



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS - ICTA  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BCB**

**RAYANE BONFIM FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.  
(IRIDACEAE)**

**SANTARÉM – PARÁ  
2023**

**RAYANE BONFIM FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.  
(IRIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Ciências Biológicas para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas.

Orientadora: Dra. Eveleise Samira Martins Canto.  
Coorientadora: Aysla Mclane Lobato dos Santos.

**SANTARÉM – PA  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

- F383i Ferreira, Rayane Bonfim  
Identificação e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos isolados da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae)./ Rayane Bonfim Ferreira. – Santarém, 2023.  
66 p.: il.  
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Eveleise Samira Martins Canto.  
Coorientadora: Aysla Mclane Lobato dos Santos.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Curso Bacharelado em Ciências Biológicas.
1. Atividade biológica. 2. Marupazinho. 3. Isolamento fúngico. I. Canto, Eveleise Samira Martins, *orient.* II. Santos, Aysla Mclane Lobato dos, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 571.295


---

**RAYANE BONFIM FERREIRA**

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA ESPÉCIE *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.  
(IRIDACEAE)**


Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado em Ciências Biológicas para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará. Área de concentração: Microbiologia.

Conceito: Aprovada.  
Data de Aprovação: 15/06/2023.

Documento assinado digitalmente  
 EVELEISE SAMIRA MARTINS CANTO  
Data: 27/06/2023 11:25:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Dra. Eveleise Samira Martins Canto – Orientadora  
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente  
 GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNAN  
Data: 26/06/2023 16:54:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Graciene do Socorro Taveira Fernandes  
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente  
 MARCOS DIONES FERREIRA SANTANA  
Data: 26/06/2023 14:39:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Marcos Diones Ferreira Santana  
Universidade Federal do Oeste do Pará

**SANTARÉM – PA  
2023**

À Deus, por sempre guiar meus passos. À  
minha família, fonte de inspiração e amor. Ao  
meu companheiro, por todo amor.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu sustento e fonte de fortaleza, para que eu pudesse persistir diante de todos os obstáculos encontrados. Por sempre guiar meus passos. E por todas as bênçãos concedidas diante dessa trajetória.

Aos meus pais Altenice e Bibiano, minhas outras fontes de forças, por todo amor, por sempre estarem ao meu lado, apoiando e incentivando meus sonhos. E mais do que tudo, são minhas fontes de inspiração.

Aos meus irmãos Anderson, Ândrio e Andrey, pelo incentivo e carinho. As conquistas diárias e a coragem de vocês, me inspiram a correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu companheiro e amigo Fabrício, por toda paciência, amor, carinho e dedicação. Por não medir esforços para me ver feliz e realizar meus sonhos. Por sempre despertar o melhor de mim.

À minha orientadora, Professora Dra. Eveleise, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e incentivo. Me sinto imensamente grata por você ter aberto a porta dessa imensidão que é o Mundo dos fungos, por estar trabalhando com algo tão prazeroso. E pelos frutos colhidos, a partir dessa oportunidade. Obrigada pela confiança depositada em mim.

À minha coorientadora, Aysla, por todo o ensinamento, paciência e dedicação. Por não medir esforços para realizar cada etapa desse trabalho. Pela amizade, por sempre me transmitir calma, energias positivas e acreditar no meu potencial. Minha admiração e gratidão por você, são imensas. Certamente minha trajetória será marcada por todo conhecimento e amor pelos fungos que você repassou a mim.

Às colegas do Laboratório de Micologia e Bioensaios (LAMIB), pela troca de experiências ao longo desse percurso. Em especial, as colegas Ana Luiza, Aline, Graciely, Nayra e Thaís, pela amizade, por sempre estarem dispostas a me ajudar com o trabalho todas as vezes que precisei, pelo companheirismo, pelo carinho, e por todas as risadas e desabafos. Vocês fazem o trabalho ficar mais leve e descontraído, diminuindo o peso do processo.

Ao colega e amigo Anderson, pelo suporte e disponibilidade a me ajudar e pelos momentos de descontração.

À colega Paula, pela amizade, pelos lanches e momentos de descontração no laboratório.

Aos técnicos do LABIO Gilmara e Cleberson, pela disponibilidade.

Aos técnicos Bruna e Jeosafá, por todo o suporte na realização dos experimentos.

Ao LGI, em especial ao Leandro, pelo suporte e orientação para realizar a extração de DNA.

Ao LABAC, por dispor de seus equipamentos auxiliando na realização dos experimentos.

Ao Professor Miércio, pela contribuição no trabalho.

À Professora Dra. Graciene Fernandes e ao Professor Dr. Marcos Santana, por terem aceitado ao convite para participar da banca avaliadora.

À Universidade Federal do Oeste do Pará.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta.

