÊNERO *Pestalotiopsis* sp.

O gênero *Pestalotiopsis* pertence à ordem Melaconiales, família *Amphisphariaceae* que caracteriza-se pela presença de conidióforo dentro do corpo de frutificação denominado acérvulo. Os conídios apresentam em geral cinco células, sendo três medianas de coloração marrom e duas células hialinas (apical e basal), com dois ou mais apêndices apicais (JEEWON et al., 2002).

Os esporos (conídios) de *Pestalotiopsis* são de fácil disseminação, e penetram nos tecidos vegetais por ferimentos ou aberturas naturais, infectando os mais diversos hospedeiros vegetais. São caracterizados por apresentarem cinco células, com quatro euseptos (septos verdadeiros), com as três células medianas uniformemente escuras ou de coloração desuniforme, e com as células das extremidades (apical e basal) hialinas. Apêndices (sétulas) simples ou ramificados saem da célula apical e um apêndice, geralmente simples, forma-se na extremidade da célula basal. A classificação com base morfológica, tradicionalmente empregada para identificar as espécies deste gênero é problemática, porque características morfológicas tendem a variar dentro das espécies (KARAKAYA, 2001).

A história taxonômica e a complexidade do gênero *Pestalotiopsis* e afins, têm sido debatidas por mais de meio século (SEIFERT et al., 2011). A distribuição geográfica ubíqua do gênero sugere um papel importante deste fungo no ecossistema florestal, além de importância biotecnológica já comprovada (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

No Brasil, as espécies de *Pestalotiopsis* estão registradas em quase todos os estados, principalmente em São Paulo (19%), Distrito Federal (11%, nos estados de Minas Gerais e Bahia com 9% e os estados de Maranhão, Pernambuco, Rio de Janeiro com 8%, estes detêm a maior quantidade de espécies de *Pestalotiopsis* relatadas. Considerado um fungo cosmopolita, representantes do gênero podem ser

encontrados como sapróbios, fitopatogênicos e endofíticos (KRUSCHEWSKY; LUZ; BEZERRA, 2014).

O estudo da variabilidade genética de fungos do gênero *Pestalotiopsis* tem aumentado em virtude de sua ampla distribuição geográfica, ora presente como parasita de plantas, ora como endofítico ou como saprófito de outras (HYDE et al., 2011). Além disso, esse gênero tem se destacado na produção de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (LOU;XING;DENG, 2012).

Entre as espécies registradas no Brasil, o *P. versicolor* é a predominante, não só por ser de ampla distribuição, mas talvez também por ser uma das mais citadas e ilustradas na literatura mundial sobre o gênero (KRUSCHEWSKY; LUZ; BEZERRA, 2014).

### **1.5.1 A importância biotecnológica do gênero *Pestalotiopsis***

O gênero *Pestalotiopsis* tem demonstrado ser importante fonte de metabólitos secundários bioativos, com amplo espectro de atividade biológica, com aplicação na agricultura, na medicina e na indústria. Dentre eles, destacam-se os sesquiterpenos, os compostos nitrogenados, os quais podem atuar no tratamento de desordens inflamatórias crônicas ou de doenças auto-imunes, assim como no tratamento da AIDS, cumarínicos, derivados da quinona e semiquinona, compostos enólicos, etc. Até a presente data, mais de 196 metabólitos diferentes foram isolados e caracterizados a partir de espécies de *Pestalotiopsis sp.* (YANG;ZHANG;LUO, 2012).

A partir de culturas de *P. microspora*, foi possível isolar, na década de 90, uma substância antitumoral, com atividade citotóxica, muito utilizada no combate ao câncer, o diterpenóide taxol (STROBEL et al., 1996). Essa descoberta foi notadamente importante do ponto de vista biotecnológico e tecnológico, pois até o ano de 2004, a única fonte de extração de taxol era a casca do tronco de *Taxus brevifolia*, sendo necessárias cascas de mais de mil árvores, cada uma com no mínimo 100 anos de idade, para ser obtido 1 kg de taxol (KRUSCHEWSKY; LUZ; BEZERRA, 2014).

Com essa descoberta, tornou-se possível a produção desse importante fármaco de maneira mais eficiente e menos dispendiosa, minimizando a ameaça de extinção de algumas espécies vegetais coletadas para a extração deste composto e

seus precursores. Esta droga anticâncer, produzida por este fungo, possui alto valor internacional e movimenta milhões de dólares em todo o mundo, o que exemplifica muito bem o potencial dos metabólitos secundários do gênero *Pestalotiopsis* e como pode ser útil social e economicamente (STROBEL et al., 2002; PROKSCH et al., 2011). Esse fármaco interfere na multiplicação de células cancerosas, reduzindo ou interrompendo o seu crescimento e disseminação, é utilizado para o tratamento do câncer de mama, pulmão e ovário (SPECIAN et al., 2014).

Embora vários organismos tenham demonstrado a capacidade de degradar eficientemente o polímero sintético de poliéster-poliuretano, plástico usado largamente na indústria, em suspensões líquidas e sólidas, atividade considerável foi observada entre vários isolados do gênero *Pestalotiopsis*. Dois isolados de fungos endofíticos da Floresta Amazônica Equatoriana (*P. microspora*) foram capazes de crescer exclusivamente no supracitado polímero, como única fonte de carbono, sob condições aeróbicas e anaeróbicas. A caracterização molecular desta atividade sugeriu que uma poliuretanase, a enzima serina hidrolase seja responsável pela degradação do polímero, constituindo tais fungos endofíticos uma fonte útil da biodiversidade com aplicação potencial no processo de bioremediação, no qual organismos vivos, como plantas ou microrganismos, podem ser usados para remoção ou redução das concentrações de substâncias poluentes em ambientes onde se encontram (RUSSELL et al., 2011; BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2012).

Ainda existem relatos da produção de metabólitos secundários com aplicabilidades medicinais e biotecnológicas como um polissacarídeo com ação antidiabética; ácido ambuico (agente antifúngico), pestacina e isopestacina (antimicrobiana e antioxidante), isoladas de extratos de *P. microspora*, da planta *Terminalia morobensis* de Papua-Nova Guiné, com propriedades antifúngicas e antioxidantes (LI et al., 2001; JEEWON; LIEW; HYDE, 2002).

Netala et al. (2016) isolaram uma cepa do fungo endofítico *P. microspora*, das folhas da *Gymnema sylvestre* e, usando filtrado da cultura aquosa deste fungo, sintetizaram nanopartículas de prata, estáveis e biocompatíveis, as quais exibiram efeito antioxidante e atividade anticâncer. Os resultados dos estudos de citotoxicidade demonstraram que as tais partículas sintetizadas podem ser usadas como agentes anticâncer, sendo efetivas no tratamento de carcinoma ovariano, adenocarcinoma hepático e carcinoma de próstata.

A habilidade de produzir metabólitos secundários antes observados apenas em plantas, demonstra a importância da inter-relação da planta com o fungo hospedeiro e, por conta disso se faz necessário uma melhor compreensão de como esse processo acontece e como tal fato afeta a biologia desses microrganismos (BANHOS, 2016).

Sabe-se que novos compostos bioativos a partir de espécies do *Pestalotiopsis sp* ainda serão descobertos, uma vez que até agora um número relativamente pequeno de espécies deste fungo tem sido quimicamente investigado (KRUSCHEWSKY;LUZ;BEZERRA, 2014).

A diversidade de compostos produzidos por fungos desse gênero demonstra como esse gênero é rico do ponto de vista de seu metabolismo secundário, o que o coloca como uma fonte de recursos biológicos importantes para estudos relacionadas a busca de novos fármacos (BANHOS, 2016).

## 1.6 ELETROFIAÇÃO DE MEMBRANA FUNCIONAL

Os materiais compósitos são aqueles constituídos de fases diferentes que são separadas por uma interface, com propriedades químicas e/ou físicas distintas, onde a combinação destas características proporciona a obtenção de um novo material, que apresenta uma mescla destas propriedades, a qual não seria possível encontrar em materiais convencionais. A aplicação da nanotecnologia, associada aos materiais compósitos, permite o desenvolvimento de novos materiais com melhores propriedades em relação aos já existentes (HARADA, 2014).

Estes compósitos, quando usados em contato com sistemas biológicos, são chamados de biomateriais e o seu estudo envolve diversos aspectos de diferentes ciências como a medicina, a biologia, a química e a ciência dos materiais. E para que haja interação entre os sistemas biológicos e os materiais, é necessário que este apresente características de biocompatibilidade, através uma baixa/inexistente reação biológica durante o uso.

Na área da saúde, encontramos biomateriais em dispositivos biomédicos (biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), nos materiais implantáveis (suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, válvulas cardíacas, lentes e implantes dentais), em dispositivos para a liberação de

medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), nos órgãos artificiais (coração e pele), nos curativos, dentre outros (PIRES et al., 2015).

As membranas poliméricas são extensamente utilizadas como biomateriais, apresentam como vantagens a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios), custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas. Os polímeros podem ser sintéticos (reações de polimerização), naturais (organismos vivos) e também quimicamente modificados. Os mais utilizados são os sintéticos devido a sua maior estabilidade durante o uso, por possuírem propriedades bem definidas e reproduzíveis, além do baixo custo. Os polímeros comumente usados na produção de biomateriais são: Polietileno (PE), Polipropileno (PP), Politereftalato de etileno (PET), Poliacido láctico-co-ácido glicólico (PLGA), Poli  $\epsilon$ -caprolactona (PCL), Policloreto de vinila (PVC), Polidimetilsiloxano (PDMS) e Poli 2-hidroxietilmetacrilato (poli HEMA). Os polímeros de origem biológica são abundantes e seus produtos de degradação são biocompatíveis e não-tóxicos, o que os torna seguros para utilização na constituição de biomateriais. Além disso, apresentam custo acessível e são obtidos de fontes renováveis, tendo destaque as proteínas (colágeno, elastina e fibroína da seda) e os polissacarídeos (quitosana, alginato, goma xantana, ácido hialurônico e pectina) (SELL et al., 2010).

Novas fronteiras na aplicação de polímeros têm sido recentemente investigadas, envolvendo a obtenção de novas moléculas precursoras, estruturas e arranjos moleculares em etapas de síntese e processamento. Entre os tópicos de grande interesse, o processamento de materiais poliméricos em tamanhos nanométricos ganha constante atenção em função das novas propriedades associadas, bem como das possíveis aplicações para tais materiais (RENEKER; YARIN, 2008; COSTA et al., 2012).

O interesse maior tem se voltado para as nanofibras ou nanofios, dado o grande número de possíveis aplicações científicas e tecnológicas, e o método que tem se mostrado promissor para a produção destas nanoestruturas é a eletrospinação. É um dos processos mais usuais, devido ao controle e alinhamento do diâmetro em escala nanométrica (COSTA et al., 2012).

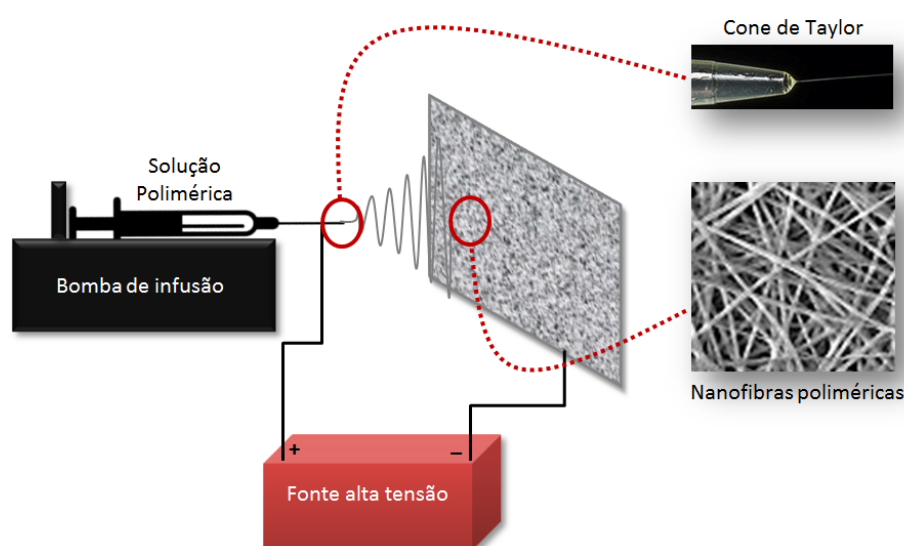
A nanofibra polimérica é um tipo de fio plástico na espessura nano ou micrométrica, composta por polímeros ou compostos poliméricos, sendo amplamente utilizada para regeneração tecidual e implantes, devido a sua alta

similaridade estrutural com a matriz extracelular, bem como a incorporação de medicamentos em polímeros biodegradáveis, facilitando seu uso em diversas áreas da medicina (LU et al., 2016).

Os materiais poliméricos podem ser obtidos por diversos métodos como injeção, extrusão, termoformagem e eletrofiação. Eletrofiação é um processo em que uma carga elétrica de alta tensão é usada para criar polímeros fibras de filamentos. Existem dois métodos usados para criar o polímero líquido utilizado na eletrofiação, podendo ser derretido a partir da sua forma sólida ou misturado com um solvente, a fim de formar uma solução de polímero.

A técnica de eletrofiação, descrita e patenteada por Cooley em 1902, consiste de um eletrodo, uma fonte de alta tensão, uma seringa com agulha e um coletor das fibras. A solução polimérica é depositada na seringa, um eletrodo é conectado à agulha da seringa e outro, à fonte (Figura 2). A solução começa a ser liberada quando a bomba de infusão é ligada. Quando o campo elétrico é alcançado, forma-se um cone (denominado cone de Taylor) na gota pendente da solução, originando um jato que, em contato com o ar, tem seu solvente evaporado, formando uma nanofibra polimérica, a qual é depositada sobre o coletor como uma manta (GUERRINI et al., 2009; SALLES et al., 2016).

Figura 2: Esquema do sistema de eletrofiação.



Fonte: Salles, 2016.

Vários são os parâmetros que influenciam no diâmetro e na formação de fibras neste processo; dentre eles estão: a concentração da solução, a distância entre a agulha e o coletor, a vazão de alimentação, a tensão elétrica aplicada, a temperatura e a umidade atmosférica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Produzir um cimento experimental a partir de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia para o uso em Odontologia.

### **2.2 Específicos**

- Selecionar linhagens microbianas fúngicas produtoras de exo e/ou polissacarídeos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a microrganismos patógenos da cavidade oral;
- Analisar o rendimento da linhagem selecionada, correlacionando a biomassa produzida com o tempo fisiológico de produção;
- Realizar ensaios físico-químicos dos exo e/ou polissacarídeos isolados;
- Testar o cimento experimental quanto a sua atividade antimicrobiana.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS

Neste estudo, foram utilizadas 21 linhagens cujos aspectos morfológicos indicavam pertencerem aos gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Xylaria*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* (Tabela 1). As cepas dos fungos endofíticos e aquáticos utilizadas foram reativadas das coleções do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LaBMicra/UFAM), da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas e do Laboratório de Genética Aplicada à Saúde e à Biotecnologia, da Universidade do Estado do Amazonas.

Tabela 1

Linhagens de fungos endofíticos e aquáticos selecionadas para o estudo

N°	Identificação coleção	Origem
264	1341	Endofítico
320	EjF1 2.2A	Endofítico
764	Me Fe 1.3	Endofítico
461	F40a	Endofítico
455	GhCg2 1.2	Endofítico
882	2.3 ISP2 T+I L1P3 COA18	Aquático
340	EJFlor 2 1.2A	Endofítico
84	Ansp Cg 1.1.3a	Endofítico
902	1.2 BDA A+TL2P1 COA26	Aquático
265	1598e	Endofítico
406	GhF1 1.2b	Endofítico
88	VrC 2.1.3 ISP2	Endofítico
334	EJFlor 2 1.2B	Endofítico
869	AJP 1.2.2 (1)	Endofítico
267	1334	Endofítico
590	Dfga 212 I+AT	Endofítico
341	EjC2 1.1B - F2	Endofítico
342	EjC2 1.1A - F1	Endofítico
345	EjC2 1.1A - F1B	Endofítico
314	EjC11.2-F1 BDA	Endofítico
325	EjC32.1B-F1	Endofítico

Para a reativação, realizada em cabine de segurança biológica, foram utilizadas placas de Petri com meio BDA (batata, dextrose e ágar) e antibiótico (Ampicilina 100 µ/mL), sendo semeados três fragmentos (tripontual), distribuídos na placa e posteriormente levados para estufa a 28 ± 1 °C para crescimento por 8 dias (Tabela 2).

Tabela 2  
Composição do meio de cultura BDA

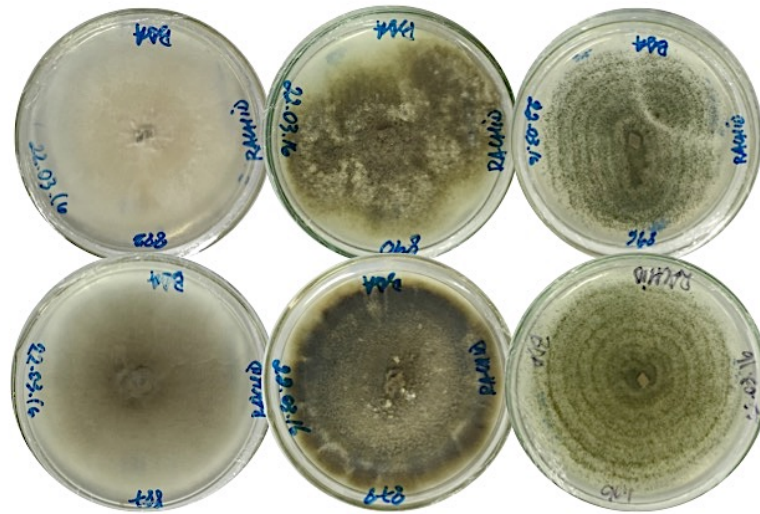
<b>Material</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Lote</b>
<b>Água destilada</b>	1000 mL	LaBMicra/UFAM	-
<b>Batata</b>	200 g	-	-
<b>Dextrose</b>	20 g	Biotec Reagentes Analíticos, LabMaster Ltda, São José dos Pinhais, PR	45881
<b>Ágar microbiológico</b>	15 g	Kasvi, Kasvi Imp. e Distrib. de Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, PR	090817504

Decorrido este tempo, foi removido um único fragmento de cada micro-organismo e depositado no centro de placas de Petri (repique central) que continham meio de cultura BDA+L (batata, dextrose e ágar + levedura) (Tabela 3) e posteriormente levados para estufa a  $28 \pm 1$  °C para crescimento por 8 dias (Figura 3).

Tabela 3  
Composição do meio de cultura BDA + L para 1L

<b>Material</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Lote</b>
<b>Água destilada</b>	1000 mL	LaBMicra/UFAM	-
<b>Batata</b>	200 g	-	-
<b>Dextrose</b>	20 g	Biotec Reagentes Analíticos, LabMaster Ltda, São José dos Pinhais, PR	45881
<b>Extrato de levedura</b>	2 g	Kasvi, Kasvi Imp. e Distribuib. de Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, PR	102116502
<b>Ágar microbiológico</b>	15 g	Kasvi, Kasvi Imp. e Distrib. de Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, PR	090817504

Figura 3: Placas de Petri com BDA+L e inóculo fúngico central



### 3.1.1. Manutenção das cepas

Todos os 21 gêneros de linhagens endofíticas e aquáticas foram cultivados em triplicata. A manutenção das linhagens sexuadas foi realizada em cabine de segurança biológica, usando placa de Petri contendo meio BDA+L, onde foram colocados 4 palitos estéreis equidistantes. Da placa-mãe, retirou-se 6 fragmentos com bisturi que foram dispostos entre os palitos estéris na placa (Figura 4). Estes foram incubados por 8 dias a  $28 \pm 1$  °C. Os fungos assexuados tiveram seus conídios estimados no número 6 da escala de McFarland e foram preservados em glicerol e água a 20 %.

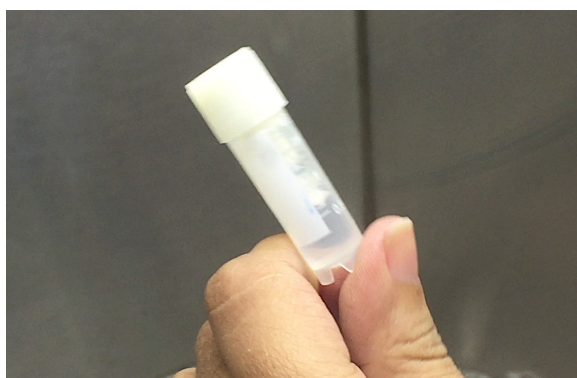
Figura 4: Método para conservação dos fungos sexuados - BDA+L e palitos.