## RESUMO

As plantas da flora brasileira possuem um grande potencial na produção de novas substâncias antimicrobianas, como *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), por exemplo. Essa espécie é facilmente encontrada na região Amazônica brasileira, onde é conhecida popularmente como “Marupazinho”, e utilizada na medicina popular para fins terapêuticos, além de possuir propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, anti-inflamatórias e analgésicas. Associados a essas plantas estão os microrganismos endofíticos, como alguns fungos que habitam os tecidos internos dessas plantas sem causar danos aparentes, além de serem responsáveis pela produção de metabólitos secundários com potencial bioativo. Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo isolar e identificar fungos endofíticos associados a *E. bulbosa* com potencial de produzir de substâncias com atividade antimicrobiana. As amostras de *E. bulbosa* foram coletadas em três pontos localizados no município de Santarém, Pará, as quais foram submersas em soluções desinfetantes e tiveram partes das folhas, bulbos e raízes fragmentadas (5 mm de tamanho) e inoculadas em meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA), acrescido de antibiótico Cloranfenicol (0,05 g/L) para isolamentos dos fungos. As cepas obtidas, foram caracterizadas macroscópica e microscopicamente e submetidas a identificação molecular. Foram isolados 65 fungos endofíticos distribuídos em 17 morfotipos, dos quais 10 cepas foram selecionadas e cultivadas em meio líquido Caldo Batata Dextrose (CDB) para a obtenção do caldo metabólito bruto. A atividade antimicrobiana foi testada por meio da técnica de *pour-plate* em difusão em poços de 5 mm de diâmetro contra linhagens padrão American Type Culture Collection – ATCC (*Candida albicans* ATCC 60193, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecium* ATCC6560, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 33591). Do total de fungos isolados, oito táxons foram elucidados, sendo o gênero *Muyocopron* Speg. foi o mais frequente (21,54%). Das 10 cepas submetidas ao teste de atividade antimicrobiana, cinco apresentaram halos de inibição em pelo menos uma das cepas testadas (*Fusarium* (Link), *Muyocopron* (Speg.), *Paecilomyces* (Bainier), *Penicillium* (Link), *Phaeoacremonium* (W. Gams)). Por meio deste estudo foi possível conhecer parte da diversidade de fungos endofíticos cultiváveis associados a *E. bulbosa*, além de sugerir que essa espécie vegetal pode apresentar uma comunidade endofítica própria, maior que a observada e com potencial antimicrobiano ainda desconhecido.

**Palavras-chave:** Atividade biológica, Marupazinho, Isolamento fúngico.



## ABSTRACT

The plants of the Brazilian flora have a great potential in the production of new antimicrobial substances, such as *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), for example. This species is easily found in the Brazilian Amazon region, where it is popularly known as “Marupazinho”, and used in folk medicine for therapeutic purposes, in addition to having antimicrobial, antiparasitic, anti-inflammatory and analgesic properties. Associated with these plants are endophytic microorganisms, such as some fungi that inhabit the internal tissues of these plants without causing apparent damage, in addition to being responsible for the production of secondary metabolites with bioactive potential. Thus, the present work aims to isolate and identify endophytic fungi associated with *E. bulbosa* with the potential to produce substances with antimicrobial activity. *E. bulbosa* samples were collected at three points located in the municipality of Santarém, Pará, which were submerged in disinfectant solutions and had parts of leaves, bulbs and roots fragmented (5 mm in size) and inoculated in Potato Agar culture medium Dextrose (BDA), plus the antibiotic Chloramphenicol (0.05 g/L) for fungal isolation. The strains obtained were characterized macroscopically and microscopically and subjected to molecular identification. Sixty-five endophytic fungi distributed into 17 morphotypes were isolated, of which 10 strains were selected and cultivated in Dextrose Potato Broth (CDB) liquid medium to obtain the crude metabolite broth. The antimicrobial activity was tested using the pour-plate technique in diffusion in wells of 5 mm in diameter against standard strains American Type Culture Collection – ATCC (*Candida albicans* ATCC 60193, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecium* ATCC6560, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 33591). Of the total of fungi isolated, eight taxa were elucidated, being the genus *Muyocopron* Speg. was the most frequent (21.54%). Of the 10 strains submitted to the antimicrobial activity test, five showed inhibition halos in at least one of the tested strains (*Fusarium* (Link), *Muyocopron* (Speg.), *Paecilomyces* (Bainier), *Penicillium* (Link), *Phaeoacremonium* (W. Gams)). Through this study, it was possible to know part of the diversity of cultivable endophytic fungi associated with *E. bulbosa*, in addition to suggesting that this plant species may have its own endophytic community, larger than that observed and with antimicrobial potential still unknown.

**Keywords:** Biological activity, Marupazinho, Fungal isolation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Metodologia de coleta, isolamento, purificação, preservação e identificação dos fungos endofíticos..... 22
- Figura 2-** Mapa da localização dos pontos de coleta..... 23
- Figura 3-** Esquema da higienização do vegetal..... 24
- Figura 4-** Fragmentos de folhas (A), bulbos (B) e raízes (C), em meio de cultivo BDA..... 25
- Figura 5-** Crescimento fúngico a partir da inoculação de fragmentos de folhas..... 25
- Figura 6-** Preservação em Castellani (A e B) e em tubos de ensaio com meio BDA inclinado (C e D) dos isolados obtidos..... 26
- Figura 7-** Exsiccatas depositadas no HSTM (A e B) ..... 29
- Figura 8-** Número de isolados de fungos endofíticos de *Eleutherine bulbosa* em diferentes partes da planta distribuídos pelos pontos amostrados..... 30
- Figura 9-** Culturas de fungos endofíticos filamentosos obtidas dos isolamentos dos fragmentos de *Eleutherine bulbosa*..... 31
- Figura 10-** Caracterização macroscópica e microscópica dos gêneros *Muyocopron* (A, B e C), *Penicillium* (D, E e F), *Fusarium* (G, H e I), *Phaeoacremonium* (J, K e L) e *Paecilomyces* (M, N e O)..... 32
- Figura 11-** Ocorrência de fungos endofíticos isolados de *Eleutherine bulbosa*..... 35
- Figura 12-** Espécies compartilhadas entre os pontos de coletas – Diagrama de Venn..... 36
- Figura 13-** Espécies compartilhadas entre as partes do vegetal – Diagrama de Venn..... 37

### CAPÍTULO 2

- Figura 1-** Metodologia da fermentação e obtenção dos caldos metabólitos brutos para teste antimicrobiano..... 52
- Figura 2-** Obtenção dos caldos metabólitos brutos: fungos inoculados em meio líquido CDB (A); isolado após 14 dias de fermentação (B); filtração a vácuo (C); caldos metabólitos brutos armazenados em frascos graduados (D e E) ..... 53
- Figura 3-** Halos de inibição do fungo endofítico do gênero *Penicillium* frente as cepas de bactérias: *Enterococcus faecium* gram-positiva (A) e *Pseudomonas aeruginosa* gram-negativa (B)..... 56

<b>Figura 4-</b> Halos de inibição do endófito <i>Phaeoacremonium</i> frente a cepa bacteriana gram-negativa <i>Escherichia coli</i> .....	57
<b>Figura 5-</b> Halos de inibição do endófito <i>Paecilomyces</i> frente a cepa bacteriana gram-positiva <i>Enterococcus faecium</i> .....	58
<b>Figura 6-</b> Halos de inibição do endófito <i>Muyocopron</i> frente a cepa bacteriana gram-positiva <i>Enterococcus faecium</i> .....	59

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1-** Frequência absoluta e frequência relativas dos táxons encontrados..... 34

**Tabela 2-** Caracterização Macroscópica dos isolados cultiváveis obtidos de *Eleutherine bulbosa*..... 67

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1-** Média dos halos de inibição em (mm) dos caldos metabólitos brutos dos isolados fúngicos de *Eleutherine bulbosa*..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Ágar Batata Dextrose
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
°C	Graus Celsius
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HSTM	Herbário de Santarém
ITS	Internal Transcribed Spacer
LABIO	Laboratório de Ensino Multidisciplinar em Biologia Aplicada
LAMIB	Laboratório de Micologia e Bioensaios
mm	Milímetros
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimerase Chain Reaction
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
rpm	Rotações por minuto
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
v/v	Volume por volume
μL	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I- IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS DE <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill) Urb. (IRIDACEAE) .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Introdução .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Objetivos.....</b>	<b>21</b>
1.3.1 Geral .....	21
1.3.2 Específicos.....	21
<b>1.4 Metodologia.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Coleta do espécime vegetal <i>Eleutherine bulbosa</i> .....	22
1.4.2 Identificação taxonômica do vegetal e depósito de exsicata .....	23
1.4.3 Preparo das amostras vegetais e isolamento dos fungos .....	23
1.4.4 Preservação dos isolados fúngicos .....	26
1.4.5 Identificação Macroscópica e Microscópica dos fungos.....	26
1.4.6 Identificação Molecular.....	27
<b>1.5 Resultados e Discussão .....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Coleta e identificação taxonômica das plantas coletadas .....	28
1.5.2 Isolamento dos fungos endofíticos .....	29
1.5.3 Agrupamento morfológico, análise taxonômica e identificação molecular .....	30
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO II- FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb., PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>49</b>
<b>2.2 Objetivos.....</b>	<b>51</b>
2.2.1 Geral.....	51
2.2.2 Específicos.....	51
<b>2.3 Metodologia.....</b>	<b>52</b>
2.3.1 Isolamento dos fungos endofíticos .....	52
2.3.2 Fermentação das culturas fúngicas para obtenção do caldo metabólito bruto .....	53
2.3.3 Cepas testes .....	54
2.3.4 Determinação da atividade antimicrobiana .....	54
2.3.5 Análise de dados.....	55
<b>2.4 Resultados e Discussão .....</b>	<b>55</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>61</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>67</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas medicinais são uma das principais fontes de produtos naturais, caracterizada pela grande variedade de metabólitos secundários que sintetizam (ATANASOV *et al.*, 2015). Essas plantas são utilizadas por comunidades tradicionais como medicamentos, prática conhecida como fitoterapia (LÓCIO, 2019). A região Amazônica é reconhecida por sua ampla diversidade biológica, possuindo diversos ecossistemas, uma rica diversidade de plantas capazes de gerar fitoterápicos a partir de seus extratos, tintas, óleos essenciais e outros (PETROVSKA, 2012; SILVA *et al.*, 2015).

Os produtos naturais são resultado de moléculas orgânicas produzidas por organismos vivos, que possuem uma alta diversidade química (PADMAVATHY e SARAVANAN 2017; MACEDO, 2022). Além disso, uma planta pode hospedar uma grande diversidade de microrganismos endofíticos característicos e comumente específicos a ela (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012). Tendo em vista também, o uso de recursos biológicos obtidos a partir da prospecção de origem vegetal associada ao de origem microbiana como excelentes produtores de fármacos (SOUSA, 2021). O que tem sido um grande desafio dada a resistência de patógenos aos fármacos atualmente disponíveis sem a mesma eficácia (ALEFAN, 2016; MAIA *et al.*, 2021).

A família Iridaceae são monocotiledôneas amplamente distribuída, possuindo cerca de 65 gêneros e 2000 espécies (MARTÃO, 2013). No Brasil, o táxon possui aproximadamente 190 espécies em 23 gêneros registrados, entre estes, o gênero *Eleutherine* Herb., nativo da América e caracterizado por agrupar plantas bulbosas, onde pode-se encontrar a espécie *E. bulbosa* (Mill.) Urb. (ZAPNI, 2015). *E. bulbosa* é uma planta herbácea, que apresenta bulbos cor de vinho, semelhantes a uma cebola por apresentar várias camadas, que quando cortadas liberam um suco branco, possui folhas inteiras e plissadas e flores brancas (PADHI e PANDA, 2015; SHI *et al.*, 2019; MUNAENI *et al.*, 2019). Além disso, possui um elevado potencial medicinal bastante explorado na região Amazônica, sendo uma das poucas espécies da família Iridaceae utilizadas para fins medicinais como problemas intestinais, amebíase, anemia e câncer, por exemplo (HANH *et al.*, 2018). Suas principais atividades biológicas estão associadas a uma variedade de compostos metabólitos secundários presentes em sua composição química, apresentando flavonoides, naftalenos, quinonas e taninos (KAMARUDIN *et al.*, 2021; VALE *et al.*, 2020).