Após período de crescimento na placa de Petri, foi feita a conservação em tubos Falcon de 15 mm, em glicerol a 20 %. Com bisturi, fez-se a remoção de um fragmento, envolvendo um palito com margem de aproximadamente 1 mm em toda sua extensão, e inseriu-se no tubo. O tubo ficou armazenado a 4° C, o que permitiu a viabilidade do fungo por vários meses (4 a 6 meses).

Para o método de conservação em glicerol a 20%, foram feitos cortes com bisturi no meio contendo o fungo a ser preservado, de aproximadamente 5 x 5 cm. Os fragmentos (média de 8 a 10 fragmentos) foram removidos e inseridos em tubos criogênicos estéreis de 2 mL contendo 1,5 mL de água e glicerol (8:2). Em seguida, os frascos foram lacrados com Parafilm M® (Bemis Company, Wisconsin - USA) e levados ao freezer para conservação (Figura 5).

Figura 5: Conservado de *Trichoderma sp* pronto.



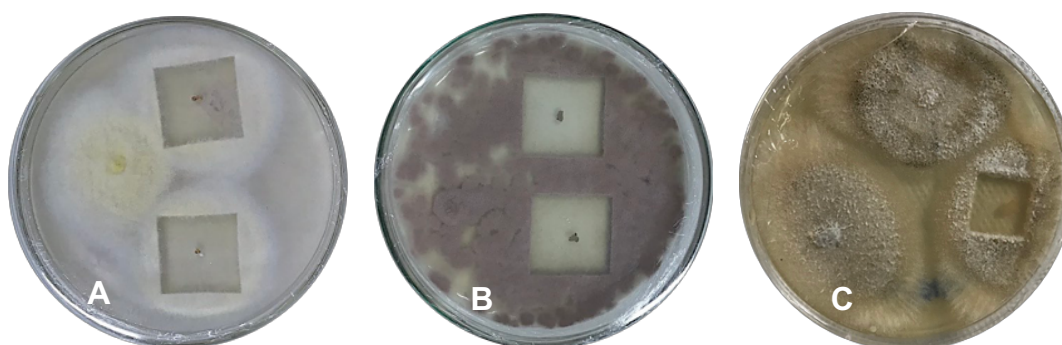
### 3.1.2. Caracterização macro e micromorfológica

As linhagens utilizadas neste trabalho tiveram seu gênero confirmado pela caracterização taxonômica pelas análises das estruturas macro e micromorfológicas, através de placas de Petri cultivadas em meio BDA. Para caracterização macroscópica, foram consideradas características das culturas como: cor, textura, bordas, topografia, pigmento difuso, as quais foram confrontadas com dados da literatura.

Para as análises micromorfológicas, foram feitos microcultivos em placas de Petri com meio BDA, onde foram repicados três fragmentos de cada colônia isolada, dispostos equidistantes e sobre dois destes, foram colocadas duas lamínulas

esterilizadas (18 X 18 mm). As placas foram mantidas em estufa a  $28 \pm 1$  °C, por um período de 3 a 5 dias; em seguida, as lamínulas foram transferidas para lâminas de microscopia e coradas com Lactofenol azul de algodão (Figuras 6A, B e C).

Figura 6: A, B e C - Microcultivos em placas de Petri com meio BDA dos fungos 461, 455 e 84.



### 3.1.3. Cultivo fúngico

Para cada gênero, foram preparados 4 frascos de Erlenmeyers de 1L e preenchidos com 300 mL de meio de cultura BDA + L (Tabela 4), sendo uma triplicata e um controle (meio de cultura sem inóculo). Todos os frascos contendo o meio foram autoclavados a 121° C e 1 atm., durante 15 minutos.

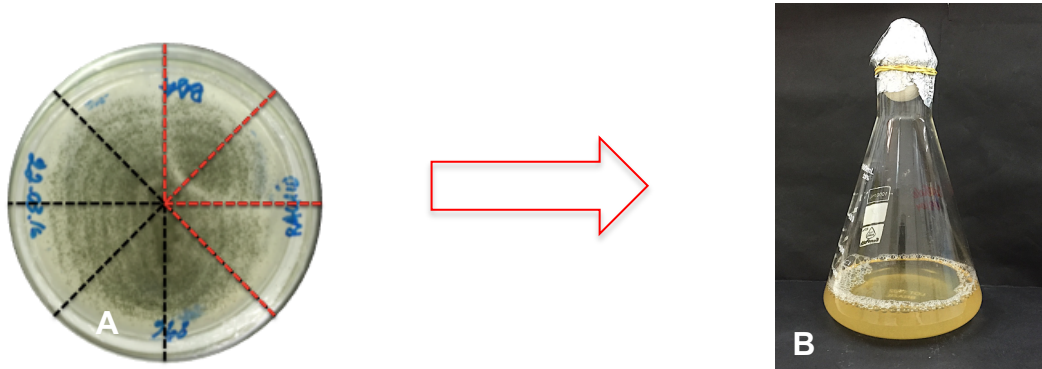
Tabela 4  
Composição do meio de cultura BDL para 1 L.

Material	Quantidade	Fabricante	Lote
Água destilada	1000 mL	LaBMicra/UFAM	-
Batata	200 g	-	-
Dextrose	20 g	Biotec Reagentes Analíticos, LabMaster Ltda, São José dos Pinhais, PR	45881
Extrato de levedura	2g	Kasvi, Kasvi Imp. e Distribuib. de Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, PR	102116502

Uma placa de Petri, contendo cultura fúngica pura, foi dividida em 8 partes iguais e inoculada em um Erlenmeyer com meio BDL estéril, na proporção de 1 parte para cada 100 mL de meio, ou seja, cada frasco contendo 300 mL recebeu três

partes do meio com fungo (Figuras 7 A e B).

Figura 7: A- Proporção de inóculos (1:100 mL); B - Meio de crescimento BDL.



Os frascos foram acondicionados em armários, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, mantidos em modo estático durante a fase de crescimento fúngico. As amostras foram retiradas de acordo com o desenvolvimento fisiológico de cada microrganismo, variando de 21 a 28 dias (Figura 8), para que fossem retirados durante a fase estacionária de crescimento e se evitasse a fase de catálise.

Figura 8: Crescimento do fungo *Trichoderma sp.* em meio BDL após 21 dias.



### 3.1.4. Obtenção dos metabólitos fúngicos

Decorrido o tempo necessário para o crescimento em meio líquido (BDL), o micélio foi separado por filtração a vácuo em papel Whatman® nº4 (Sigma-Aldrich



Co., Missouri - EUA) em conjunto com funil de Büchner (Indústria de Porcelana Técnica Chiarotti Ltda, Mauá - SP) e Kitassato (Laborglas, São Paulo - SP), em cabine de segurança biológica (Figuras 9 A e B).

Figura 9: A- Separação do meio líquido por filtração a vácuo em cabine de segurança biológica; B - Micélio separado.



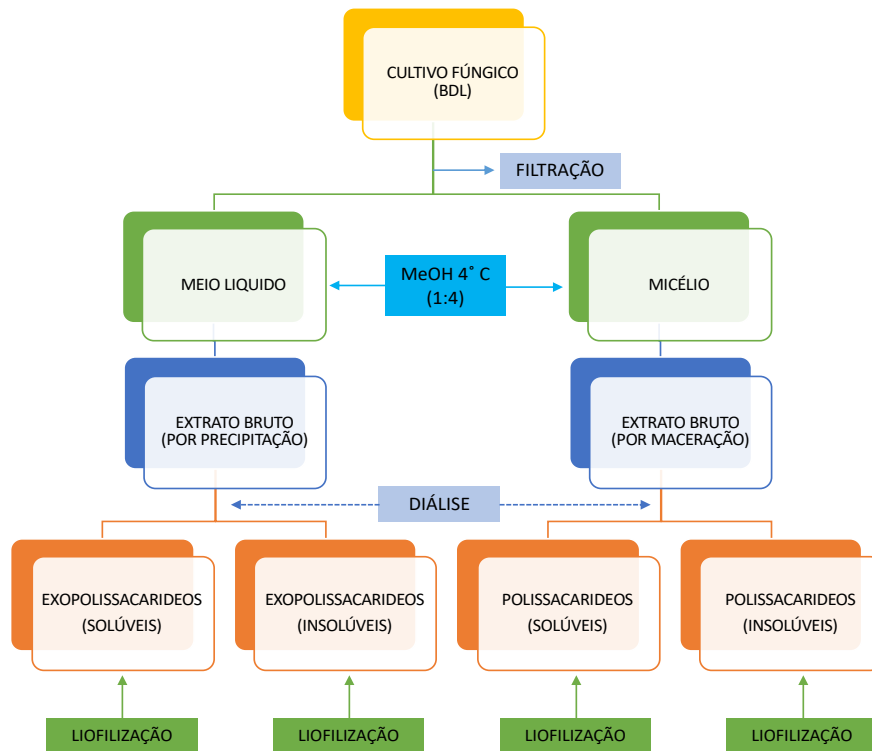
O caldo do cultivo de cada triplicata foi transferido para frascos âmbar estéreis e adicionado metanol resfriado a 4° C na proporção de 1:4 (v/v), sendo em seguida, mantido por 48h sob refrigeração, para precipitação dos exopolissacarídeos (EPS), seguindo o protocolo utilizado no LaBMicra/UFAM para os sobrenadantes mais viscosos.

Ao micélio resultante da filtração que ficou no Erlenmeyer, foi adicionado metanol até cobri-lo, sendo deixado para macerar por um período de 48 h em temperatura ambiente. Posteriormente, foi filtrado a vácuo e guardado em frascos estéreis. Após a primeira filtração do macerado do micélio, foi adicionado mais metanol ao Erlenmeyer e repetida a filtração após 24hs. Ao final, os filtrados correspondentes a cada fungo foram reunidos em um único frasco, sendo adicionado metanol na proporção de 1:4 (meio líquido/metanol) e armazenado sob refrigeração. Em todos os meios de cultura, procedeu-se o mesmo protocolo.

Foram separados 100 mL do meio fermentado e o mesmo volume do filtrado do micélio. Em seguida, foram acondicionados em frascos plásticos estéreis e centrifugados a 12.000 rotações por 10 minutos em centrífuga Hitachi CR21GIII High Speed Refrigerated Centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd. Japan).

Após cada centrifugação, os frascos foram levados à cabine de segurança biológica, para filtração a vácuo, utilizando o sistema de membrana de polietersulfônica (PES), com tamanho de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , a fim de separar os paletes (parte insolúvel) do sobrenadante. Cada sobrenadante foi recentrifugado por duas a três vezes e novamente filtrado. A parte solúvel e insolúvel resultantes foram separadas e congeladas para posteriores ensaios (Figura 10).

Figura 10: Protocolo de extração dos exo e polissacarídeos.



Os extratos restantes foram submetidos a rotaevaporador, com pressão reduzida, à temperatura de 40 °C e permaneceram em um dissecador até a completa eliminação do solvente. Em seguida, foram pesados e armazenados a - 4 °C para a realização dos testes antimicrobianos.



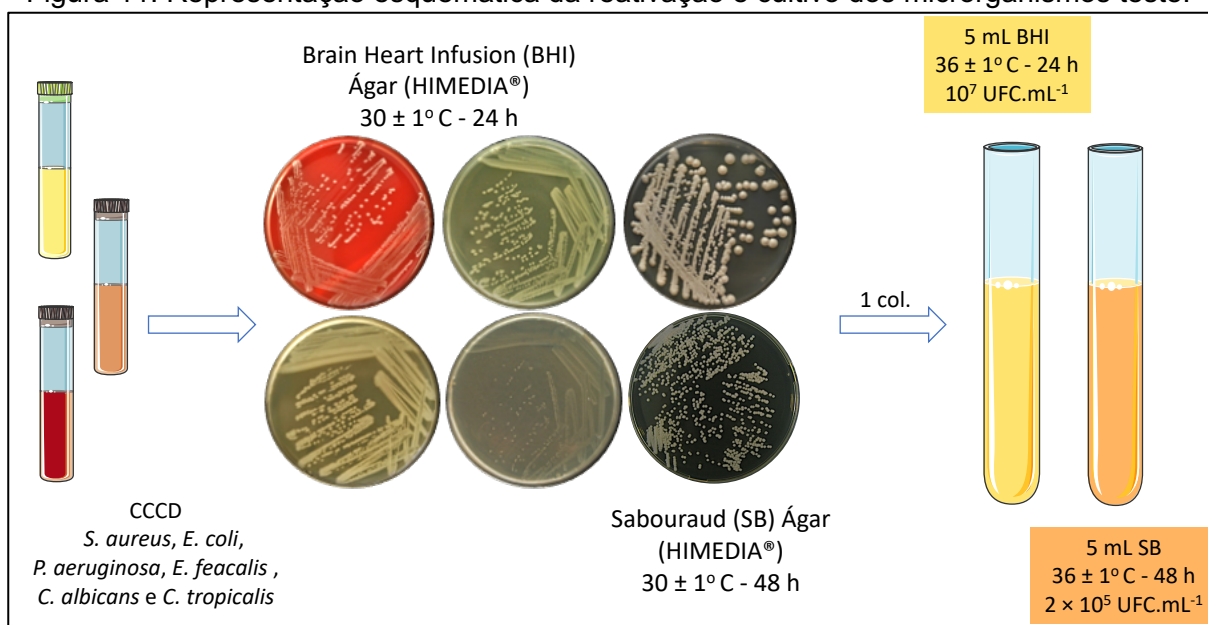
## 3.2. ENSAIOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

### 3.2.1. Reativação e cultivo dos microrganismos teste

Os microrganismos testados foram cepas adquiridas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Staphylococcus aureus* (S007), *Escherichia coli* (E004), *Pseudomonas aeruginosa* (P004), *Enterococcus faecalis* (E002), *Candida albicans* (CC001) e *Candida tropicalis* (CC002). As bactérias foram reativadas em Brain Heart Infusion (BHI) Ágar (HIMEDIA®) e as leveduras em Sabouraud (SB) Ágar (HIMEDIA®), mantidas a 30 °C por 24 horas e 48 horas, respectivamente.

Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI para bactérias e caldo SB para levedura; ambos foram mantidos a  $36 \pm 1$  °C, sendo as bactérias por 24 horas e as leveduras por 48 horas. A concentração de colônias utilizada no teste foi correspondente a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> para bactérias e  $2 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para leveduras, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002; 2003) (Figura 11).

Figura 11: Representação esquemática da reativação e cultivo dos microrganismos teste.



### 3.2.2 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas e solubilizadas na concentração de 2 mg/mL (solução-mãe) em dimetilsufóxido (DMSO) 10 % + água destilada autoclavada 90 %.

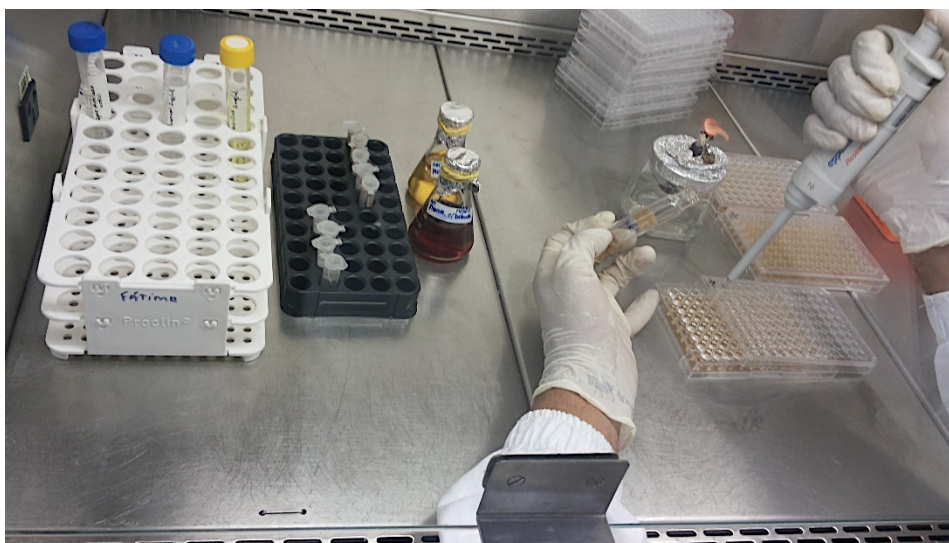
### 3.2.3 Preparo dos controles

O controle negativo foi realizado com a mesma solução que as amostras foram solubilizadas, DMSO 10 %. O controle positivo foi realizado com tetraciclina 2 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*; ampicilina 2 mg/mL para *S. aureus* e *E. faecalis*; e fluconazol 2 mg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

### 3.2.4 Determinação da atividade antimicrobiana – Ensaio de Microdiluição

Realizou-se uma triagem (*screening*) das amostras, para determinação da atividade antimicrobiana em placas de Elisa (96 poços). Foram adicionados em triplicata, 100  $\mu$ L do meio de cultura com concentração dobrada (2X), 100  $\mu$ L da solução-mãe da amostra preparada (2 mg/mL) e 10  $\mu$ L da suspensão de células do patógeno testado, de acordo com a metodologia descrita por Souza (2006) (Figura 12). Por fim, as placas de Elisa ficaram incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 24 h.

Figura 12: *Screening* das amostras para determinação da atividade antimicrobiana.

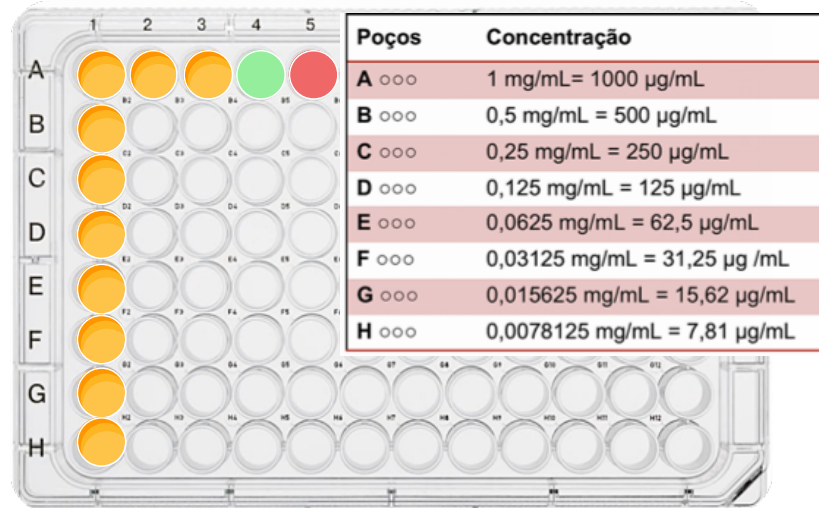


Após 24 h, colocou-se 10  $\mu$ L do revelador TTC (2,3,5 - cloreto de 2,3,5 - trifeniltetrazólio) a 2% nos poços com inóculo bacteriano. Havendo crescimento microbiano, o revelador muda a cor da solução para a cor vermelha.

Com os resultados positivos do *screening*, realizou-se o teste de diluições sucessivas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Na placa de Elisa, adicionou-se 100  $\mu$ L da amostra nos primeiros poços em triplicata (A1, A2, A3) e 100  $\mu$ L do meio de cultura 2x. O primeiro poço foi homogeneizado com a própria pipeta; deste retirou-se 100  $\mu$ L e inseriu-se no poço seguinte (B1, B2, B3),

realizando-se sucessivamente as diluições em cada poço (Figura 13). Para os controles positivo e negativo, realizou-se o mesmo procedimento de diluição.

Figura 13: Esquema das concentrações das diluições sucessivas nos poços.



Fonte: SOUZA (2006).

Acrescentou-se em todos os poços 10 µL do patógeno nas concentrações de células citadas no item 1. O experimento foi incubado a  $36 \pm 1$  °C por 24 h. Em seguida, foi adicionado 10 µL do revelador NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1% nos poços com inóculo leveduriforme e 10 µL de revelador TTC (2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) a 1 % nos poços com inóculo bacteriano. A leitura foi realizada visualmente, observando-se a alteração de cor proporcionada pela solução. Quando houve crescimento microbiano, o revelador NBT mudou a cor da solução para azul escuro e o TTC para a cor vermelha.