O Reino Fungi compreende um dos cinco reinos descritos por Whittaker em 1969 (AZEVEDO, 2010). Os fungos são seres eucariotos, heterotróficos unicelulares ou



pluricelulares apresentando características macroscópicas e microscópicas (AZEVEDO e BARATA, 2018). Encontrados em diferentes ambientes, como solo, água, ar, animais e plantas (MANOHARACHARY *et al.*, 2016). A grande diversidade de espécies desse reino está descrita em associação com diferentes plantas, pertencendo aos filos Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (CARVALHO *et al.*, 2012), possuindo grande importância ecológica (GUPTA *et al.*, 2020) e conhecidos como fungos endofíticos. O termo endófito deriva do grego “*endon* = dentro e *phyton* = planta”, utilizado pela primeira vez por Bary em 1866, definido como fungos que vivem no interior dos tecidos das plantas, sem causar danos visíveis ao seu hospedeiro (HUGHES, 2016; BOGAS *et al.*, 2020; CORREIA *et al.*, 2018). Estima-se que a diversidade de fungos endofíticos compreenda 7% do total de cerca de 1,5 milhões de espécies presentes em todo o planeta (CHOWDHARY *et al.*, 2015; ABREU *et al.*, 2015).

Os fungos endofíticos podem colonizar diferentes órgãos vegetais desde folhas, caules, cascas, frutos, flores (SILVA, 2014; STEPNIEWSKA e KUZNIAR, 2013; FELBER *et al.*, 2016) e raízes, sendo esta uma das principais portas de entrada (MELO, 2017; WHITE *et al.*, 2019). Essa colonização ocorre de acordo com o habitat do seu hospedeiro, como os fungos residentes do solo ou dos esporos transportados pelo ar e de processos resultantes da alimentação dos herbívoros presentes no ambiente (MANZOTTI *et al.*, 2020). Além disso, a colonização dos endofíticos ocorre por duas vias principais, transmissão vertical e transmissão horizontal (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). A transmissão vertical ocorre pela transferência dos fungos endofíticos residentes das plantas maternas para as suas sementes (VANDANA *et al.*, 2021). Já a transmissão horizontal ocorre pela colonização dos tecidos internos dos vegetais de esporos por meio de aberturas naturais ou aberturas causadas por agentes bióticos ou abióticos (ALIBRANDI *et al.*, 2020).

Durante o crescimento desses fungos dentro dos tecidos vivos das plantas, algumas relações complexas com suas plantas hospedeiras são estabelecidas, como síntese, degradação e acúmulo de metabólitos secundários (MULLER *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2017). Essa relação simbiótica com a planta hospedeira, ocorre devido a produção de compostos capazes de atribuir resistência a planta contra patógenos, regulação de crescimento, além de aumentar o seu desenvolvimento (CHEN *et al.*, 2016; KUMAR e VERMA, 2018; YAN *et al.*, 2019; GUPTA *et al.*, 2020). A população endofítica presente na planta, varia entre um ou mais microrganismos, dependendo do estado de saúde da hospedeira (VAZ, 2012).

Os metabólitos secundários dos fungos endofíticos podem estar relacionados diretamente com as propriedades presentes no vegetal (SILVA, 2017). O que torna cada vez

mais crescente o número de estudos realizados para discutir a diversidade, ecologia e aplicações biológicas desses microrganismos associados as plantas medicinais, os quais foram considerados fontes alternativas e promissoras para a obtenção de metabólitos bioativos (ALY *et al.*, 2011). A partir do isolamento e cultivo de fungos endofíticos, compostos bioativos são encontrados, como os antibióticos, que podem inibir ou matar diversos agentes causadores de doenças, como bactérias, fungos, vírus e protozoários (BANO *et al.*, 2016; DANTAS, 2017), além de possuírem também atividades imunossupressora, antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, anti-inflamatória e antioxidante (TCHAMGOUE *et al.*, 2020; ADELEKE; BABALOLA, 2021) que podem ser produzidos em grande escala após seu isolamento (SUDHA *et al.* 2016).

Os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultura a partir do crescimento e diferenciação de um organismo vivo, isolados e caracterizados para fins industriais (NICOLETTI *et al.*, 2015). No entanto, não se pode estimar ainda a variedade de metabólitos secundários produzidos por um fungo endofítico (AZEVEDO *et al.*, 2002). Tendo como destaque a produção de Taxol<sup>®</sup>, um medicamento bastante utilizado no tratamento de câncer, obtido primeiramente da espécie vegetal (*Taxus baccata* L.), e posteriormente de metabólitos secundários obtidos do isolado da espécie fúngica endofítica *Taxomyces andreanae* (Strobel) (LI *et al.*, 2022). E a produção de atividades biológicas antimicrobianas contra *Candida albicans* produzidas pelo fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* (Fresen.) isolado de (*Cynodon dactylon* (L.) Pers). (ZHANG *et al.*, 2012). Entre os principais compostos produzidos por fungos endofíticos com potencial atividade biológica são os representantes de diversas categorias, como: ácidos fenólicos, alcalóides, esteoides, fenilpropanoides ligninas, fenol, lactonas, quinonas, entre outros (NISA *et al.*, 2015).

Devido as atividades biológicas e composição química apresentadas em literatura por *E. bulbosa* e a ausência de pesquisas relacionadas aos fungos endofíticos e atividade biológica de seus metabólitos, além do grande desafio relacionado a resistência de patógenos aos antimicrobianos, o presente trabalho tem como objetivo identificar fungos endofíticos cultiváveis presentes em *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., visando a obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana.

## CAPÍTULO I- IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS DE *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb. (IRIDACEAE)

### 1.2 Introdução

A Amazônia possui uma grande diversidade de plantas com propriedades terapêuticas, entre elas está a espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., pertencente à família Iridaceae, uma planta nativa americana também encontrada no Brasil (PRAMEELA *et al.*, 2018), comumente encontrada no estado do Pará, onde é chamada popularmente de Marupazinho (SILVA, 2013; PINTO, 2018; EGGERS, 2020). Utilizada tradicionalmente pelas comunidades locais para fins terapêuticos, tendo como principal componente a naftoquinona, cujo princípio ativo possui propriedades antimicrobianas, antiparasitárias, anti-inflamatórias e analgésicas (MALHEIROS *et al.* 2015; COUTO *et al.* 2016). Além disso, *E. bulbosa* está entre as 71 espécies que fazem parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), criada em 2009, com a finalidade de orientar pesquisas e estudos (BRASIL, 2012), caracterizando-a como uma espécie de planta medicinal importante na medicina tradicional.