Como contra-prova, plaqueou-se 10 µL do experimento em meio sólido, somente para aqueles que mostraram ausência de crescimento microbiano.

### 3.3 PERFIL QUÍMICO E METABÓLICO DO *P. microspora*

Com base nos resultados de atividade biológica, foi realizada a avaliação do perfil químico *P. microspora*. Inóculos com 20 µL da suspensão de conídios na concentração de  $15 \times 10^8$  cels/mL<sup>-1</sup> (McFarland 5) foram aplicados em 21 erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio BDL. Em seguida, os frascos foram acondicionados em armários, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e mantidos em modo estático durante a fase de crescimento fúngico.

A cada cinco dias, do 5° ao 30° dia, foram retiradas as triplicatas correspondentes, os meios cultivados foram filtrados como descrito no item 3.1.4 e os micélios secos e pesados. Ao meio líquido cultivado, foi adicionado MeOH, rotaevaporado, seco e pesado.

Durante esse período, todas as amostras do meio cultivado foram avaliadas quanto à concentração de açúcar e pH. Esses parâmetros foram utilizados para avaliar as etapas de crescimento da linhagem e produção de metabólitos secundários em comparação à produção micelial.

Para a análise dos extratos por espectrometria de massas, cada amostra foi solubilizada em MeOH na concentração de 1,0 mg/mL-1 (solução-mãe), e dessa solução 20 µL foram diluídos em 1,0 mL de MeOH (solução de análise). Foi utilizado espectrômetro tipo *Ion-trap*, modelo LCQ fleet (Thermo Scientific), com scan de 100 a 500 m/z em modo positivo.

#### 3.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS EM ESCALA PREPARATIVA DO *P. microspora*

A linhagem foi cultivada em escala preparativa, em 66 Erlenmeyers de 1000 mL, para a etapa de isolamento e caracterização de compostos bioativos, como descrito no item 3.1.3.

Após o cultivo, o meio fermentado foi separado do micélio como descrito no item 3.1.4.; em seguida, ambos foram concentrados em rotaevaporador com pressão reduzida para eliminação do solvente, obtendo-se os extratos MLPm e MCPm, respectivamente.

Realizou-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos MLPm e MCPm, com o objetivo de separação dos componentes dos extratos e para estabelecer a identidade de compostos. Uma pequena alíquota de cada extrato bruto liofilizado foi ressuspensa em metanol grau HPLC e tinham a concentração 1 mg/mL. Para realizar esse ensaio, utilizou-se placas cromatográfica (SILICAGEL 60 F254 - MERCK) como fase estacionária e diferentes sistemas de fases móveis.

Foram traçadas duas linhas na placa de CCD, sendo uma inferior, onde as amostras foram aplicadas e outra superior, que marcava o limite para eluição da fase móvel. Os “spots” das amostras foram aplicados com auxílio de capilares de vidro mantendo-se 0,5 cm de distância entre elas. Em seguida, a placa foi transferida para uma cuba contendo a fase móvel, até sua completa eluição. Ao

término da percolação dos solventes, realizou-se a revelação por meios químicos e visualizada em luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

### 3.5 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DO CIMENTO EXPERIMENTAL

Para o preparo do cimento experimental, foi utilizado o cimento Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco 1g (Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina - PR) (Figura 14). A composição do MTA Branco e função de cada componente estão descritas na tabela 5.

Figura 14 – Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco.



Fonte – Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.

Tabela 5

Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco – Composição e Função

COMPONENTE	FÓRMULA QUÍMICA	FUNÇÃO
<b>Silicato Tricálcico</b>	$3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$	Resistência inicial e presa
<b>Silicato Dicálcico</b>	$2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$	Resistência tardia
<b>Aluminato Tricálcico</b>	$3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$	Resistência inicial e presa
<b>Cal livre</b>	$\text{CaO}$	Expansão e liberação de íons $\text{Ca}^{2+}$
<b>Óxido de bismuto</b>	$\text{Bi}_2\text{O}_3$	Radiopacidade

Fonte: Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.

A proporção recomendada pelo fabricante para a manipulação do material é de uma gota para uma colher-medida de pó. Com vistas a padronização do peso e

volume, inicialmente foram aferidas as quantidades de pó e líquido, e obtivemos o resultado aproximado: 1 colher-medida contém 150 mg e uma gota, 50  $\mu$ L.

Foram confeccionados 6 grupos de corpos de prova. No grupo 1 (Grupo Controle - GC), o MTA foi manipulado na proporção segundo a recomendação do fabricante de 1:1 (150 mg de pó com 50  $\mu$ L de água destilada estéril).

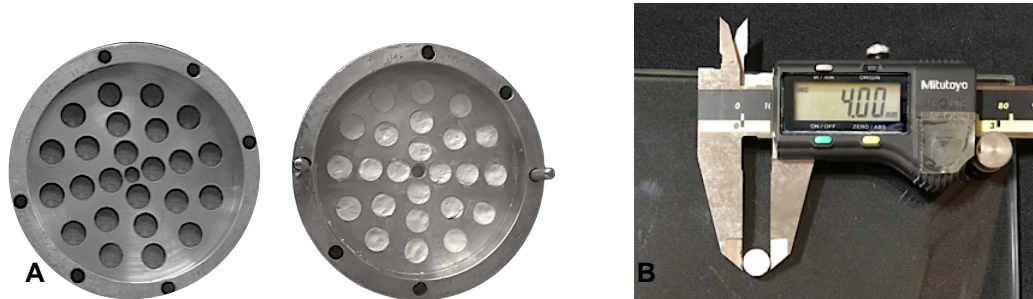
Nos grupos 2 a 6, parte do pó de MTA foi substituído em diferentes concentrações (G2 - 5%, G3 - 10%, G4 - 15%, G5 - 20% e G6 - 25%), pela fração extraída do cultivo do fungo *Pestalotiopsis microspora*, segundo a tabela abaixo (Tabela 6):

Tabela 6  
Materiais e composição dos corpos de prova.

Grupos	Composição	Quantidade pó	Quantidade líquido
<b>1 (GC)</b>	MTA Branco Angelus®	150 mg MTA	50 $\mu$ L
<b>2 (G2)</b>	MTA + 5 %	142,5 mg MTA + 7,5 mg <i>Pm</i>	50 $\mu$ L
<b>3 (G3)</b>	MTA + 10 %	135 mg MTA + 15,0 mg <i>Pm</i>	50 $\mu$ L
<b>4 (G4)</b>	MTA + 15 %	127,5 mg MTA + 22,5 mg <i>Pm</i>	50 $\mu$ L
<b>5 (G5)</b>	MTA + 20 %	120 mg MTA + 30 mg <i>Pm</i>	50 $\mu$ L
<b>6 (G6)</b>	MTA + 25 %	112,5 mg MTA + 37,5 mg <i>Pm</i>	50 $\mu$ L

Com a finalidade de padronizar todos os corpos de prova (CPs), o pó foi pesado em balança analítica (Adventurer AR2140 - Ohaus - Barueri – SP) e para o volume da água destilada, foi usada a micropipeta. O pó e o líquido foram dispostos em placa de vidro estéril e manipulados com espátula de aço estéril por 30 segundos. Em seguida, a mistura foi inserida em um dispositivo de aço inoxidável estéril, desenvolvido especialmente para obter CPs com as dimensões 4 mm de diâmetro por 2 mm de espessura (Figuras 15 A e B). Todas as etapas de manipulação e confecção dos CPs foram realizadas em cabine de segurança biológica.

Figura 15: A – Matriz de aço inoxidável usada para confecção dos corpos de prova; B - Dimensão do CP.



Após a inserção do material manipulado, a matriz ficou por 15 minutos em estufa umidificada tipo BOD a  $37 \pm 1$  °C, até a presa final do cimento. Em seguida, os CPs foram removidos, em cabine de segurança biológica, acondicionados em tubos Falcon estéreis e estocados à temperatura ambiente por 24 horas para que fosse atingindo a resistência mecânica de 40 Mpa (TORABINEJAD et al., 1995), sendo passível de ser manipulado sem fraturas.

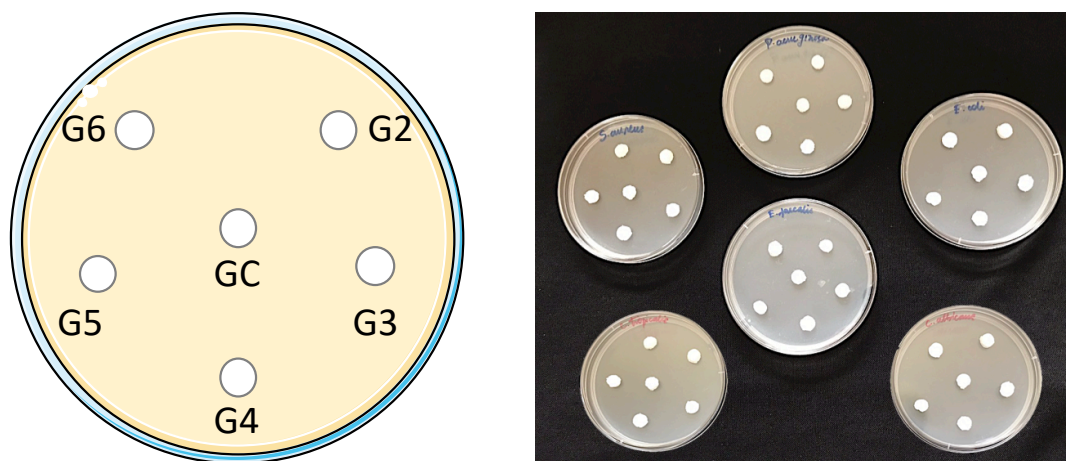
### 3.6 ENSAIOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS - CORPOS DE PROVA

Para o teste microbiológico, a reativação e o cultivo das cepas dos microrganismos testados foram realizados de acordo com o descrito no item 3.2.1.

Para a realização do teste de difusão, foram usadas placas de Petri estéreis com meio sólido ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, estriadas com os microrganismos para posterior colocação dos materiais a serem testados. Em cabine de segurança biológica, os CPs de cada grupo foram retirados dos tubos com pinças estéreis e dispostos em sentido horário nas placas, em triplicata. Em seguida, foram incubados a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas (Figura 16).



Figura 16: Esquema da disposição dos CPs na placa de Petri.



Com auxílio de um paquímetro digital (Mytutoyo Sul Americana Ltda., Suzano - SP), foi realizada a medição do diâmetro dos halos de inibição, tendo como referência os dois pontos mais externos do halo formado ao redor de cada poço. Todas as placas foram avaliadas em Lupa Estereoscópica Binocular a fim de avaliar ausência de crescimento microbiano na região correspondente aos halos.

Os dados foram avaliados pelos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney com o nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 ELETROFIAÇÃO DE MEMBRANA A PARTIR DE EXTRATO FÚNGICO DE *P. microspora*

O sistema para eletrofiação utilizado encontra-se no Laboratório de Pesquisa em Química Inorgânica (LPQI) do Departamento de Química da UFAM, e é composto por uma bomba de infusão volumétrica, com controle eletrônico programável (SAMTRONIC ST670, Samtronic Industria e Comercio LTDA, Bragança Paulista, SP, Brasil) que permite vazão a partir de 0,1 até 450 mL/h, fonte de tensão, cilindro motorizado para a coleta das fibras e ponto de ejeção (agulha hipodérmica) do polímero (Figura 17).



Figura 17: Sistema para Eletrofiação LPQI-UFAM.

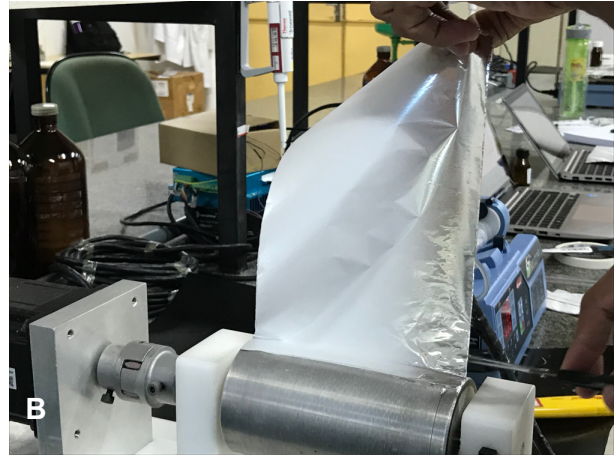
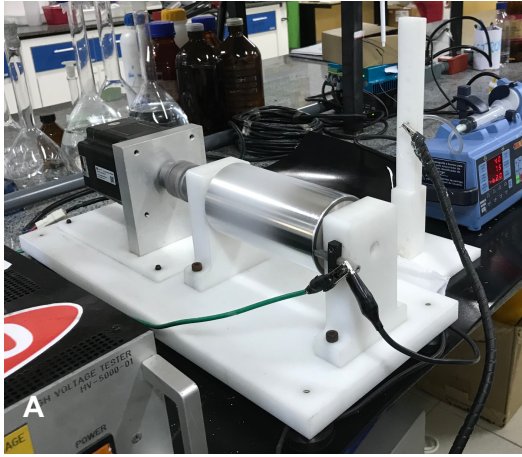


A solução utilizada foi preparada com os seguintes parâmetros: 5 mg de extrato do micélio de *P. microspora*, 1,7 g de acetato de celulose, 8,6 mL de acetona e 1,5 mL de água destilada. Foram usados um agitador magnético e, posteriormente, banho ultrassônico para a completa dissolução dos componentes.

Em seguida, a solução preparada foi acondicionada em uma seringa, posicionada na bomba de infusão ajustada para uma vazão de 4,0 mL/h, a tensão da fonte elétrica foi regulada em 15 kV e a placa coletora da fibra foi revestida com uma folha de papel alumínio, para facilitar a retirada do material depositado.

O polímero em solução passou através de uma agulha tipo Luer Lock no ponto de ejeção, sendo atraído pela folha de alumínio da placa coletora de fibras (Figuras 18A e B). O período de eletrofiação para a preparação da membrana foi de aproximadamente uma hora.

Figura 18: A. Eletrofiliação; B. Folha de alumínio com a membrana.

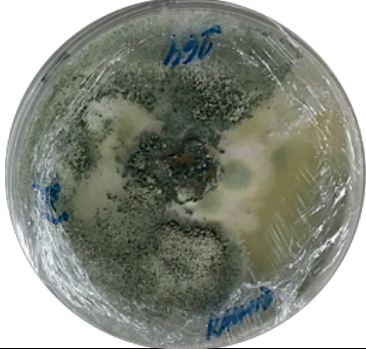
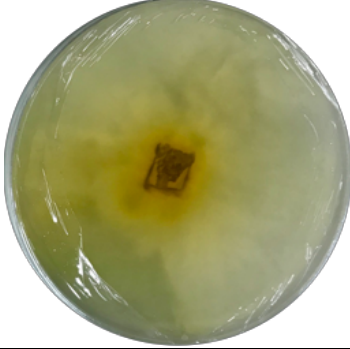
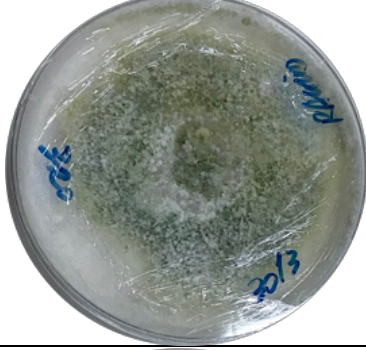
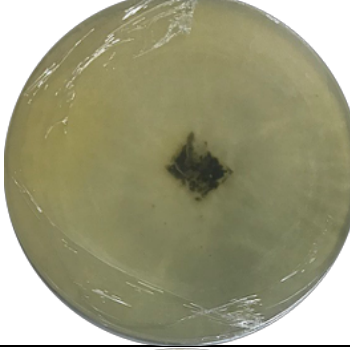
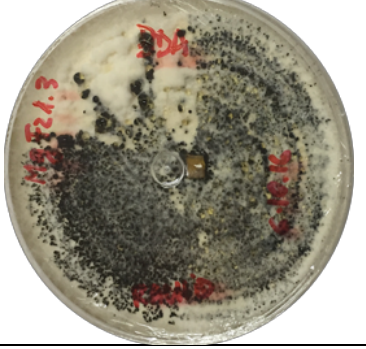
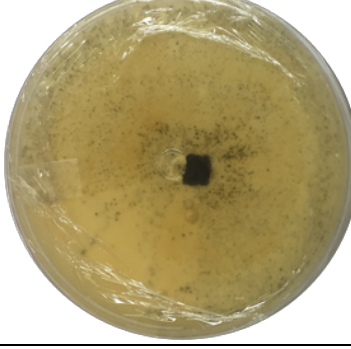


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO


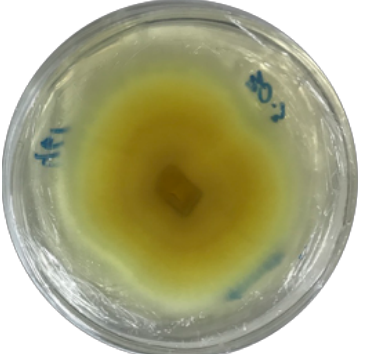

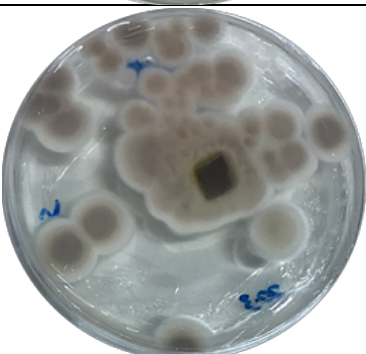
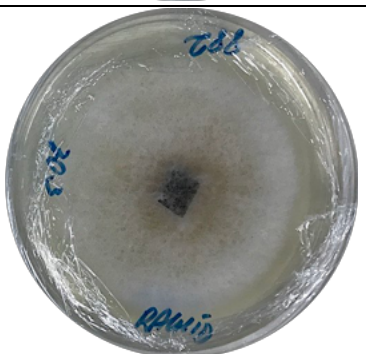
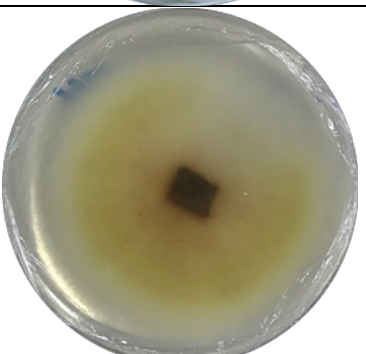

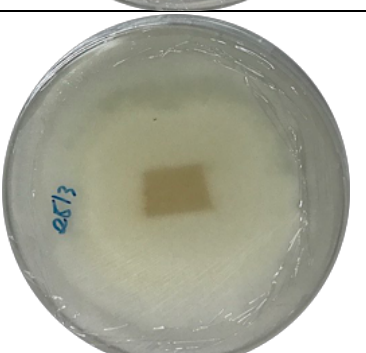


### 4.1 Características macro e micromorfológicas




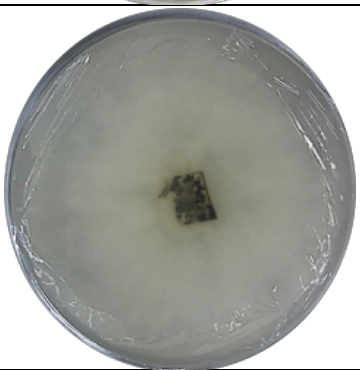

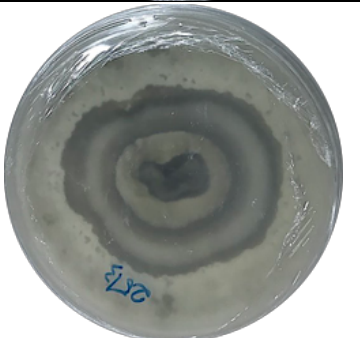

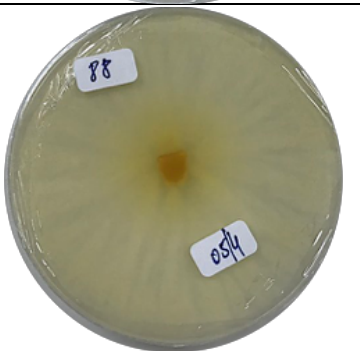

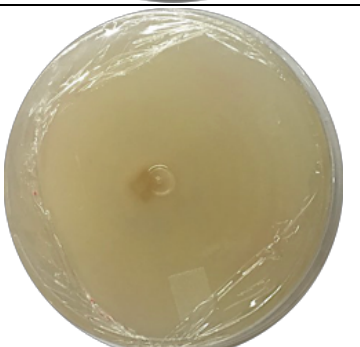
A análise macromorfológica dos cultivos em BDA mostrou características do micélio quanto à textura: aveludada, algodonosa, membranosa ou arenosa e a pigmentação variava entre verde, branca, marrom, amarela, preta ou cinza (Tabela 7).