O Brasil possui uma rica diversidade biológica pouco explorada ao que se refere a investigação de fungos endofíticos associados a plantas da flora brasileira (SAVI *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Segundo Strobel (2018), apenas 2% de cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas, foram estudadas quanto a comunidade endofítica presente em seus tecidos vegetais. Os fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior dos tecidos das plantas, sem causar danos aparentes a sua hospedeira (CORREIA *et al.*, 2017).

Essa associação entre fungos e plantas acontece por transmissão horizontal ou vertical dos fungos para as plantas (RODRIGUEZ *et al.*, 2009), tendo como principal via de colonização orifícios naturais, ou resultantes de lesões que ocorrem nos tecidos radiculares do vegetal (LACAVA e SOUSA, 2016; YAN *et al.*, 2019) devido a degradação enzimática das paredes celulares pelas enzimas celulase e pectinase (DESHMUKH *et al.*, 2015). Possibilitando o desenvolvimento de suas partes vegetais, potencializando a solubilização de nutrientes e promovendo a produção de óleos essenciais e micotoxinas, contribuindo para a proteção do vegetal contra agentes causadores de doenças como bactérias, fungos e insetos (PHILIPPOT *et al.*, 2013). Além disso, os fungos endofíticos também são capazes de aumentar a tolerância da hospedeira a temperaturas extremas (YAN *et al.*, 2018).

O isolamento de fungos endofíticos possui a composição do meio de cultura como um dos fatores principais, fornecendo nutrientes adequados para o crescimento dos fungos

endofíticos (FERREIRA *et al.* 2021). Tendo os meios de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) e Ágar Extrato de Malte (MEA) como os mais comumente utilizados no isolamento de fungos endofíticos (ARNOLD *et al.*, 2000). No entanto, é imprescindível a avaliação de fontes alternativas, já que pode haver interferência direta na diversidade de isolados (RODRIGUES *et al.*, 2018; VARGAS *et al.*, 2018). A composição de nutrientes presentes em determinados meios de culturas possui como requisito mínimo, nutrientes capazes de estimular o crescimento desses microrganismos (ARAÚJO *et al.*, 2021). Além do meio de cultivo, a temperatura é outro fator importante, pois influencia diretamente na germinação de esporos dos fungos (JIA *et al.*, 2016).

Os fungos endofíticos são responsáveis por alto grau de importância ecológica (GUPTA *et al.*, 2020) e um grande valor econômico, evidenciado pela gama de aplicações em diversas áreas da biotecnologia (NISA *et al.*, 2015; SAINI; KEUM, 2018; RUSTAMOVA *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2020). As principais aplicações desses produtos são nas áreas industriais, principalmente na produção de pigmentos, medicinal na produção de fármacos antimicrobianos, na agricultura com a obtenção de herbicidas (JAYAWARDENA *et al.*, 2016) e na indústria alimentícia na produção de alimentos e bebidas (CORRÊA *et al.*, 2014). Além disso, possuem também grande importância na produção de enzimas hidrolíticas como as: celulases, pectinases, amilases, fosfatases, lipases e proteases (FELBER *et al.* 2019; MISHRA *et al.*, 2019). Acredita-se que essa capacidade de produção de metabólitos secundários tenha ocorrido durante a coevolução entre os fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras, resultando na capacidade de produção dos mesmos compostos bioativos das plantas pelos microrganismos que as colonizam (RAJAMANIKYAM, 2017).

Na agricultura, os fungos endofíticos são destaque em relação ao controle biológico de fitopatógenos, além de apresentar mecanismos que promovem o crescimento vegetal (KUSARI *et al.*, 2013; RAI *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2016). Essas potencialidades agrícolas são promovidas através da biorremediação e biotransformação de poluentes (PINTO, 2019), fitorremediação (DOTY *et al.*, 2017), biodegradação (BAOUNE *et al.*, 2018; NAIK, 2019) e decomposição (SUN *et al.*, 2011; LACERDA *et al.*, 2019).

Já na produção de enzima por fungos endofíticos, as lipases e amilases possuem grande destaque (KHARWAR *et al.*, 2014). As lipases são empregadas na degradação de lipídeos, contribuindo para a produção de detergentes, medicamentos, biodiesel (CHEN *et al.*, 2019) e efluentes (ORLANDELLI *et al.*, 2012). As amilases são responsáveis pela degradação de moléculas de amido, que por sua vez possuem aplicações desde a indústria alimentar,

farmacêutica, de detergentes, até a têxtil (STELLA, 2013). Além da produção de compostos com atividade antimicrobianas pelo endófito *Streptomyces* spp. (PRATIWI *et al.*, 2018; JACKUBIEC-KRZESNIAK *et al.*, 2018) e compostos com atividade antiviral contra o vírus HIV (CHEN *et al.*, 2018).

Considerando a rica diversidade da flora existente na região Amazônica e que uma planta é colonizada por um ou mais endofíticos, a oportunidade de se descobrir novos microrganismos é muito grande. Tornando mais evidente a interação que existe entre as plantas e os microrganismos endofíticos. Diante disso, o trabalho teve como objetivo isolar e identificar fungos endofíticos associados a espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Geral**

Isolar e identificar cepas de fungos endofíticos associadas a *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

#### **1.3.2 Específicos**

- Isolar fungos endofíticos associados a diferentes amostras e estruturas de *E. bulbosa*;
- Identificar morfolologicamente e molecularmente os isolados fúngicos cultiváveis;
- Analisar a frequência de ocorrência de fungos obtidos nos diferentes tecidos vegetais.

## 1.4 Metodologia

**Figura 1-** Coleta do material vegetal e isolamento, purificação, preservação e identificação dos fungos endofíticos.

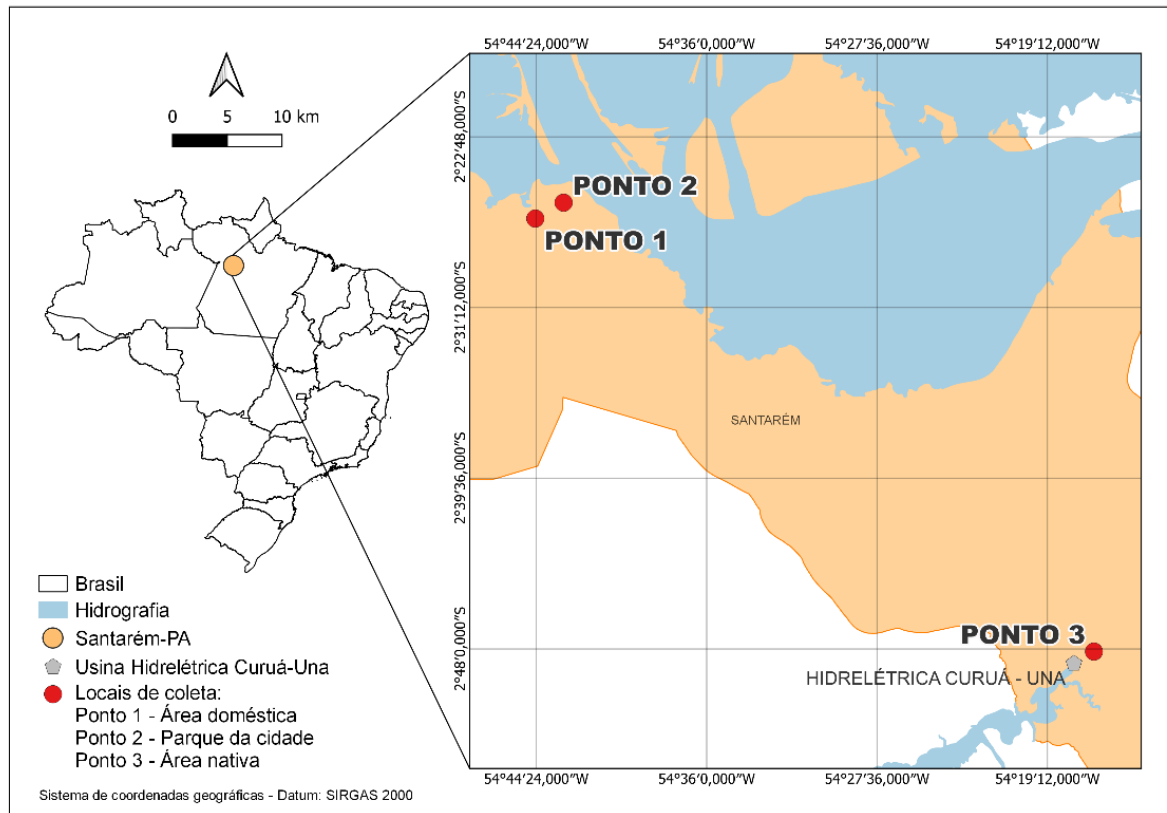


Fonte: AUTORA (2023).

### 1.4.1 Coleta do espécime vegetal *Eleutherine bulbosa*

As amostras de *E. bulbosa* foram obtidas a partir de três pontos de coletas localizados na cidade de Santarém, Pará. O primeiro ponto foi em um cultivo em ambiente urbano (2° 26'49.2"S 54°44'26.9"W), o segundo foi realizado no Parque Municipal da Cidade (2°43'40.5"S 54° 71'76.9"W) e o terceiro localizado em ambiente nativo, as proximidades da Comunidade Santa Maria do Rio Curuá-Una (2° 48'07.5"S 54°16'55.4"W), localizada a margem esquerda da Rodovia PA 370, às proximidades da Usina Hidrelétrica (UHE) Silvio Braga, no km 75 da PA 370 (Figura 2). Foram analisados dois espécimes aparentemente saudáveis de cada ponto. As coletas foram realizadas nos meses de março e abril de 2022.

**Figura 2-** Mapa da localização dos pontos de coleta.



**Fonte:** AUTORA (2023).

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e acondicionadas em caixa isotérmica e levados para o Laboratório de Ensino Multidisciplinar em Biologia Aplicada (LABIO) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), onde foram realizados os procedimentos de higienização das superfícies e isolamento do material vegetal.

#### 1.4.2 Identificação taxonômica do vegetal e depósito de exsicata

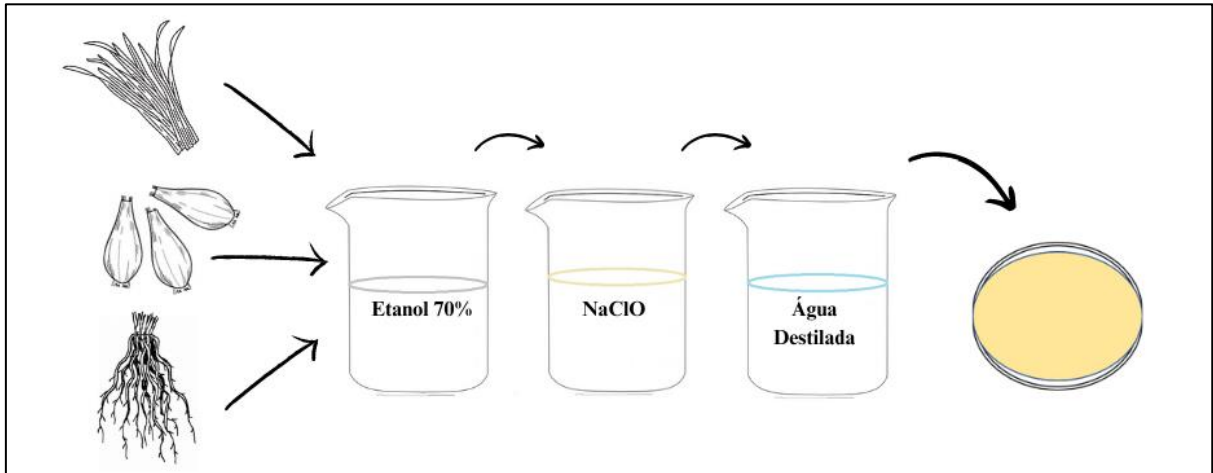
A identificação da espécie botânica foi realizada por um especialista do Herbário de Santarém (HSTM), localizado também na UFOPA. Após a confirmação da identificação da planta, realizou-se a montagem de uma exsicata, onde o espécime coletado foi posto em uma estufa de secagem a 55°C por 10 dias. Posteriormente, o material foi fixado em uma cartolina de tamanho padrão A3 identificada com uma etiqueta contendo as informações de data e local da coleta, informações sobre o vegetal e depositado no HSTM.