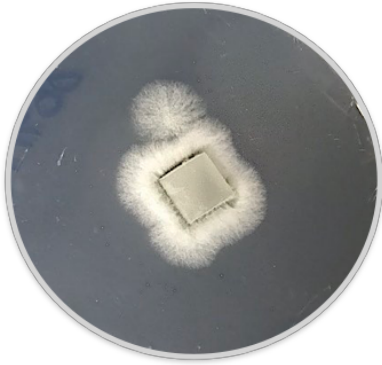
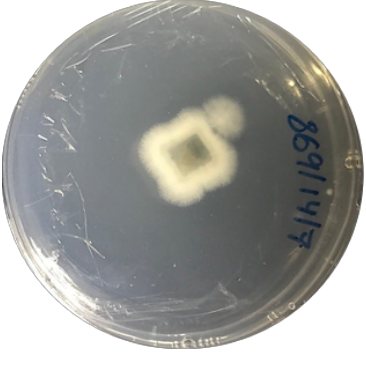

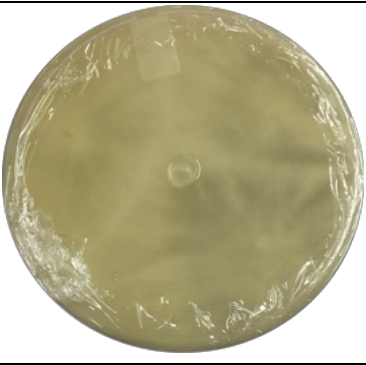
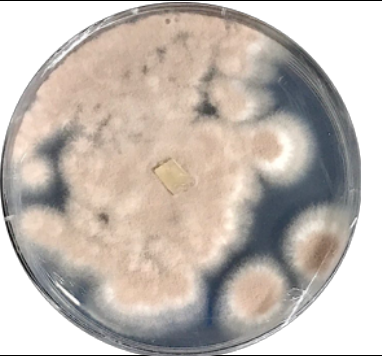



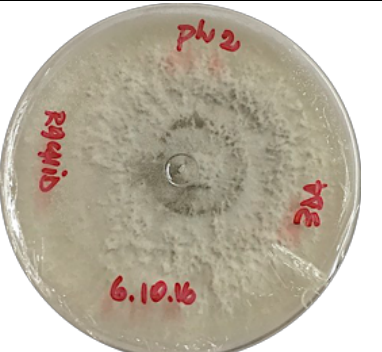

Tabela 7  
Características macroscópicas dos grupos dos fungos endofíticos e aquáticos.

Número	Código	Macroscopia frente	Macroscopia dorso
264	1341		
320	EjF1 2.2A		
764	MeFe 1.3		

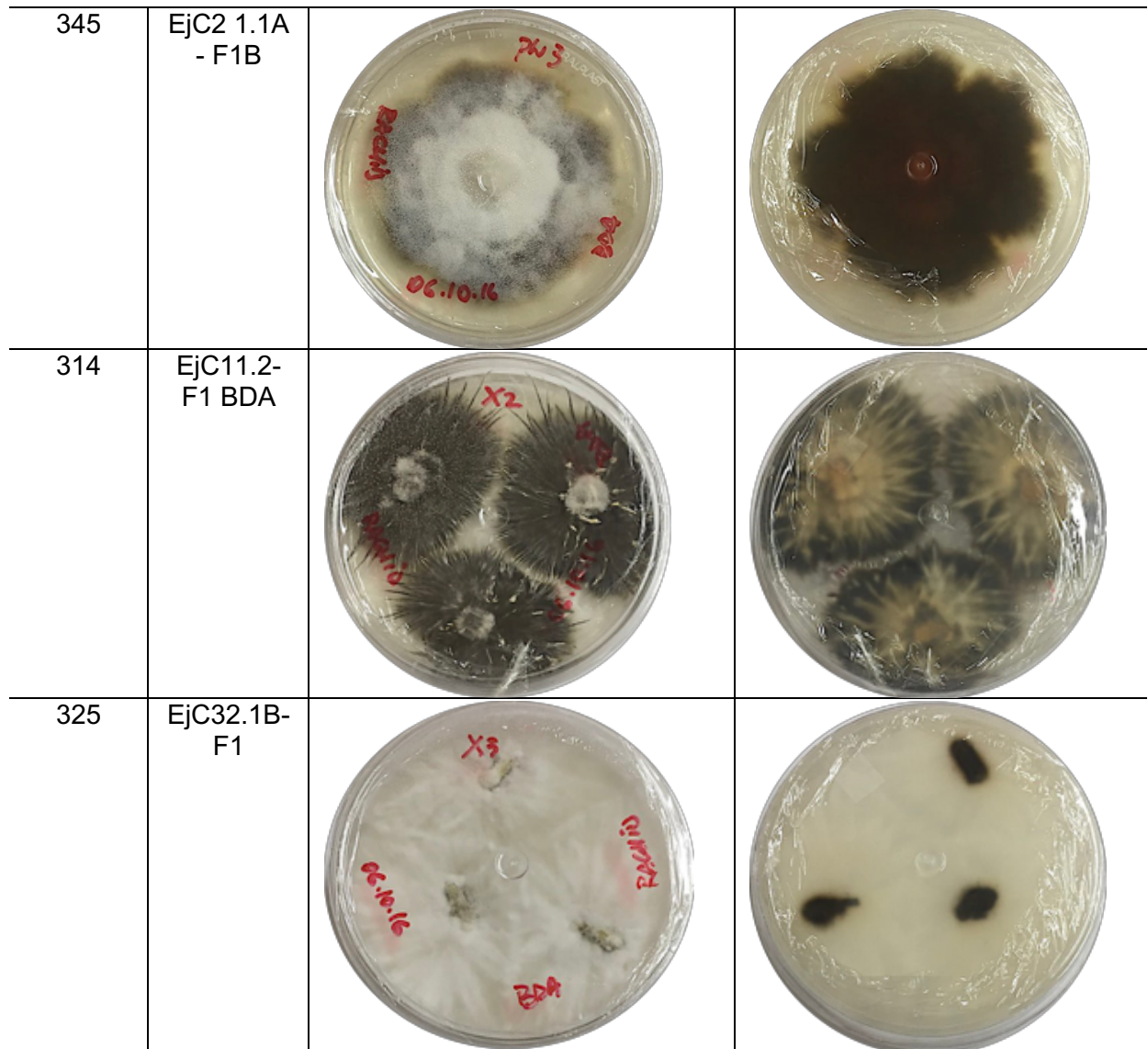


461	F40a		
455	GhCg2 1.2		
882	2.3 ISP2 T+I L1P3 COA 18		
340	EJFlor 2 1.2A		
84	AnspCg1 1.3a		

902	1.2 BDA A+TL2P1 COA 26		
265	1598e		
406	GhF1 1.2b		
88	VrC 2.1.3		
334	EJFlor 2 1.2B		

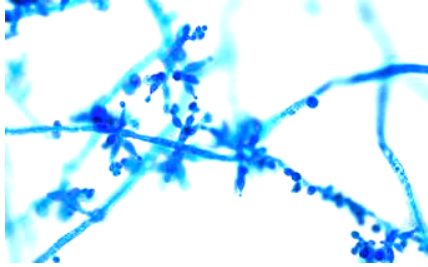
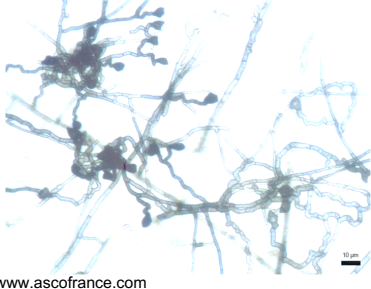
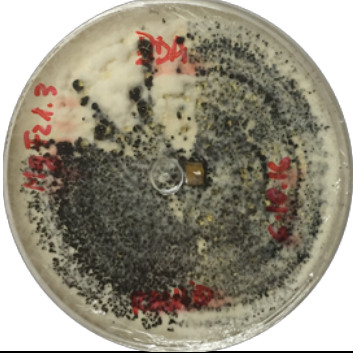
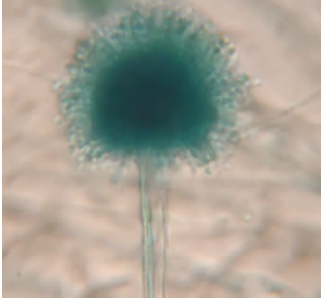
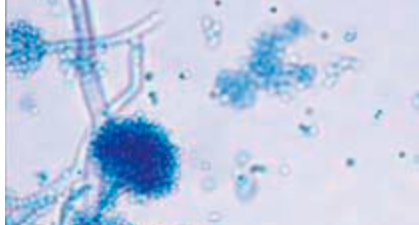
869	AJP 1.2.2 (1)		
267	1334		
590	DgCr2 2.1b		
341	EjC2 1.1B - F2		
342	EjC2 1.1A - F1		



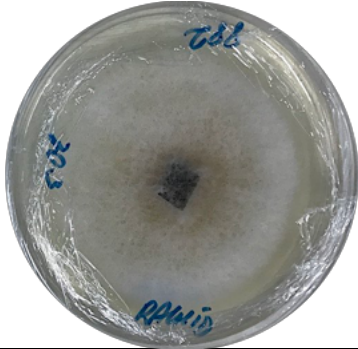

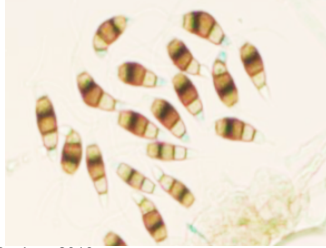





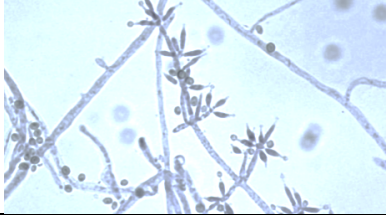
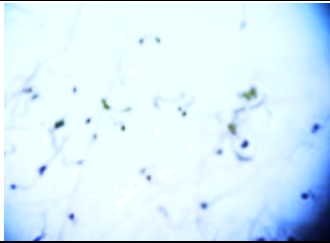
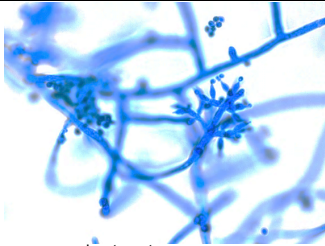
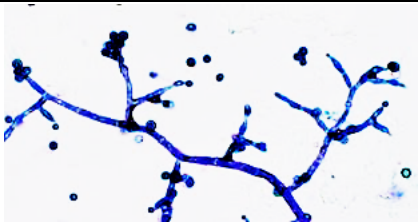


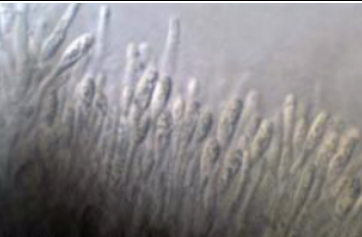
As estruturas micromorfológicas foram observadas nas lâminas coradas e registradas com microscópio óptico FWL 1500 (Feldmann Wild Leitz, São Paulo - SP). Os dados obtidos foram comparados com a literatura específica e utilizados como informação complementar para identificação das espécies (Tabela 8).


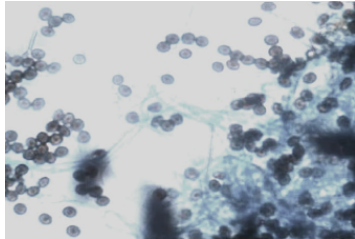
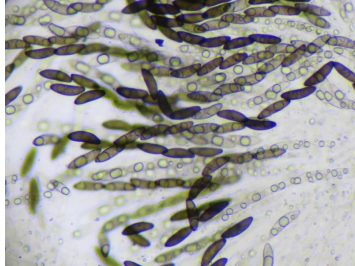
Tabela 8  
Características microscópicas dos fungos endofíticos e aquáticos.

Número	Código	Microcultivo	Taxonomia
264	1341		<i>Trichoderma</i> sp.
320	EjF1 2.2A		<i>Colletotrichum</i> sp.
764	MeFe 1.3		Sem identificação
461	F40a		<i>Aspergillus</i> sp.
455	GhCg2 1.2		<i>Aspergillus</i> sp.



882	2.3 ISP2 T+I L1P3 COA 18		Sem identificação
340	EJFlor 2 1.2A	 <p data-bbox="555 887 662 898">Oliveira, 2013.</p>	<i>Colletotrichum</i> sp.
84	AnspCg1 1.3a	 <p data-bbox="555 1155 662 1171">Banhos, 2016.</p>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
902	1.2 BDA A+TL2P1 COA 26		Sem identificação
265	1598e		<i>Trichoderma</i> sp.
406	GhF1 1.2b	 <p data-bbox="555 2016 678 2027">www.nature.com</p>	<i>Colletotrichum</i> sp.

88	VrC 2.1.3		<i>Trichoderma</i> sp.
334	EJFlor 2 1.2B		<i>Colletotrichum</i> sp.
869	AJP 1.2.2 (1)	 <small>www.researchgate.net</small>	<i>Trichoderma</i> sp.
267	1334		<i>Trichoderma</i> sp.
590	DgCr2 2.1b		<i>Paecilomices</i> sp.
341	EjC2 1.1B - F2	 <small>www.semanticscholar.org</small>	<i>Phomopsis</i> sp.
342	EjC2 1.1A - F1	 <small>www.ascofrance.com</small>	<i>Phomopsis</i> sp.

345	EjC2 1.1A - F1B	 www.researchgate.net	<i>Phomopsis</i> sp.
314	EjC11.2- F1 BDA	 www.researchgate.net	<i>Xylaria</i> sp.
325	EjC32.1B- F1	 www.ascofrance.com	<i>Xylaria</i> sp.

A caracterização morfológica das microestruturas é uma característica importante para a diferenciação de espécies; entretanto, quando as diferenças entre as microestruturas são mínimas, faz-se necessário a utilização de outras ferramentas para uma identificação confiável e segura, como a identificação por biologia molecular, que será realizada numa próxima etapa.

#### 4.1 Rendimento fúngico

A obtenção do rendimento dos extratos fúngicos foi feita de acordo o descrito no item 3.1.3, e teve o seguinte resultado, descrito na Tabela 9.

Tabela 9  
Rendimentos dos extratos de fungos endofíticos e aquáticos.

N°	Código	Identificação morfológica	Rendimento Micélio*	Rendimento Meio Líquido*
264	1341	<i>Trichoderma</i> sp.	0,832	0,350
320	EjF1 2.2A	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,734	0,119
764	Me Fe 1.3	Sem identificação	0,650	0,138
461	F40a	<i>Aspergillus</i> sp.	0,656	0,072
455	GhCg2 1.2	<i>Aspergillus</i> sp.	0,621	0,147
882	2.3 ISP2 T+I L1P3 COA 18	Sem identificação	0,523	0,114
340	EJFlor 2 1.2A	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,623	0,072
84	Ansp Cg 1.1.3a	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0,880	0,457
902	1.2 BDA A+TL2P1 COA 26	Sem identificação	0,754	0,164
265	1598e	<i>Trichoderma</i> sp.	0,298	0,066
406	GhF1 1.2b	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,549	0,219
88	VrC 2.1.3 ISP2	<i>Trichoderma</i> sp.	0,655	0,228
334	EJFlor 2 1.2B	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,607	0,156
869	AJP 1.2.2 (1)	<i>Trichoderma</i> sp.	0,882	0,374
267	1334	<i>Trichoderma</i> sp.	0,457	0,031
590	Dfga 212 I+AT	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,734	0,362
341	EjC2 1.1B - F2	<i>Phomopsis</i> sp.	0,619	0,119
342	EjC2 1.1A - F1	<i>Phomopsis</i> sp.	0,496	0,088
345	EjC2 1.1A - F1B	<i>Phomopsis</i> sp.	0,447	0,103
314	EjC11.2-F1 BDA	<i>Xylaria</i> sp.	0,517	0,076
325	EjC32.1B-F1	<i>Xylaria</i> sp.	0,484	0,158

\* Valores expressos em mg/mL de meio cultivado.

Pode-se observar que o rendimento do micélio é maior que o do meio líquido, tendo em vista a grande quantidade de polissacarídeos, ácidos graxos e outros metabólitos excretados da parede celular do fungo, durante seu crescimento. Os extratos que obtiveram melhor rendimento foram as cepas 869, 84, 264, 902, 320 e 590.

A baixa quantidade de material obtido no meio líquido pode ter sido influenciada pelo meio de cultura utilizado para o cultivo (BDA+L), bem como a forma de cultivo (pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação) e o método de extração. Nem sempre as condições utilizadas geram resultados desejados; portanto, aperfeiçoar o processo é essencial para que o rendimento seja favorável à sua aplicação (PAPAGIANNI, 2004; MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

Deve-se considerar, também, que tipo de hospedeiro pode influenciar no metabolismo (metabólitos secundários) de seu endófito, bem como o ambiente onde a planta se encontra, pois a especificidade de um endófito em relação a uma espécie vegetal pode ser influenciada pelas condições ambientais (ZHANG; SONG;

TAN, 2006; MORICCA; RAGAZZI, 2008; WALI et al., 2008; ROSA et al., 2009). Portanto, a escolha adequada do hospedeiro pode ser um fator importante para o isolamento de linhagens com potencial biotecnológico, fato este que poderá nortear novas linhas de pesquisa relacionadas a esses fatores (STROBEL et al., 1996; SAIKKONEN et al., 2004; SPITELLER; KUSARI; HERTWECK, 2012).

## 4.2 Ensaio biológicos

A atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos frente aos microrganismos patógenos estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10  
Atividade antimicrobiana dos extratos frente aos patógenos.

Código fungo	Gênero	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
264	T <sup>1</sup>	-	-	-	-	A	-
320	C <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
764	IP <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-
461	A <sup>3</sup>	-	-	A	-	-	-
455	A <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-
882	IP <sup>5</sup>	-	-	-	-	A	-
340	C <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
84	P <sup>4</sup>	A	-	A	A	A	A
902	IP <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	A
265	T <sup>1</sup>	A	-	-	-	-	-
406	C <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
88	T <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
334	C <sup>2</sup>	A	-	-	-	-	-
869	T <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
267	T <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-
590	Pa <sup>6</sup>	-	-	A	A	-	-
341	Ph <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-
342	Ph <sup>7</sup>	-	-	A	-	-	-
345	Ph <sup>7</sup>	-	-	-	-	A	-
314	X <sup>8</sup>	-	-	-	-	A	-
325	X <sup>8</sup>	-	-	-	-	A	-

<sup>1</sup>Trichoderma; <sup>2</sup>Colletotrichum <sup>3</sup>Aspergillus; <sup>4</sup>Pestalotiopsis; <sup>5</sup>Identificação pendente; <sup>6</sup>Paecilomices; <sup>7</sup>Phomopsis; <sup>8</sup>Xylaria; <sup>A</sup>Com atividade.

De acordo com os resultados da tabela 10, os extratos que tiveram ação antimicrobiana foram: 84, 265 e 334 contra o patógeno *S. aureus*; 461, 84, 590 e 342 contra *P. aeruginosa*; 84 e 590 obtiveram resultados frente *E. faecalis*; 882, 345, 314, 325, 264 e 84 contra *C. albicans*; 902 e 84 apresentaram atividade contra *C. tropicalis* (Figuras 19, 20, 21, 22 e 23).



Figura 19: *Screening* do teste antimicrobiano contra *E. faecalis* dos extratos dos fungos 84, 342, 461, 265 e 590, onde 19A-frente da placa, 19B-dorso da placa.

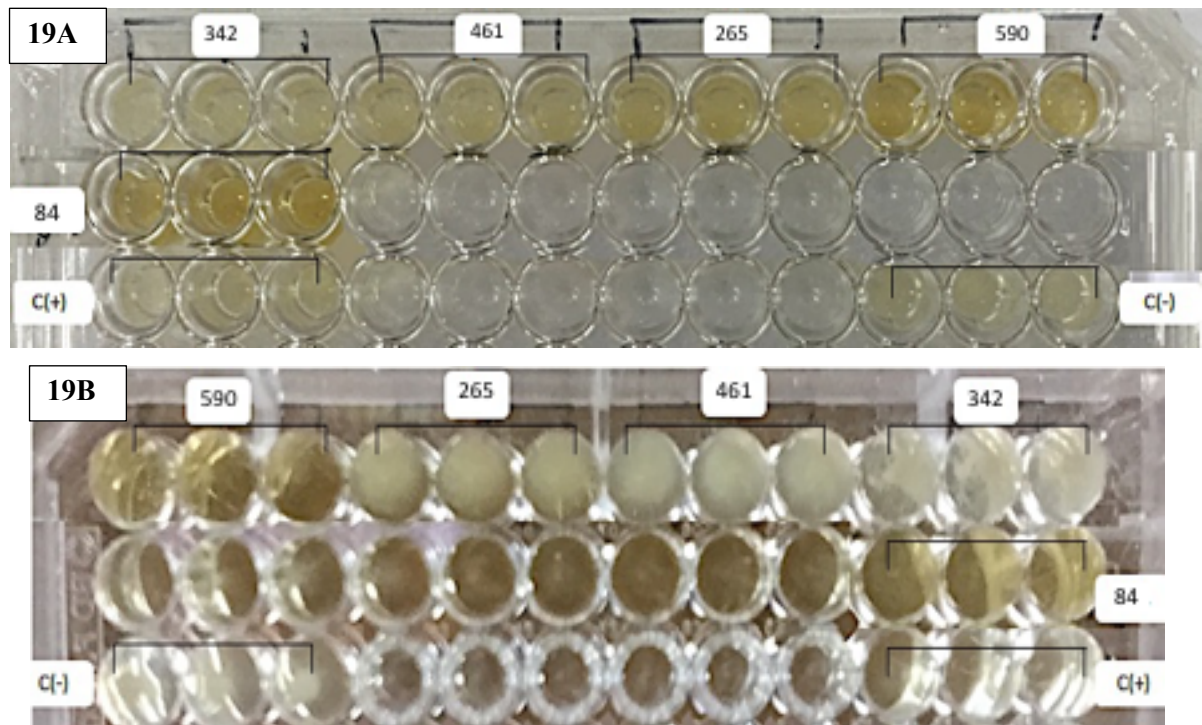


Figura 20: *Screening* do teste antimicrobiano contra *P. aureginosa* dos extratos dos fungos 84, 342, 461, 265 e 590, onde 20A-frente da placa, 20B-dorso da placa.

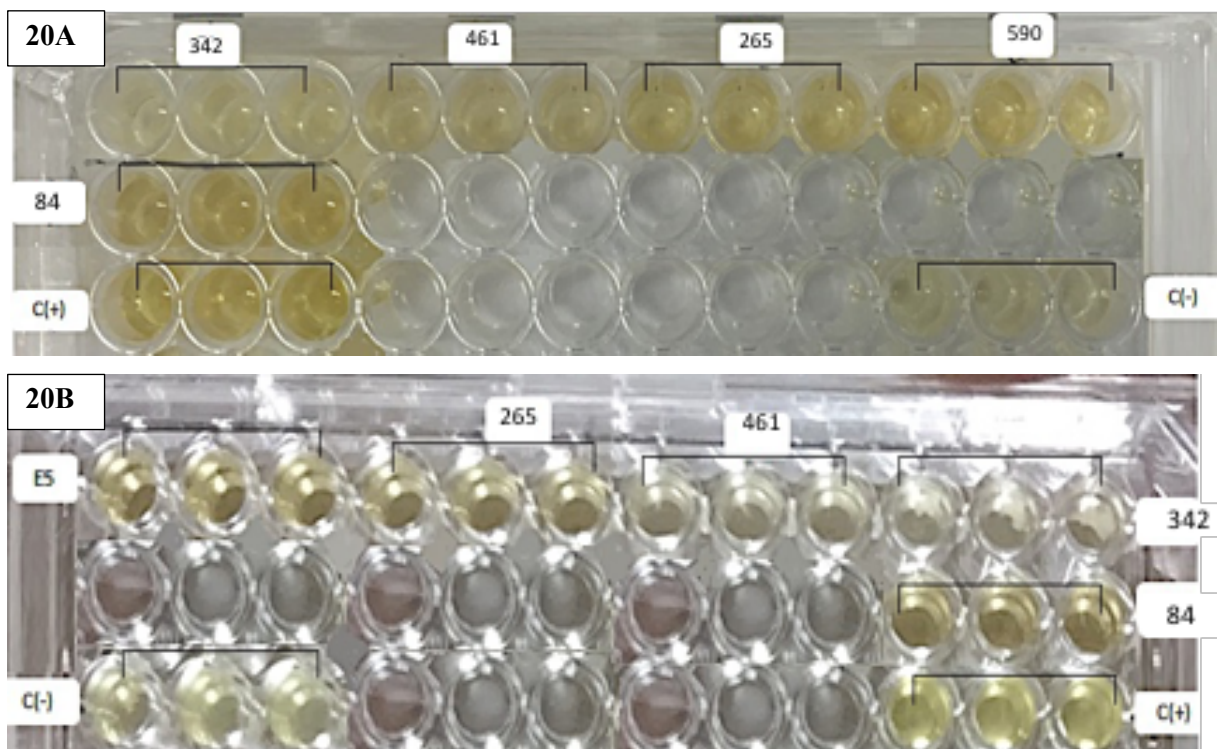


Figura 21: *Screening* do teste antimicrobiano contra *S. aureus* dos extratos dos fungos 84, 590, 461, 265 e 334, onde 21A-frente da placa, 21B-dorso da placa.

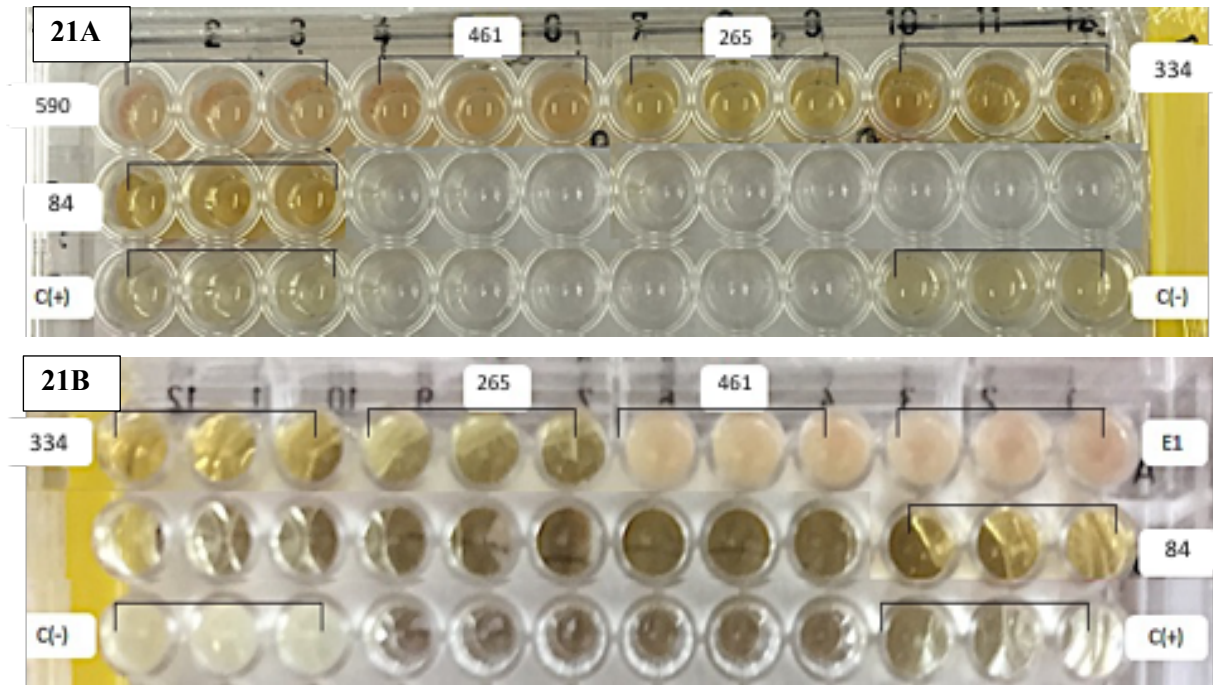


Figura 22: *Screening* do teste antimicrobiano contra *C. albicans* dos extratos dos fungos 882, 345, 314, 325 e 84, onde 22A-frente da placa, 22B-dorso da placa.

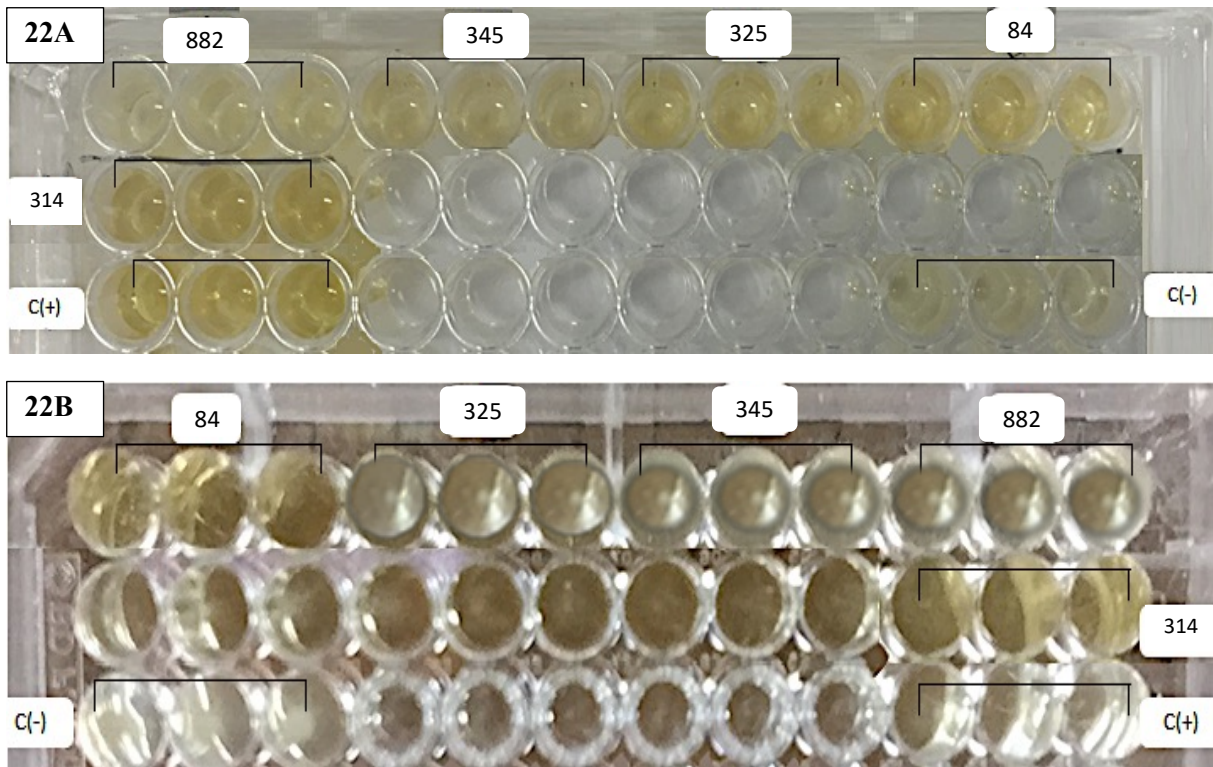
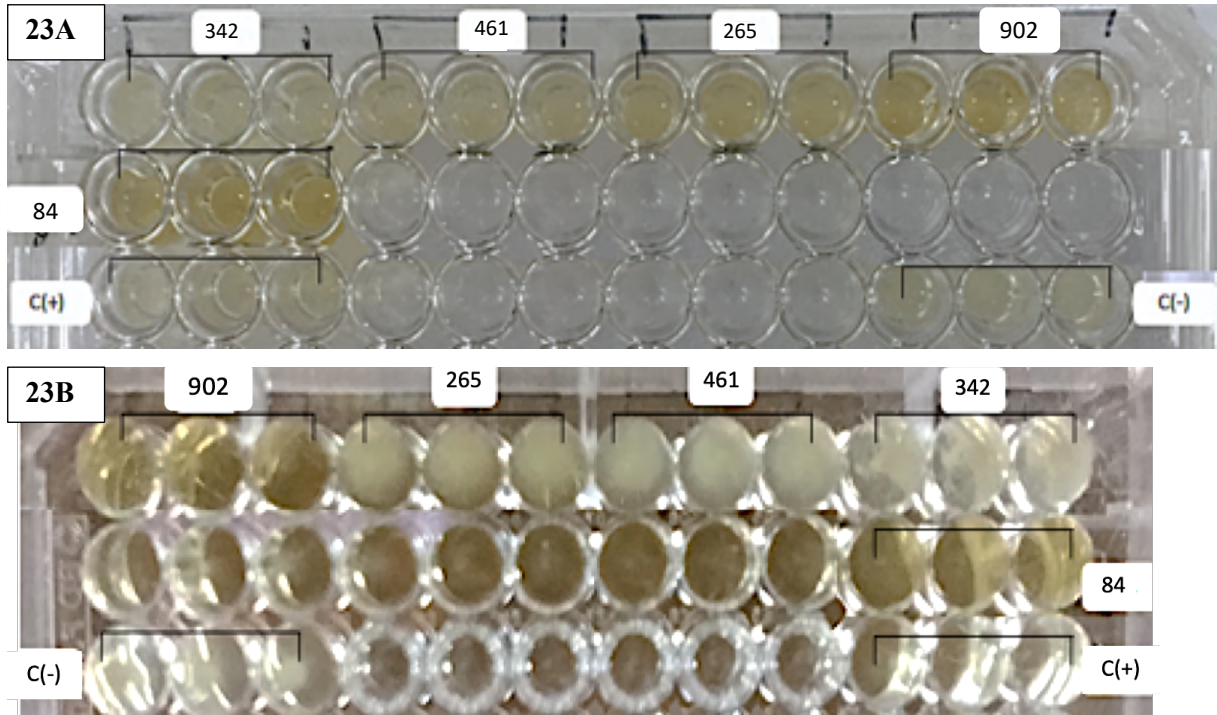




Figura 23: *Screening* do teste antimicrobiano contra *C. tropicalis* dos extratos dos fungos 342, 461, 265, 902 e 84, onde 23A-frente da placa, 23B-dorso da placa.

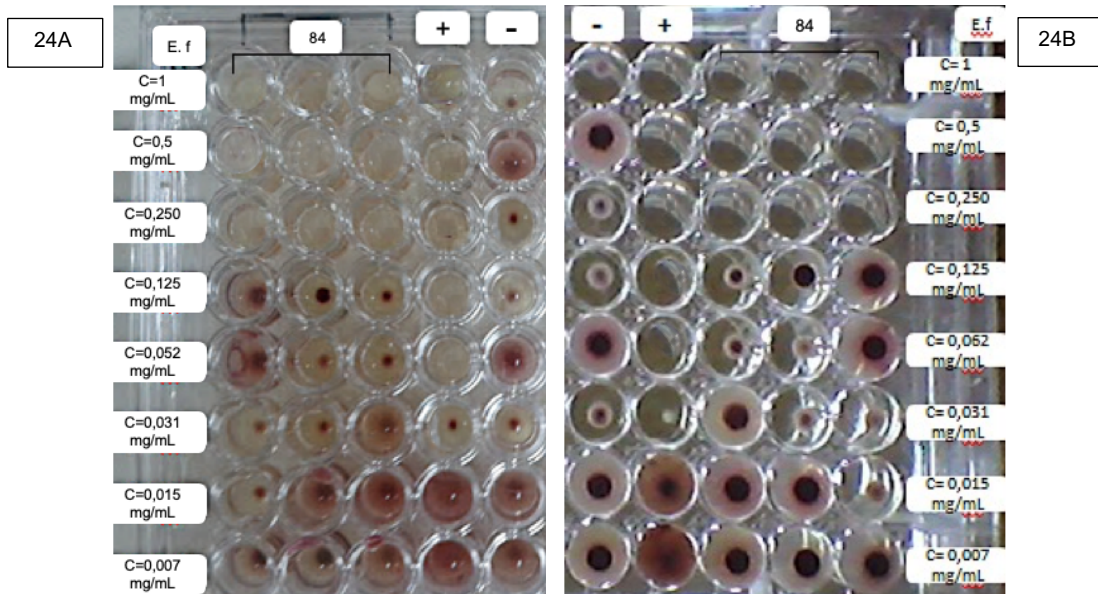


#### 4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Com base nos resultados da atividade biológica apresentados pelo extrato 84, foi selecionada esta linhagem para dar continuidade na pesquisa e, em seguida, foi realizado o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) na concentração de 2 mg/mL contra *E. faecalis*, *P. aureoginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, conforme descrito no item 3.2.4 (Figuras 24, 25, 26 e 27).

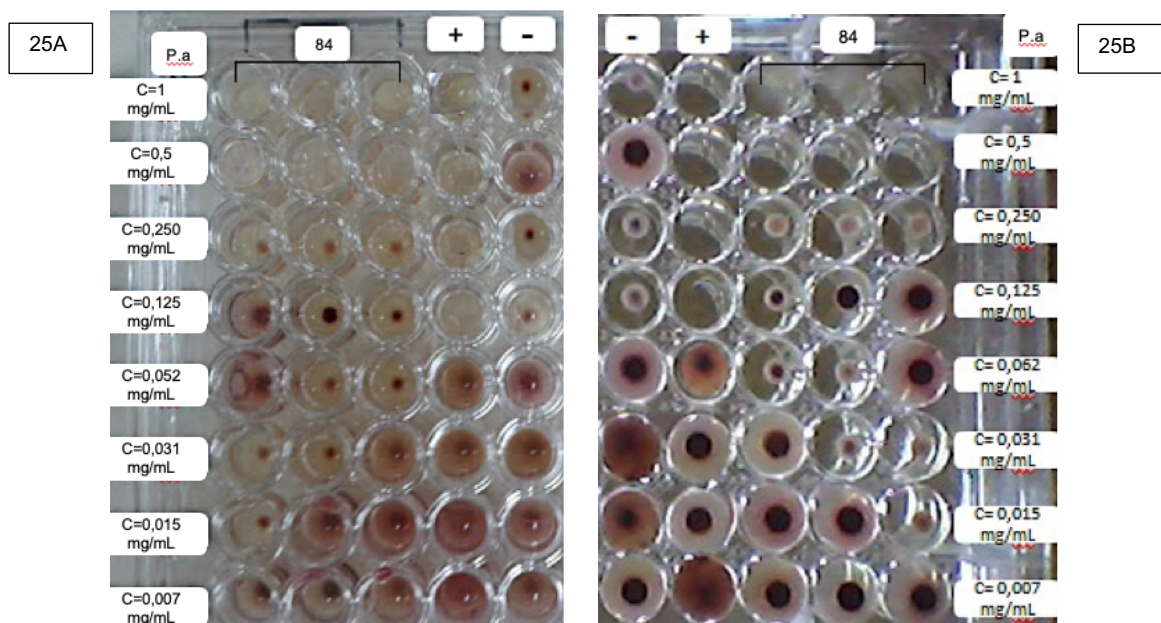
Figuras 24: Teste CIM do extrato 84 contra *E. faecalis*. 24A-frente da placa, 24B-dorso da placa.