#### 1.4.3 Preparo das amostras vegetais e isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos, primeiramente foram selecionados folhas, bulbos e raízes de aspecto saudáveis. Em seguida, realizou-se a higienização do material vegetal com água

corrente e sabão líquido. Em um ambiente asséptico, folhas, bulbos e raízes foram submetidos ao processo de desinfecção superficial, afim de eliminar microrganismos epifíticos, no qual as amostras foram imersas em etanol 70% (v/v) por 1 minuto; hipoclorito de sódio (NaClO) de 2% de cloro ativo por 2 minutos; novamente em etanol 70% (v/v) por 30 segundos e lavagem em água destilada (GONZAGA *et al.* 2014) (Figura 3).

**Figura 3-** Esquema da higienização do vegetal.

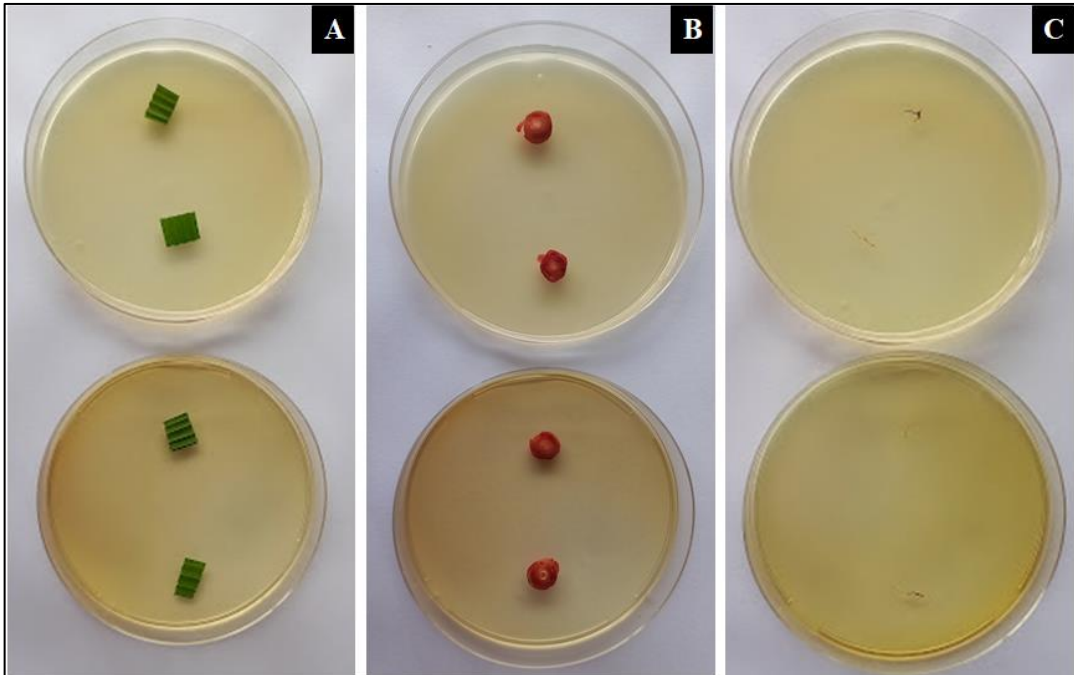


**Fonte:** AUTORA (2023).

Após a assepsia, foram retirados fragmentos de 5 mm aproximadamente de cada parte do vegetal e transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA: batata 250g/L, ágar 25g/L, dextrose 10g/L, acrescido de extrato de levedura 1,5g/L) acrescido com o antibiótico cloranfenicol (0,05g/L), para impedir o crescimento de bactérias (Figura 4). Duas amostras de 500  $\mu$ L da última água de lavagem de cada parte do vegetal foram inoculadas em placas de Petri de 90x15 mm de diâmetro e utilizadas como controle negativo de crescimento microbiano epifítico.



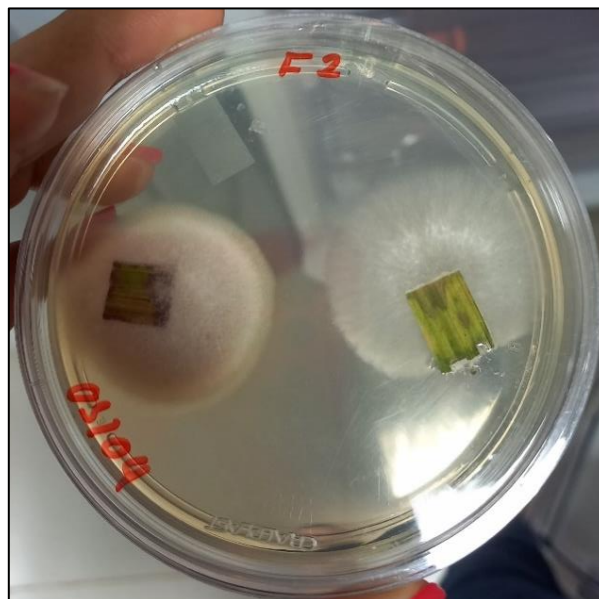
**Figura 4-** Isolamento de fungos endofíticos de *Eleutherine bulbosa* em meio de cultivo BDA. Fragmentos de folhas (A), bulbos (B) e raízes (C).