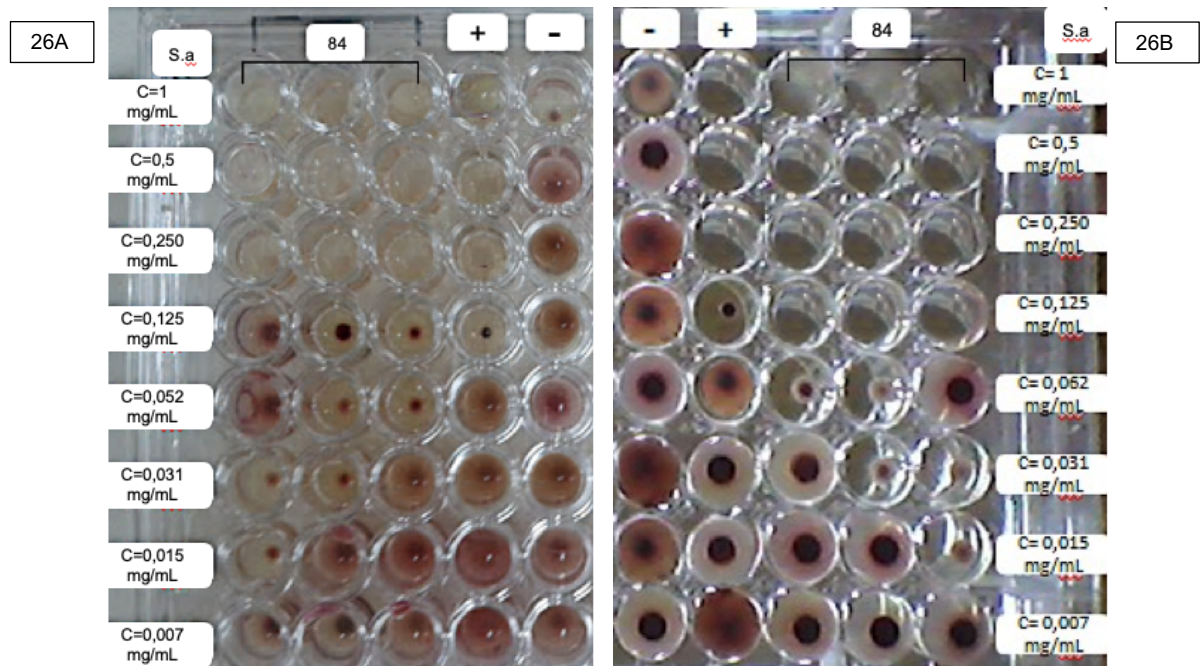
Pode-se verificar que houve ação bactericida nos poços A (1mg/mL), B (0,5mg/mL) e C (0,25mg/mL), e bacteriostática na quarta diluição (poço D), conforme demonstra a figura 24.

Figura 25: Teste CIM do extrato 84 contra *P. aureginosa*. 25A-frente da placa, 25B-dorso da placa.



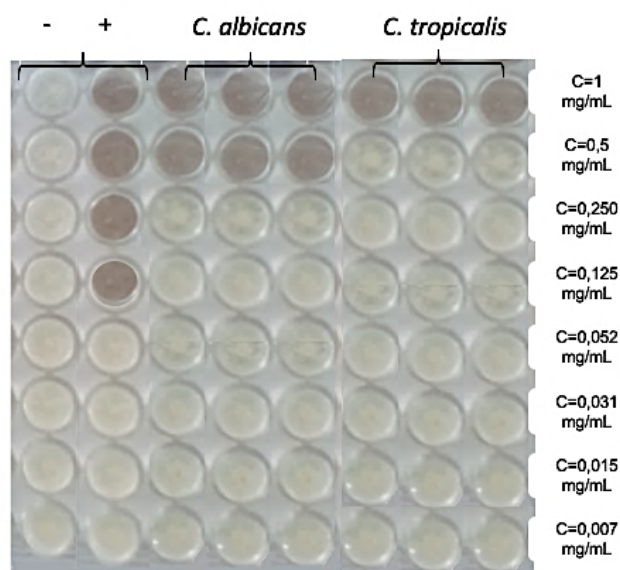
Já na figura 25, foi constatada ação bactericida do extrato contra *P. aureoginosa* nos poços A (1 mg/mL) e B (0,5mg/mL), e bacteriostática no poço C (0,250mg/mL).

Figura 26: Teste CIM do extrato 84 contra *S. aureus*. 26A-frente da placa, 26B-dorso da placa.



O extrato do fungo 84 também teve ação bactericida contra *S. aureus* na primeira e segunda diluições (poços A e B) e foi bacteriostático na terceira (poço C).

Figura 27: Teste CIM do extrato 84 contra *C. albicans* e *C. tropicalis*.



O extrato testado teve ação fungicida do contra *C. albicans* nos primeiros e segundos poços (A e B) e fungistático no poço C. Com relação à *C. tropicalis*, só houve atividade fungicida na primeira diluição (poço A) e foi fungistático na segunda (poço B) (Figura 27).

O menor valor de CIM obtido dos extratos foi de 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>, contra o patógeno *E. faecalis*; já o antibiótico usado (ampicilina), apresentou ação na concentração de 0,052 mg.mL<sup>-1</sup>. Quanto ao *S. aureus* e à *P. aureoginosa*, os extratos tiveram resultados semelhantes (0,25 mg.mL<sup>-1</sup>), bem como para os antibióticos ampicilina e tetraciclina (0,125 mg.mL<sup>-1</sup>). Já com os patógenos leveduriformes, os resultados foram diferentes, *C. albicans* com CIM de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> e *C. tropicalis* com 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, acima dos valores da nistatina que foi de 0,125 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 11).

Tabela 11  
Concentrações inibitórias mínimas do extrato de *Pestalotiopsis* contra os patógenos testados.

	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	0,125 mg/mL	0,052 mg/mL
<i>E. faecalis</i>	Bc	Bc	Bc	Bt	
<b>Ampicilina</b>					X
<i>S. aureus</i>	Bc	Bc	Bt		
<b>Ampicilina</b>				X	
<i>P. aureoginosa</i>	Bc	Bc	Bt		
<b>Tetraciclina</b>				X	
<i>C. albicans</i>	Fc	Fc	Ft		
<i>C. tropicalis</i>	Fc	Ft			
<b>Nistatina</b>				X	

Bc - Bactericida; Bt - Bacteriostático; Fc - Fungicida; Ft - Fungistático;

A cepa endofítica utilizada neste estudo (código AnspCg 1.1.3a) foi isolada da planta *Rollinia sp.*, pertencente à família Annonaceae, que teve sua identificação confirmada por Banhos (2016) através da biologia molecular como *Pestalotiopsis microspora*, com 97% de similaridade, utilizando as sequências nucleotídicas depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

O *Pestalotiopsis microspora* é comumente isolado de várias espécies vegetais, tanto de clima tropical quanto de temperado. A possibilidade de o hospedeiro influenciar no metabolismo de seu endófito é fonte de discussões e observações de estudos na área, havendo inclusive dados conclusivos de que a escolha adequada do hospedeiro é fundamental para o isolamento de linhagens com

potencial biotecnológico (STROBEL et al., 1996; BANHOS et al., 2014). Já foram isoladas de várias compostos propriedades bioativas derivadas desta espécie, como ácido torreiânico (anticancerígeno), ácido ambuíco (antifúngico), pestacina e isopestacina (atividade antimicrobiana e antioxidante), jesterona e hidroxigesterona (antimicrobiano) (LI et al., 2001; STROBEL, 2002; HARPER et al., 2003; STROBEL, 2004; SILVA et al., 2006; SILVA, 2014).

Estudos para a busca dos micro-organismos endofíticos relacionados à família Annonaceae, suas aplicações biotecnológicas e a pesquisa de moléculas bioativas, levaram ao isolamento de espécies de fungos endofíticos que vivem em associação com estas plantas, dentre eles o *Pestalotiopsis* spp. (SILVA et al., 2006; GAMA et al., 2008; SOUZA et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos é um grande problema de saúde pública nesses tempos modernos, principalmente no que se refere às opções de tratamento medicamentoso e ao controle de infecções. Estudos de endófitos fúngicos isolados de espécies de plantas nativas brasileiras relataram propriedades químicas e bioquímicas potencialmente úteis, que podem gerar novos compostos com aplicações práticas em uma variedade de áreas biotecnológicas, com inúmeras drogas úteis como importantes opções terapêuticas para inúmeras doenças (GLIENKE et al., 2012).

Existe uma grande variedade de metabólitos endofíticos bioativos, mas a descoberta dessas substâncias está em declínio, sendo necessária a bioprospecção de novas fontes, em regiões ou habitats menos explorados. Um único endófito é capaz de produzir várias substâncias bioativas; entretanto, não têm sido completamente explorado quanto às suas propriedades terapêuticas (SPECIAN et al., 2014).

Guimarães et al. (2009), avaliando a espécie *P. guepinii* isolada de *Cladocolea micrantha* (Loranthaceae), testaram-na *in vitro* contra os micro-organismos patogênicos *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Os três primeiros tiveram o crescimento inibido entre 77 – 88% e o crescimento de *E. faecalis* foi moderadamente inibido (22 – 42%), o que corrobora com os achados deste estudo com relação aos resultados frente *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*, enfatizando a capacidade antimicrobiana do gênero sobre os patógenos.

Gomes-Figueiredo et al. (2007) testaram as propriedades antimicrobianas de treze cepas endofíticas do gênero *Pestalotiopsis* isoladas da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss ("espinheira santa") frente à *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), e dois isolados pertencentes à espécie *P. microspora* (6JAES e 29SES), os quais tiveram sucesso em inibir o crescimento dos microrganismos testados, achados estes que estão em acordo com os resultados encontrados neste estudo.

Maria et al. (2005) avaliaram o potencial antimicrobiano de 14 fungos endofíticos isolados de *Acanthus ilicifolius* e *Acrostichum aureum* e os testaram frente a bactérias (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*) e fungos (*Candida albicans* e *Trichophyton metagrophytes*). Extratos etílicos brutos de quatro endófitos derivados de fermentação submersa mostraram resultados positivos. A cepa do *Pestalotiopsis microspora*, obtida da raiz da *Acanthus ilicifolius*, mostrou considerável inibição contra *P. aeruginosa* ( $14,2 \pm 1,4$ ), *S. aureus* ( $10,5 \pm 0,7$ ) e *Candida albicans* ( $8,3 \pm 0,2$ ). O resultado deste trabalho coincide, em parte, com os nossos achados quanto à atividade do *P. microspora* frente à *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*.

#### **4.3 Perfil metabólico do *P. microspora***

Com base nos resultados de atividade biológica, foi realizada a avaliação do perfil químico do *P. microspora*, onde inóculos com 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de conídios, na concentração de  $15 \times 10^8$  cels. $\text{mL}^{-1}$  (McFarland 5), foram aplicados em 21 erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio BDL. Em seguida, os frascos foram acondicionados em armários, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, mantidos em modo estático durante a fase de crescimento fúngico.

A cada cinco dias, do 5° ao 30° dia, às triplicatas dos cultivos foi acrescido MeOH; os meios cultivados foram filtrados e rotaevaporados, sendo os micélios secos e pesados.

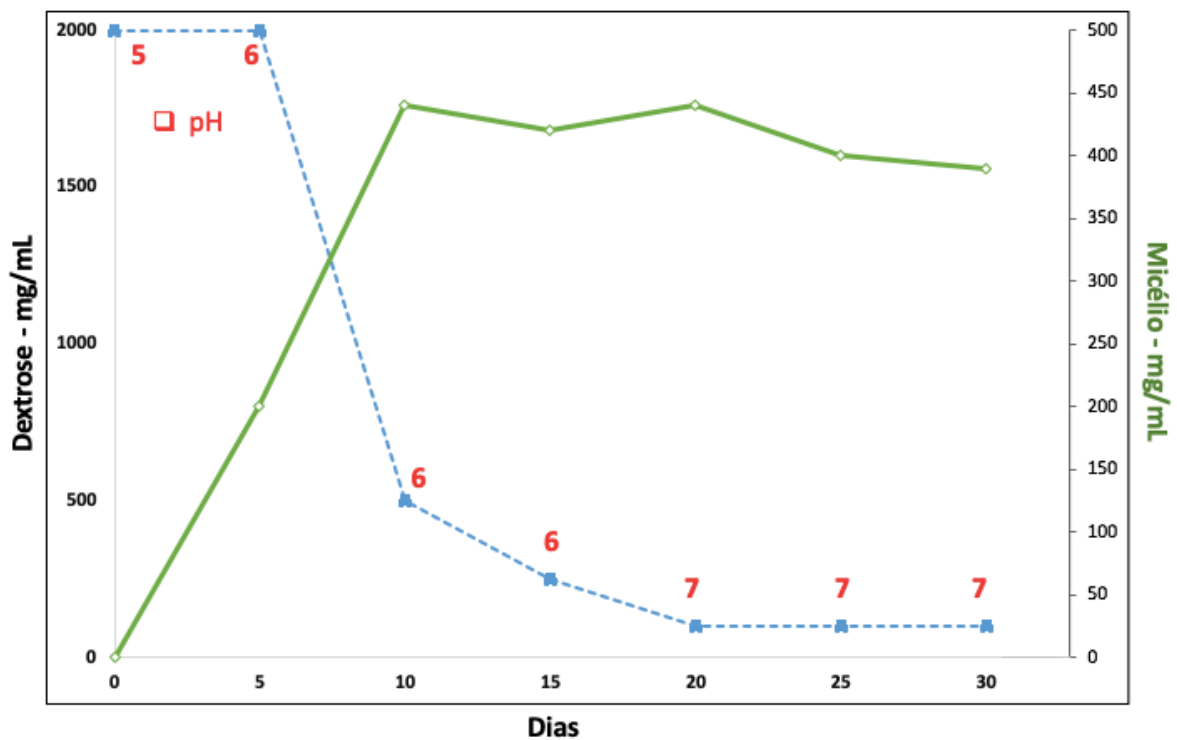
Durante esse período, as amostras do meio cultivado foram avaliadas quanto à concentração de açúcar e pH. Esses parâmetros foram utilizados para avaliar as



etapas de crescimento da linhagem e produção de metabólitos secundários em comparação à produção micelial (Figura 28).

Para a análise dos extratos por espectrometria de massas, cada amostra foi solubilizada em MeOH na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> (solução-mãe), e dessa solução, 20 µL foram diluídos em 1,0 mL de MeOH (solução de análise). Foi utilizado espectrômetro de massas THERMO (ionização por electrospray – ESI-MS), com scan de 100 a 1.000 m/z em modo positivo. A faixa de massas com maiores picos foi de 100 a 500 m/z.

Figura 28 - Consumo de açúcar, pH e crescimento micelial do fungo *P. microspora*.



Na fase inicial, chamada de fase lag, o fungo está se adaptando ao meio em que está crescendo, o que pode ser constatado nos primeiros 5 dias, onde a concentração de açúcar manteve-se constante, com um pequeno crescimento do pH de 5 para 6.

A fase de crescimento exponencial, ou fase log, iniciou-se a partir do 5º e manteve-se até o 10º dia, onde houve um acentuado decréscimo da concentração de açúcar e um aumento do pH, chegando a 7 no 20º dia e mantendo-se estável até o final do cultivo. Neste período, ocorreu o maior crescimento micelial, atingindo o

ápice no 20º dia e ficou constante até o período final de cultivo (fase estacionária), onde foi interrompido o cultivo a fim de evitar a fase de catálise.

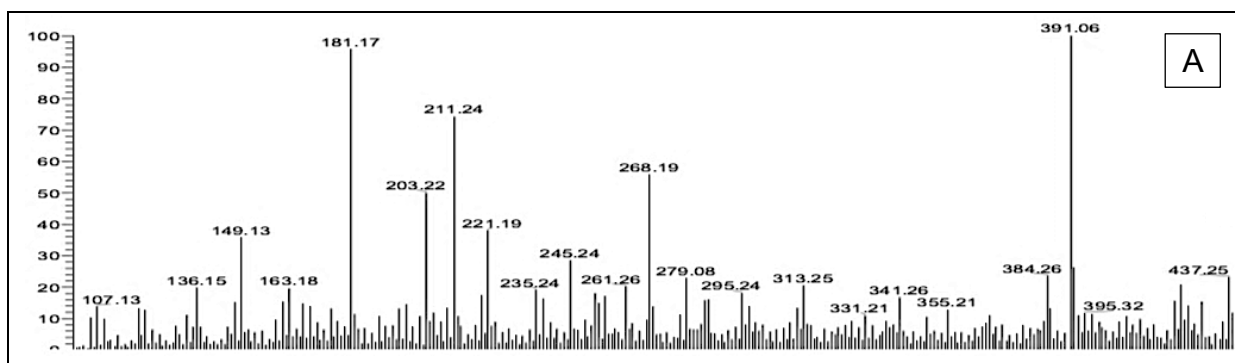
A avaliação da concentração do açúcar, em paralelo ao crescimento micelial, se mostrou bom parâmetro avaliativo, demonstrando as fases fisiológicas pelas quais a linhagem passa, principalmente o fim da fase log e o início da fase estacionária, sendo este o melhor período para isolamento de compostos bioativos (BORZANI et al., 2001; BANHOS et al., 2016).

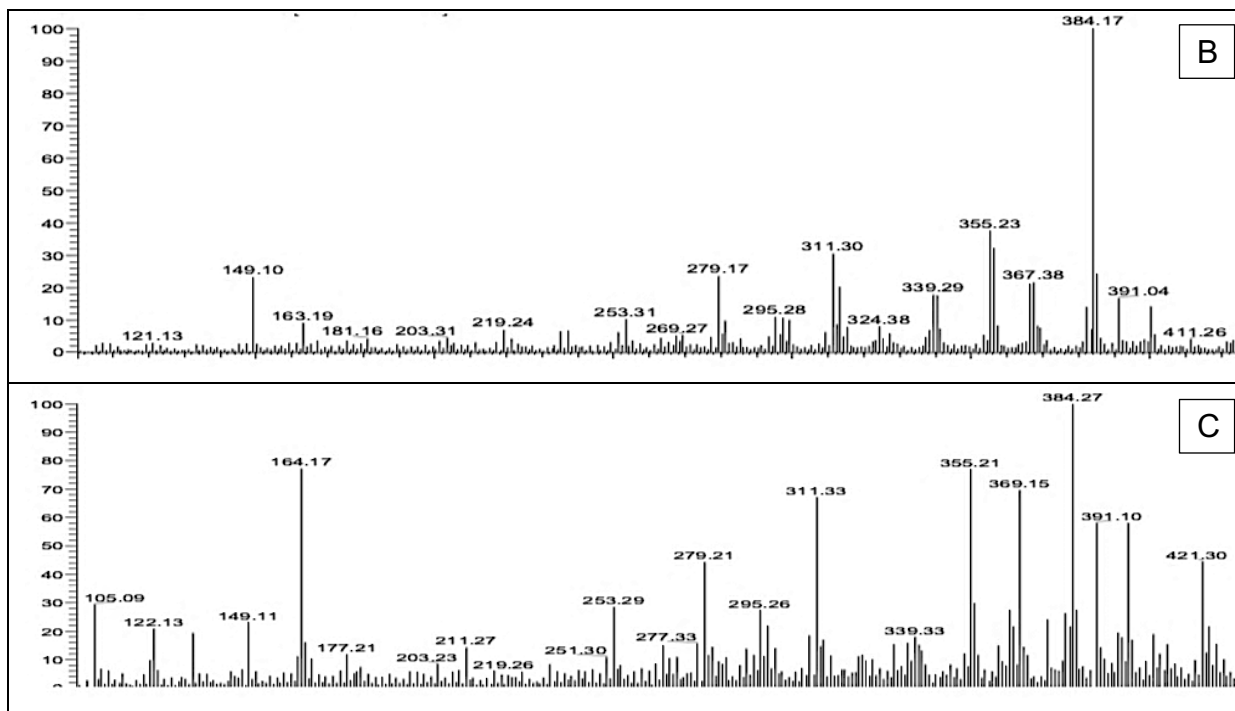
No início da fase estacionária, ocorre a produção de metabólitos secundários, mas a produção de compostos bioativos ainda estariam em baixas concentrações, o que pode ser deduzido pela mudança do pH inicial, ao longo do crescimento, de 5 para 7, pois o pH inicial de cultivo de fungos está entre 5 e 6, onde as principais enzimas envolvidas no metabolismo primário atuam melhor nessa faixa de pH. Contudo, a alteração do meio de cultivo para neutro pode ser indício de que um ambiente menos favorável favoreça as enzimas relacionadas às funções bioquímicas envolvidas com o metabolismo secundário, atingindo o ápice da produção de metabólitos por volta do 30º dia (STROBEL et al., 1996; LOU et al., 2012; SELIM et al., 2012; KRUSCHEWSKY, LUZ e BEZERRA, 2014; DOMINATO, 2017).

#### 4.3.1 Perfil químico do *P. microspora*

A avaliação do perfil químico do *P. microspora* revelou picos majoritários m/z 391 e m/z 181 no 5º dia de cultivo. Entre 15º e 20º dias, o pico foi m/z 384 e no 30º dia, prevaleceram os picos m/z 164, 355 e 369 e 384 (Figuras 29 A, B e C).

Figuras 29: A - Espectro de massa obtido do 5º dia de cultivo; B - Espectro obtido do 20º dia de cultivo; C - Espectro obtido do 30º dia de cultivo.





Os perfis indicam fases fisiológicas diferentes, coerentes com os dados de consumo de açúcar e o crescimento micelial, onde em A, foi o início da fase exponencial (5º dia), em B a fase estacionária de crescimento (20º dia) e em C, a fase final do crescimento (30º dia). A partir do 20º dia, ocorreu o aparecimento dos sinais dos metabólitos responsáveis pelos compostos bioativos, sendo de grande importância o acompanhamento por espectrometria de massas das fases de crescimento, o que pode tornar o processo mais eficiente no aumento da produção de compostos de interesse biotecnológico. Todavia, não é possível afirmar quais compostos são responsáveis pela atividade biológica, por conta do grande número de sinais presentes, mas é possível observar a mudança de picos durante o crescimento fúngico, indicando que os compostos bioativos estão sendo produzidos principalmente na fase estacionária.

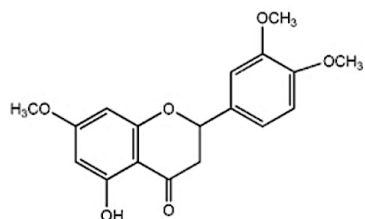
Os metabólitos, produzidos pelos fungos, costumam ocorrer no fim do crescimento exponencial ou em substratos com fontes limitadas de nutrientes, sendo produzidos a partir de intermediários metabólicos comuns, porém em vias biossintéticas reguladas por genes específicos (LOU; XING; DENG, 2012; MARCON, 2013; DOMINATO, 2017).

Podem ser observados que alguns sinais correspondentes a metabólitos secundários presentes nesta cepa já foram isolados de *Annona cacans*, planta nativa do Brasil, encontrada nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro,

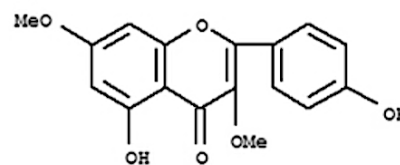


Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Figuras 30 A, B, C, D), como os flavonóides eriodictiol 7,3',4'-trimetil éter - m/z 331 (A) e 4',5-dihidroxi-3',7-dimetoxiflavanona - m/z 313 (B); a aristolactama B-II - m/z 279 (C) e o ácido fenólico como ácido *p*-cumárico - m/z 164 (D) (SAITO, 1990; REIS, 2011; TASCO, 2016).

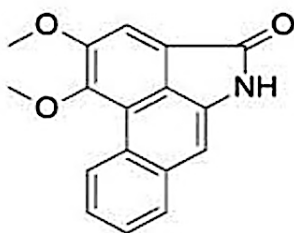
Figura 30: Substâncias previamente isoladas de *Annona cacans*.



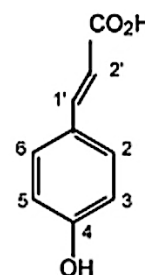
A - eriodictiol 7,3', 4'-trimetil éter



B - 4',5-dihidroxi-3',7- dimetoxiflavanona



C - aristolactama B-II



D - ácido *p*-cumárico

Com o perfil químico obtido, não é possível detectar quais compostos são responsáveis pela atividade biológica, já que há grande número de sinais presentes, mas é possível diferenciar os íons moleculares que são formados nos intervalos do 20° ao 30° dia, indicando que novos compostos bioativos estão sendo produzidos e detectados.

#### 4.4 Ensaio da atividade antimicrobiana do cimento experimental

Os valores das medianas, assim como os valores mínimo e máximo dos diâmetros dos halos de inibição de cada material estão representados na Tabela 12.

Tabela 12  
Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos de acordo com o microrganismo e os grupos estudados.

Microrganismo	Grupos					
	G1 MTA Branco Angelus®	G2 MTA + 5 %	G3 MTA + 10 %	G4 MTA + 15 %	G5 MTA + 20 %	G6 MTA + 25 %
<i>S. aureus</i>	9,1 (7,8 - 10,4)	-	-	-	9,4 (8,2 - 10,6)	10,2 (7,9 - 12,5)
<i>E. coli</i>	9,2 (8,7 - 9,7)	-	-	-	9,3 (8,9 - 9,7)	9,3 (8,7 - 9,9)
<i>P. aeruginosa</i>	8,9 (7,6 - 10,2)	-	-	-	9 (7,7 - 10,3)	9,2 (7,9 - 10,5)
<i>E. faecalis</i>	8,5 (7,1 - 9,9)	-	-	-	8,8 (7,2 - 10,4)	8,9 (7,2 - 10,6)
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-

Comparando-se as diferentes concentrações nos corpos de prova para cada microrganismo usado no estudo, pôde-se observar que houve atividade para o *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* apenas nos grupos G1, G5 e G6. O grupo G6 (MTA + 25 %) promoveu o maior halo de inibição em relação aos demais grupos, inclusive quando comparado com o grupo G1 (MTA Branco Angelus®).

Os halos de inibição para o *S. aureus* foram maiores do que aqueles apresentados pelos demais microrganismos ( $p < 0,05$ ), sendo o grupo G6 o que apresentou maior halo entre os grupos testados, mas os G5 e G1 não apresentaram diferenças entre si ( $p > 0,05$ ).

Para *E. coli*, não houve diferenças estatísticas significantes entre si, em relação aos diâmetros dos halos dos grupos G1, G5 e G6 ( $p > 0,05$ ).

Para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, os grupos G5 e G6 também apresentaram diâmetros maiores do que o grupo G1 ( $p < 0,05$ ); entretanto, os grupos G5 e G6 não tiveram diferenças estatísticas significantes entre si ( $p > 0,05$ ).

A comparação do diâmetro dos halos de inibição de cada material em relação aos diferentes microrganismos mostrou que nos grupos G1, G5 e G6, os halos de inibição observados para o *S. aureus* foram semelhantes àqueles da *E. coli* ( $p > 0,05$ ) e maiores do que os apresentados pelo *P. aeruginosa* e *E. faecalis* ( $p < 0,05$ ).

Com relação às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, apesar de terem sido constatadas atividades contra estes patógenos nos testes anteriores, não foi reproduzida esta característica no teste em questão, pois não houve formações de halos de inibição significantes e por isso não os consideramos.

O agregado trióxido mineral (MTA) é um material usado na Odontologia, de fácil manipulação e com apreciáveis características físicas, químicas e biológicas. Sua atuação principal é na indução da dentinogênese, cementogênese e osteogênese. Possui vantagens em relação a outros materiais, pois promove selamento marginal próximo ao ideal, possui compatibilidade biológica, não induzindo efeitos lesivos ao organismo, é desprovido de potencial mutagênico, de citotoxicidade e induz à formação de tecido mineralizado (PARIROKH e TORABINEJAD, 2010 a; COSTA et al., 2012).

Silva (2014) realizaram um estudo com a finalidade de avaliar as propriedades físicas, químicas e biológicas de um cimento experimental à base de Portland contendo diferentes agentes radiopacificadores, o MTA - Angelus branco e o cimento Portland branco, em diversas proporções com óxido de zircônio e tungstato de cálcio. Os cimentos experimentais foram manipulados utilizando líquido composto por 80% de água destilada e 20% de propilenoglicol. O resultado obtido foi o desenvolvimento de cimentos que exibiram propriedades iguais ou superiores ao MTA Angelus branco.

Em outro trabalho, Costa et al. (2014) avaliaram o tempo de presa, solubilidade, o pH, a liberação de íons cálcio e a radiopacidade do cimento Portland puro ou associado a quatro radiopacificadores (sulfato de bário, carbonato de bismuto, óxido de bismuto e iodofórmio), comparando-o ao MTA branco (Angelus, Londrina, Brasil) e concluíram que os radiopacificadores carbonato de bismuto e óxido de bismuto proporcionaram tempo de presa inicial, solubilidade, pH, liberação de íons cálcio e radiopacidade adequados quando associados ao cimento de Portland.

Siqueira et al. (2017) objetivaram avaliar a radiopacidade, a ação antimicrobiana, a estrutura de superfície e a composição química do cimento Portland (CP) associado a diferentes concentrações de óxido de cálcio e utilizaram o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), o CP cinza e o CP acrescido de óxido de cálcio nas concentrações de 1%, 2%, 5% e 10%. A avaliação da ação antimicrobiana foi realizada por meio do teste de difusão em ágar, com os microrganismos: *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. Subtilis* e *C. albicans*. Os materiais testados foram manipulados e inseridos em cavidades de 6 mm confeccionadas no ágar. Concluíram que nenhum grupo testado apresentou eficácia antimicrobiana, com ausência de halos de inibição.

Nogueira (2008) teve como objetivo avaliar, in vitro, o efeito antibacteriano e citotóxico do Agregado de Trióxido Mineral (MTA-Branco, Angelus), associado à solução de clorexidina (CHX) em diferentes concentrações. Para a análise da atividade antibacteriana foi empregado o método de difusão em ágar e utilizados os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. faecalis*. Nas Placas de Petri foram preparados poços com 4 mm x 5 mm, e preenchidos com o cimento MTA, preparado com água destilada estéril (G1-controle) e solução de CHX nas concentrações de 0,06% (G2), 0,12% (G3), 0,2% (G4) e 1% (G5). A adição de CHX 1% ao MTA aumentou a atividade antibacteriana do cimento sobre *S. aureus* ( $p < 0,05$ ). Para *E. coli* e *P. aeruginosa*, não houve diferença estatística em relação aos tamanhos dos halos de inibição para todos os materiais estudados ( $p > 0,05$ ). Para o *E. faecalis*, MTA + CHX 0,2% e MTA + CHX 1% apresentaram menores halos de inibição quando comparados aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

O objetivo do estudo de Bertoluzzi (2007) foi avaliar a influência do acréscimo de 10% de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) no tempo de presa, solubilidade, desintegração, pH e atividade antimicrobiana do MTA Branco (MTA), cimento Portland branco com radiopacificador (CPB) e ProRoot MTA (PRO), com e sem  $\text{CaCl}_2$ . A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica da difusão em ágar, empregando o método do poço. Os microrganismos utilizados foram procedentes da ATCC: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *C. albicans*, *S. epidermidis*. Todos os cimentos, com e sem  $\text{CaCl}_2$ , apresentaram atividade antimicrobiana, mas sem diferença estatística significativa entre eles.

Andrade et al. (2015) verificaram a ação antimicrobiana, solubilidade, tempo de presa, escoamento, pH, liberação de cálcio e características da superfície do MTA associado às substâncias hipoclorito de sódio gel a 1%, clorexidina gel a 2%, água destilada associada a 10% de propilenoglicol (CCPG), KY gel, solução salina e água destilada. Para o teste antimicrobiano, utilizaram o *S. mutans*, *L. casei*, *E. faecalis* e *C. albicans*, por meio do método de contato direto. Os resultados dos testes antimicrobianos mostraram que os diferentes aditivos, associados ao MTA, apresentaram maior propriedade inibitória do que bactericida; o único veículo avaliado que proporcionou alguma melhora no efeito antimicrobiano foi a clorexidina gel a 2%.

#### **4.5 Eletrofiação de membrana a partir de extrato fúngico de *P. microspora***

Os polissacarídeos são uma classe de polímeros amplamente utilizada em diversas aplicações da biotecnologia e medicina, tendo com principais propriedades a sua abundância na natureza, biodegradabilidade e atoxicidade (EIRAS et al., 2007).

A eletrofiação de membranas oriundas de polissacarídeos, com vistas ao uso farmacológico, tem sido descrita na literatura para a obtenção de produtos destinados à área de saúde; em nosso trabalho, foi usado um polissacarídeo derivado de *P. microspora* (MALAFAYA et al., 2007; BURD, HUANG, 2008).

Uma técnica que tem recebido atenção na produção de membranas é a incorporação de agentes bioativos às matrizes poliméricas através da eletrofiação (COSTA et al., 2012a, 2012b) Estes agentes podem ser incorporados aos biomateriais em várias etapas do processo de produção, utilizando diferentes estratégias, podendo estar ligados, dispersos ou dissolvidos na estrutura dos filmes. Em nosso produto, foram utilizados 5 mg dissolvidos em acetato de celulose (WANG et al., 2000; SANTOS, 2014; ZHENG, 2015).

O desenvolvimento e a aplicação de um biomaterial envolvem várias áreas do conhecimento, sendo necessário que haja colaboração entre profissionais de diferentes especialidades; e a obtenção desta membrana, poderá ser o início de nova frente de pesquisa na área de biomateriais, as de origem microbiana da Amazônia.

## 6. Conclusão

Baseado nas condições experimentais desse trabalho, pôde-se concluir que:

- Das linhagens usadas neste trabalho, tiveram atividade antimicrobiana: **Aspergillus** - *P. aeruginosa*; **Pestalotiopsis** - *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *tropicalis*; **Colletotrichum** - *S. aureus*; **Paecilomyces** - *P. aeruginosa*, *E. faecalis*; **Phomopsis** - *P. aeruginosa* e *C. albicans*; **Xylaria** - *C. albicans*; **Identificacao pendente** - *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- O gênero *Pestalotiopsis* mostrou-se mais efetivo nos testes antimicrobianos, especificamente o *P. microspora*, fungo endofítico obtido da planta *Rollinia* sp, da família Annonaceae, com o CIM de 0,12 (*E. faecalis*; *S. aureus*, *P. aeruginosa*), 0,25 (*C. albicans*) e 0,5 (*C. tropicalis*);
- O resultado do perfil metabólico do *P. microspora* sugere que os compostos bioativos são produzidos a partir do 20º até o 30º, na fase estacionária, período adequado para o isolamento de substâncias;
- Na avaliação da atividade antimicrobiana do cimento experiemntal, houve atividade para o *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* nos grupos GC, G5 (MTA + 20%) e G6 (MTA + 25%); entretanto, o G6 (MTA + 25%) apresentou maiores valores em todos os grupos e não houve diferença siginificativa entre os grupos de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*;
- A adição do extrato de polissacarídeo do *P. microspora* melhorou a atividade antimicrobiana do MTA, constituindo-se numa alternativa promissora para a produção de um cimento experimental de uso odontológico.
- A eletrofiação, utilizando o extrato do *P. microspora*, é uma possibilidade a ser estudada futuramente, pois permitirá a inclusão de características antimicrobianas derivadas de fungos endofíticos em membranas, para uso biotecnológico.

## REFERÊNCIAS

AINA, D. A. et al. Comparative assessment of mycelial biomass and exopolysaccharide production of wild type and mutante strains of *Schizophyllum commune* grown in submerged liquid medium. **J Nat Sci**, v.10, n.10, p. 82-9, 2012.

ALQUINI, G. et al. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v. 230, n. 1, p. 47-52, 2004.

AL-MANHEL A.J.A. Production of Exopolysaccharide from Local Fungal Isolate. **Curr Res Nutr Food Sci Jour**, v.5, n. 3, p. 338-46, 2017.

ALY, A.H. et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, n.8, p.1716- 25, 2008.

\_\_\_\_\_. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v.41, n.1, p. 1-16, 2010.

ANDRADE F.B., et al. Efeitos de diferentes aditivos sobre as propriedades antimicrobianas, físicas e químicas do agregado trióxido mineral (MTA). **Dental Press Endod**. v. 5, n.1, p.19-29, 2015.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D; JANSSON,J.K. Interactions between arbuscular micorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environ Microbiol**, v. 8, n.1, p.1-10, 2006.

AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos**. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (eds). Ecologia Microbiana. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariuma, Brasil, p.117-37, 1999.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: Multifacetated Microbes**. New Dehli: Anamaya Publication, 2005. p.189-207.

AZEVEDO, J.L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

\_\_\_\_\_. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: EducS, 2002. p.269-294.

BAE, J. T. et al. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. **J Microbiol Biotechnol**, v.10, n.4, p.482-7, 2000.

BALDANI, J.I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium, *Int J Syst Evol Microbiol*, v.36, n.1, p.86-93, jan.1986 apud RADWAN; T.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq Agropec Bras**, v. 39, n.10, p. 987-94, 2004.

BANHOS, E.F. dos. et al. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Braz J Microbiol**, v. 45, n.1, p.153-61, 2014.

BANHOS, E.F. dos. **Análises moleculares de linhagens selvagens e mutantes de *Pestalotiopsis spp.* associadas a plantas e basidiomicetos da Amazônia Brasileira**. 2016. 122 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

BARBOSA, A.M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. **J Polym Environ**, v. 21, n.2, p.575–9, 2012.

BAUERMEISTER, A. et al.  $\beta$ -1,3-Glucanases fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.

BENCH, M.E.; WHITE, M.M. New species and first records of trichomycetes from immature aquatic insects in Idaho. **Mycologia**, v. 104, n.1, p. 295-312, 2012.

BEROVIČ, M. et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **J Biotechnol**, v. 103, n. 1, p. 77-86, 2003.

BERMEJO, A. et al. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat Prod Rep**, v.22, n.2,p.269-303, 2005.

BORTOLUZZI, E. A. **Influência do cloreto de cálcio no tempo de presa, solubilidade, desintegração, pH e atividade antimicrobiana do MTA e do cimento Portland branco com radiopacificador**. 77 f. 2007. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Endodontia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.



BIODENTINE SCIENTIFIC FILE. **Active Biosilicate Technology™, Septodont**. Saint-Maur-des-Fossés, France: R&D Department. 2010.

BISCHOFF, J.F. et al. **A multilocus phylogenetic analysis of the entomopathogenic form genus *Metarhizium***. Mycological Society of America (MSA) Annual Meeting, Hilo, p.4-10, 2005.

BLACKWELL, M.; SPATAFORA, J. W. **Fungi and Their Allies**. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods, Elsevier, p. 7–21, 2004.

BOGEN, G; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: A review and case series. **J Endod**, v.35, n.6, p. 777-90, 2009.

BORGES, W.S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 2008. 350f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BRITO JÚNIOR, M. et al. Biocompatibilidade e capacidade de selamento do agregado de trióxido mineral em perfurações radiculares. **Rev Gauch Odontol**, v.61, suplemento 0, p. 447-52, 2013.

BURJACK, J.R. **Produção de exopolissacarídeos e polissacarídeos de parede celular de leveduras negras de interesse clínico**. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

BURD, A. ; HUANG, L. Carbohydrates and cutaneous wound healing. In: H. G. Garg, M. K. Cowman, C. A. Hales, **Carbohydrate chemistry, biology and medical applications**. Amsterdam: Elsevier Ltd., 2008.

CARBONERO, A.R. et al. Glucans of lichenized fungi: significance for taxonomy of the genera Parmotrema and Rimelia. **Phytochemistry**, v. 66, n. 8, p. 929- 34, 2005.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorável e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Rev Virtual Quim**, v. 5, n.3, p.421-37, 2013.

CHEN, J.; SEVIOUR, R. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. **Mycol Res**, v.111, n.6, p. 635-52, 2007.

COGO, D.M. et al. Materiais utilizados no tratamento das perfurações endodônticas.

RSBO, v. 6, n.2, p. 195-203, 2009.

COOLEY, J. F. **Apparatus for electrically dispersing fluids**. Google Patents, n.692, 1902.

COSTA, E.V.X. et al. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. **J Nat Prod**, v. 73, n.6, p.1180-3, 2010.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de Polímeros em Solução: Parte I: fundamentação Teórica. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 170-17, 2012 .

\_\_\_\_\_. Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte II: Aplicações e Perspectivas. **Polímeros**, v.22, n. 2, p. 178-85, 2012.

COSTA D.D. et al. Agregado de trióxido mineral – uma revisão da sua composição, mecanismo de ação e indicações clínicas. **Rev Saúde Com**. v.8, n.2, p.24-33, 2012.

CUNHA, M.A.A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- $\beta$ -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **J Ind Microbiol Biotech**, v. 39, n.8, p.1179-88, 2012.

DAVIS, R.A. et al. The isolation, structure determination and cytotoxicity of the new fungal metabolite, trichodermamide C. **Bioorg Med Chem**, v.18, n.9, p.2836-9, 2008.

DAVIS, E.C.; SHAW, A.J. Biogeographic and phylogenetic pattern in diversity of liverwort associated endophytes. **Am J Bot**, v. 95, n.8, p.914-24, 2008.

DE BARY, A. Morphology and Physiology of Fungi, Lichens and Myxomycetes. Oxford: The Clarendon Press, 1866. 522p. apud PEIXOTO NETO, A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociência**, n. 29, p. 62-76, 2002.

DENG, C. et al. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of a  $\beta$ -D-glucan isolated from *Dictyophora indusiata*. **Int J Biol Macromol**, v. 51, n.1-2, p. 70-5, 2012.

DOMINATO, A.A.G. **Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium sp* e *Colletotrichum gloeosporioides*: caracterização química e atividade anticoagulante**. 2017. 122f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, São José do Rio Preto. 2017.

DONOT, F. S. et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydr Polym**, v. 87, n.2, p. 951-62, 2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, v.28, n.3, p. 350–6, 1956.

EATON, C.J. et al. Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis. **Plant Physiol**, v.153, n.4, 1780–94, 2010.

EATON, C.J.; COX, M.P.; SCOTT, B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? **Plant Sci**, v.180, n.2, p.190–5, 2011.

EIRAS, C. et al. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Quím Nova**, v. 30, n. 5, p. 1158-1162, 2007.

EBERSBERGER, I. et al. A consistent phylogenetic backbone for the fungi. **Mol Biol Evol**, v. 29, n. 5, p. 1319–34, 2012.

FACUNDO, V.A. et al. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amaz**, v.38, n.4, p.743-8, 2008.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integr Comp Biol**, v. 42, n.2, p. 360-8, 2002.

FAETH, S.H. et al. Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. **J Chem Ecol**, v. 32, n.2, p.307-24, 2006.

FAGUNDES, F.A. et al. *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.1, p.24- 29, 2005.

FANG, J. et al. Structure of a  $\beta$ -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating Dectin-1/Syk/NF- $\kappa$ B signaling. **Glycoconj J**, v. 29, n.5-6, p. 365-77, 2012.

FEITOSA, J. P. A.; CUNHA, P. L. R. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quím Nova**, v. 32, n.3, p. 649-60, 2009.

FILL, T. P. et al. *Preaustinoid A*: a meroterpene produced by *Penicillium* sp. **Acta Crystallogr**, E65, o221, 2009.

FREITAS F.; TORRES C.A.V.; REIS M.A.M., Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresour Technol**, v. 245, part B, p. 1674-83, 2017.

FREITAS, F. et al. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresour Technol**, v. 100, n.2, p. 859–65, 2009.

FUKUDA, E.K. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina Ciênc Agrar**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 117-34, 2009.

FURASTÉ, Pedro Augusto. **Normas técnicas para o trabalho científico**. 18.ed. Porto Alegre: Dáctilo-Plus, 2016.

GAMS, W.; DIEDERICH, P.; OLDMAN, K. P. **Fungicolous fungi**. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 343–92, 2004.

GANDOLFI, M.G. et al. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. **Int Endod J**, v. 43, n.10, 917–29, 2010.

GE, H.M. et al. Penicidones A–C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v. 69, n.2, p.571–6, 2008.

GERIS, R. et al. Four additional meroterpenes produced by *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. Possible biosynthetic intermediate to Austin. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, v. 62b, p. 1-9, 2007.

GOMES-FIGUEIREDO, J. et al. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Can J Microbiol**, v. 53, n.10, p.1123 –32, 2007.

GRABAUM, J.H. et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled nutritional study using an insoluble yeast beta-glucan. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n.6, p. 738-46, 2012.

GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 69, n.4, p. 375–84, 2005.

GUERRINI L.M., BRANCIFORTI M.C., CANOVA T., BRETAS R.E.S. Electrospinning and characterization of polyamide 66 nanofibers with different molecular weights. **Mat Res**, v.12, n.2, p.181-90, 2009.

GLIENKE, C. et al. Antimicrobial activity of endophytes from Brazilian medicinal plants. In: **Antimicrobial agents**. InTech, 2012.

GUIMARÃES, D.O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 236f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2006.

GUIMARÃES, A. C. et al., Investigação preliminar da composição micelial e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da erva-de-passarinho amazônica *Cladocolea micrantha* (Eichler) Kujit (Loranthaceae). **Revista Fitos**, v.4, n.2, 2009.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **J Nat Prod**, v.69, n.3, p.509-26, 2006.

GUO, L. et al. Chemical Composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. **Molecules**, v.13, n.9, p.2114-25, 2008.

HARADA, N. S. **Desenvolvimento de membranas compósitas de poliuretano pelo processo de eletrofição**. 97f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

HARPER, J. K. et al. Pestacin; a 1-3dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis* microspore possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HASHEM, A.A.; HASSANIEN, E.E. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: sealability study. **J Endod**, v. 34, n.1, p.59–61, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1n5 million species estimate revisited. **Mycol Res**, v.105, n.12, p.1422–31, 2001.

HIBETT, D.S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res**, v. 111, n. 5, p. 509–47, 2007.

HYDE, K.D. et al. *Pestalotiopsis* – morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**. v. 50, p.167-187, 2011.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Mol Phylogenetics Evol**, v.25, n.3, p.378–92, 2002.

JI, H.F., LI, X.J.; ZHANG, H.Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Rep**, v. 10, n.3, p.194–200, 2009.

KARAKAYA, A. First report of infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. **Plant Dis Notes**, v. 85, n.9, p.1028, 2001.

KATSAMAKIS, S. et al. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 40, n.4, p.334–44, 2013.

KHARWAR, R.N. et al. Anti-cancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat Prod Rep**, v. 28, p.1208–28, 2011.

KHIDIR.H.H. et al. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. **J Arid Environ**, v. 74, p. 35-42, 2010.

KIM, H.S. et al. Stimulatory effect of  $\beta$ -glucans on immune cells. **Immune Netw**, v. 11, n.4, p. 191-15, 2011.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Curr Opin Plant Biol**, v. 9, n.4, p. 358-63, 2006.

KOUBI, G. et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth – a prospective study. **Clin Oral Invest**, v.17, n.1, p.243-9, 2013.

KUO, R.Y.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; TENG, C.M.; YEN, H.F.; WU, Y.C. Antiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v.57, n.3, p. 421-5, 2001.

KRINGS, M. et al. A late pennsylvanian fungal leaf endophyte from grand-croix, france. **Rev Palaeobot Palynol**, v. 156, p. 449-53, 2009.

KRUPP, C. et al. Treatment outcome after repair of root perforations with mineral trioxide aggregate: a retrospective evaluation of 90 teeth. **J Endod**, v.39, n.11, p.1364-8, 2013.

KRUSCHEWSKY, M.C.; LUZ, E.D.M.N; BEZERRA, J.L. O gênero *Pestalotiopsis* (Ascomycota, 'Coelomycetes') no Brasil. **Agrotropica**, v. 26, n.2, p. 89 – 98, 2014.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. **Chem Biol**, v. 19, n.7, p. 792-8, 2012.

KUSARI, S. et al. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. **Fungal Ecol**, v. 4, p.219–23, 2011.

LAM, K.; CHEUNG, P. C. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, p. 45-64, 2013.

LAURENT, P. et al. Induction of specific cell responses to a  $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$  - based posterior restorative material. **Dent Mater**, v. 24, n.11, p.1486-94, 2008.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKERJEE, B.; MUKERJEE, R. The phytochemistry of Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LEUNG, M.Y.K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunol Lett**, v.105, n.2, p.101–14, 2006.

LI, J.Y. et al. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohesenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp and *Monochaetia* sp., **Phytochemistry**, v.56, p.463-8, 2001.

LOBÃO, A.Q.; MELLO-SILVA, R.; FORZZA, R.C. Guatteria (Annonaceae) da Floresta Atlântica. **Rodriguésia**, v.63, p. 1039-106, 2012.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 47-88.

LIU J. et al. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydr Polym**, v. 157, n. 10, p. 1113-24, 2017.

LOU, D.; XING, J.; DENG, H. Two new compounds from na endophytic fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. **J Asian Nat Prod Res**, v.13, n.12, p.1069-73, 2011.

LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrihum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Sci**, v.151, p.67-73, 2000.

LU, Y. et al. Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, v. 8, p. 654-677, 2016.

MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O. **Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias**. In: Esposito, E., de Azevedo, J. L. (Eds.), *Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia*, EDUCS, p. 451–490, 2004.

MAEDA, H. et al. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expres- sion and calcification in human periodontal ligament cells. **J Endod**, v. 36, 647– 52, 2010.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. **Microbiol Insights**, v. 6, p. 1-16, 2013.

MALAFAYA, P.B; SILVA, G.A; REIS, L.R. Adv. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Drug Delivery Rev**. v. 59, p. 207-233, 2007.

MAPPERSON, R.R. et al. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia sp.* endophytes isolated from australian dry rainforests. **Curr Microbiol**, v. 68, p.30–7, 2014.

MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R.; RAVIRAJA, N.S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **J Agr Sci Tech**, v.1, p.67-80, 2005.

MARCON, E.L. **Fungos endofíticos de *Pothomorphe peltata* e *Peperomia pellucida*: caracterização, metabólitos secundários e atividades biológicas.** 2013. 96f. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MAAS, P.; RAINER, H., LOBÃO, A. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Rev Microbiol**, São Paulo, v.30, p.77-84, 2009.

MILLER, J.D. et al. Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. **Phytochem**, v. 71, p.760-5, 2010.

MINAMI, P.S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses.** Barueri: Manole, 2003. 199 p.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE-MIO, L. L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Cienc Agrotec**, v. 33, n. 2, p. 405-11, 2009.

MORICCA, S.; RAGAZZI, S. **Phytopathology**, v. 98, n.3, p.80-6, 2008.

NAIK, R.M.; PUDAKALKATTI, P.S; HATTARKI, S.A. Can MTA be: Miracle trioxide aggregate? **J Indian Soc Periodontol**, v.18, p.5-8, 2014.

NASCIMENTO, F.C. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Quím Nova**, v. 26, p.319-322, 2003.

NETALA, V.R. et al. Biogenesis of silver nanoparticles using endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* and evaluation of their antioxidant and anticancer activities. **Int J Nanomedicine**, v.11, p.5683-96, 2016.

NOVAK, M; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endoc Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 9, p. 67-75, 2009.



NOGUEIRA, I. **Atividade antibacteriana e citotoxicidade do agregado de trióxido mineral associado a diferentes concentrações de clorexidina**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

OLIVEIRA, R.L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum***. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

OLIVEIRA, M.N.V. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *coffea arabica* from southeastern Brazil. **Can J Microbiol**, v.59, n.4, p. 221-30, 2013.

ORLANDELLI R.C. et al.  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3,1  $\rightarrow$  6)-d-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **Int J Biol Macromol**, v. 94, p. 431-37, 2017.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol Adv**, v.22, n.3, p. 189 – 259, 2004.

PATEL, K. et al. Comparing gray and white mineral trioxide aggregate as a repair material for furcation perforation: an in vitro dye extraction study. **J Conserv Dent**, v.8, n.10, p.ZC70-ZC73, 2014.

PAVLOVA, K.; PANCHEV, I.; HRISTOZOVA, T. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. **World J Microbiol Biotechnol**, v.21, p.279–83, 2005.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciênc Desenv**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **BLACPMA**, v.3, n.4, p.69-72, 2004.

PESSONI, R.A.B. et al. Cell-wall structure and composition of *Penicillium janczewskii* as affected inulin. **Mycologia**, v. 97, n. 2, p. 304-11, 2005.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production and substrate utilization in Endophytic fungi. **Nat toxins**, v.1, p.188-96, 1992.

PINHEIRO, J.B. **Fungos produtores de exopolissacarídeos e suas aplicações funcionais e industriais**. 2014. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado

Interdisciplinar em Biosistemas), Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, 2014.

PINTO, A.C. et al. Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Quím Nova**, v. 25, p.45-51, 2002.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quím Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-71, 2015.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annu Rev Phytopathol**, v. 49, p. 291–315, 2011.

PROKSCH P et al. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Tetrahedron Lett**, v. 52, n.1, p.21-5, 2011.

REIS, C. N. ***Annona muricata*: análise química e biológica dos frutos de gravioleira**. 150f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2011.

RENEKER, D.H., YARIN, A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v. 49, p. 2387 - 2425, 2008.

REKHA, K.J; MANJU, B.; ARYA, V. Endophytic fungus: a potential source of biologically synthesized nanoparticle. **Basic Res J Microbiol**, v.1, n.1, p. 1-7, 2013.

ROBERTS, H.W. et al. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. **Dent Mater**, v.24, p.149–64, 2008.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular mechanisms of traffic of fungal molecules to the extracellular space. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n.4, p.414-20, 2013.

RODRIGUEZ, R.J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytol**, v. 182, p. 314–30, 2009.

ROSA, L.H. et al. Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia Antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biol**, v. 32, p.161-7, 2009.

RUSSELL, J.R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Appl Environ Microbiol**, v.77, n.17, p. 6076–84, 2011.

SAIKKONEN, K.; ION, D.; GULLENBERG, M. Proceedings of the royal society. **Biol Sci**, v. 269, p.1379-403, 2002.

SAITO, M.L. **Fitoquímica de *Annona cacans* Warming e quimiossistemática de *Annonacia jussieu***, 220f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1990.

SARANGI, I. et al. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **Int Immunopharmacol**, v. 6, p. 1287-97, 2006.

SALLES, G.N.; ZANIN, H.; LOBO, A.O. **A importância da eletrofição para a produção de nanomateriais**. XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência – Universidade do Vale do Paraíba, 2016.

SCHARDL, C.L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M.J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annu Rev Plant Biol**, v.55, p.315–40, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol Res**, v. 109, p.661-86, 2005.

SEIFERT, K. et al. **The genera of Hyphomycetes**. Utrecht, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2011.

SELIM, K.A. et al. Biology of endophytic fungi. **Curr Res Environ Appl Mycol J Fungal Biol**, v. 2, n.1, p. 31–82, 2012.

SELL, S.A. et al. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. **Polymers**, v. 2, p.522-553, 2010.

SHEARER, C.A. et al. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodivers Conserv**, v. 16, p. 49-67, 2007.

SIEW, K. et al. Treatment outcome of repaired root perforation: a systematic review and meta-analysis. **JOE**, v. 41, n.11, p.1795-804, nov. 2015

SILVA, M.L.C. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Quim Nova**, v. 29, n. 1. p. 85-92, 2006.

SILVA, M.A.M. **Propriedades físico-químicas e biológicas de cimento experimental à base de Portland associado à diferentes radiopacificadores**. 153p. 2014. Tese. (Doutorado em Ciências Odontológicas Aplicadas) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2014.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Coagulação: Visão Laboratorial da Hemostasia Primária e Secundária**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

SILVA, I.P da. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, v.10, n.18, p. 3888-905, 2014.

SILVA, C.J.A. da; MALTA, D.J.N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde FACIPE**, v. 2, n.3, p.49-66, jul. 2016.

SILVA, R.L.O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Bot Bras**, v.20, p. 649-655, 2006.

SINKAR, R.C. et al. Comparison of sealing ability of ProRoot MTA, RetroMTA, and Biodentine as furcation repair materials: An ultraviolet spectrophotometric analysis. **J Conserv Dent**, v.18, p.445-8, 2015.

SIQUEIRA, P.C et al. Propriedades antimicrobianas e físico-químicas do cimento portland associado a diferentes concentrações de óxido de cálcio. **Rev Odontol Bras Central**, v. 26, p. 20-25, 2017.

SMIRDELE, F.R. et al. D. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1-6)- $\beta$ -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v.94, p. 91-9, 2013.

SOLTANIAN, S. et al. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, p. 109-38, 2009.

SOMENSE, F.Y.G. **Bioprodução de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucana e obtenção de derivado por carboximetilação visando atividade biológica**. 2014. 97f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

SOUZA, A.Q.L. de. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amaz**, v. 34, n.2, p.185-95, 2004.

SOUZA, A.Q.L. de. **Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

SOUZA, M.P. et al. **Isocromofilona VI isolada de *Penicillium sclerotiorum*: um fungo endofítico de *Duguetia stelechantha* (Annonaceae)**. 52° Congresso Brasileiro de Química. Recife, 2012.

SOUZA, L. C. de et al. Analysis of radiopacity, pH and cytotoxicity of a new

bioceramic material. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 4, p. 383-9, 2015.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.16, n.4, p.345-51, 2014.

SPIPELLER, M.; KUSARI, S.; HERTWECK, C. Chemical ecology of endophytic fungi:origins of secondary metabolites. **Chem Biol**, v.19, n.17, p. 792-8, 2012.

STEPHENSON, S. L. **The kingdom fungi**. Portland Oregon USA: Timber Press, 2010.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.R. **Endophytic fungi**. In MUELLER, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

STROBEL, G.A. Rain forest endophytes and bioactive products. **Crit Rev Biotechnol**, v. 22, n.4, p. 315-33, 2002.

STROBEL, G.A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Prod**, v.67, p.257-68, 2004.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.67, p. 491- 502, 2003.

STROBEL, G. A.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, 142: 435–440 1996.

SURYANARAYANAN, T.S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biol Rev**, v. 23, p.9-19, 2009.

TASCO, Á.J.H. **Investigação microbiológica, condições de crescimento e potencial metabólico para a busca de produtos naturais bioativos no fungo endofítico *Cladosporium* sp. (AC-1) isolado de *Annona cacans* (Annonaceae)**. 2016. 193f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. 2016.

TEITEN, M.H. et al. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF-kB activity. **Bioorg Med Chem**, v.21, p.3850–8, 2013.

TORABINEJAD, M. et al. Sealing ability of a Mineral Trioxide Aggregate when used as a root-end filling material. **J Endod**, v. 19, p. 591–5, 1993.

TORABINEJAD M, HONG CU, McDONALD F, PITT FORD TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod**, v.21, p. 349-53, 1995.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J Endod**, v.36, n.1, p.16-27, 2010.

TOURE, B; FAYE, B.; KANE, A.W. Analysis of reasons for extraction of endodontically treated teeth: a prospective study. **J Endod**, v.37, p.1512–5, 2011.

TSESIS, I. et al. Prevalence and associated periodontal status of teeth with root perforation: A retrospective study os 2002 patients medical records. **J Endod**, v.36, n.5, p 797-800, 2010.

TSESIS, I.; FUSS, Z.V. Diagnosis and treatment of accidental root perforations. **Endod Topics**, v.13, p.95-107, 2006.

VIDAL, S.; JABER, R.L. Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: do endophytes induce extraflora-mediated defences in *Vicia faba*? **Func Ecol**, v. 23, p.707-14, 2009.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIJAYKRISHNA, D.; HYDE, K.D. 2006. Inter- and intra stream variation of lignicolous freshwater fungi in tropical Australia. **Fungal Diversity**, v. 21, n.1, p.203-24, 2006.

WALI, R.P. et al. Endophyte infection, nutrient status of the soil and duration of snow cover influence the performance of meadow fescue in subarctic conditions. **Grass and For Sci**, v. 63, p.324-30, 2008.

WILL-WOLF, S. et al. **Lichenized fungi**. In: Mueller, G. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods, Elsevier, pp. 173–95, 2004.

ZHANG, H. et al. Preparation and bioactivity of exopolysaccharide from an endophytic fungus *Chaetomium sp.* of the medicinal plant *Gynostemma pentaphyllum*. **Phcog Mag**. v. 13, p. 477-82, 2017.

YAN, J. F. et al. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically?. **Fungal Ecol**, v. 13, p. 53-9, 2015.

YANG, X.L.; ZHANG, J.Z.; LUO, D.Q. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Nat Prod Rep**, v.29, n.6, p.622-41, 2012.

YANG, M. et al. Study on *Angelica sinensis* endophytic fungi and antibacterial activity. **Adv Mater Res**, v. 641-2, p.816-9, 2013.

YUE, Q. et al. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichoe festucae*. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 4687-92, 2000.

ZABULYTE, D. et al. Experimental studies of possible modulative effect of  $\beta$ -glucan on mice lung carcinogenesis. **Veterinarija ir zootechnika**, v. 81, 2012.

ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M.M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis?. **Quím Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1533-9, 2013.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Report**, v. 23, n. 5, p. 753-71, 2006.

ZHANG, Z. et al. Degradation and the antioxidant activity of polysaccharide from *Enteromorpha linza*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2084- 7, 2013.

ZHENG Y.; MONTY, J.; LINHARDT, R.J. Polysaccharide-based nanocomposites and their applications. **Carbohydr Res**. v. 20, n. 405, p.23–32, 2015.

ZHOU, L. et al. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Lett App Microbiol**, v. 46, p.68-72, 2008.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395-410, 2012.

ZYCOVA, S.N. et al. Macrophage stimulating agente soluble yeast  $\beta$ - 1,3/1,6-glucan as a topical treatment of diabetic foot and leg ulcers: a randomized, double blind, placebo-controlled phase II study. **J Diabetes Investig**, v.5, n.4, p.392-9, 2013.