**Fonte:** AUTORA (2023).

As placas foram incubadas a 28°C de cinco a quatorze dias em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos a partir dos fragmentos vegetais. À medida que haviam crescimentos fúngicos, os mesmos foram repicados em novas placas de Petri com o meio BDA para purificá-los (Figura 5).

**Figura 5-** Crescimento fúngico a partir da inoculação de fragmentos de folhas.

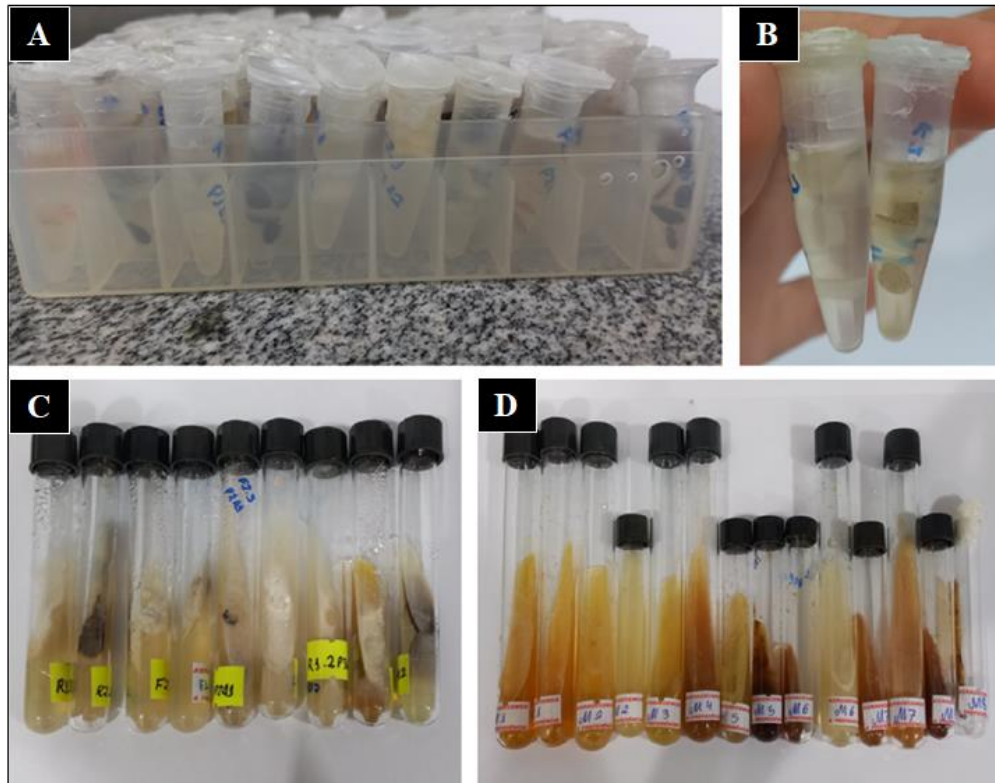


**Fonte:** AUTORA, 2023.

#### 1.4.4 Preservação dos isolados fúngicos

Para a preservação, com os isolados já purificados, os mesmos foram inoculados, a partir de fragmentos miceliais, em tubos de ensaios de vidro de 6 mL de capacidade contendo 3 mL de meio de cultura BDA inclinado (CAPRILES *et al.*, 1989) (Figura 6 C-D). Em seguida, foram retirados discos de 5 mm de diâmetros de micélio crescido em meio de cultura de todos os isolados, onde foram submersos em microtubos de 2mL com 1,5 mL de água destilada esterilizada, armazenados em temperatura ambiente, seguindo o método Castellani (1939) e depositados na Coleção de Cultura Didática Micológica do Laboratório de Micologia e Bioensaios (LAMIB) da UFOPA (Figura 6 A-B).

**Figura 6-** Preservação em Castellani (A e B) e em tubos de ensaio com meio BDA inclinado (C e D) dos isolados obtidos.



**Fonte:** AUTORA (2023).

#### 1.4.5 Identificação Macroscópica e Microscópica dos fungos

A caracterização macroscópica foi realizada por meio da verificação de caracteres macroscópicos como coloração do micélio no verso e no anverso do meio, a forma da borda e topografia da cultura (TROVÃO e PEREIRA 2018).

A caracterização microscópica foi realizada por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950) com modificações, que consiste na simulação de uma câmara úmida, onde em uma placa de Petri de 90 x 15 mm de diâmetro foram dispostos dois palitos estéreis servindo como base para uma lâmina estéril, na qual foi depositado um bloco de meio de cultura de aproximadamente 1 cm × 1 cm, recortado com o auxílio de um bisturi estéril, onde pequenas porções do isolado fúngico foram inoculadas nas extremidades do bloco de meio de cultura, em seguida foi depositado uma lamínula também estéril sob a superfície do bloco, adicionando um pedaço de algodão humedecido com água destilada esterilizada para manter a umidade dentro da placa de Petri, por fim fechada para evitar contaminações, armazenadas em temperatura de 25°C de 7 a 10 dias. Passado esse período a lamínula foi removida e depositada em nova lâmina acrescida com uma gota de lactofenol e fixada para observação em microscópio.

Outra técnica utilizada foi a técnica fita cola, realizada após a maturação das colônias para visualizações rápidas. Com auxílio de um pedaço de fita adesiva, com o lado colante posicionado contra o micélio da colônia, afim de aderir a fita colante as estruturas esporulantes, posteriormente depositadas em uma lâmina que possibilitaram a comparação entre as características morfológicas com a literatura micológica disponível (BARNETT e HUNTER 1972; LARONE, 1993; MENEZES e OLIVEIRA, 1993), na qual foi possível realizar a identificação dos fungos ao menor nível taxonômico possível.

#### 1.4.6 Identificação Molecular

##### *Extração de DNA*

Foram selecionados nove isolados fúngicos de acordo com suas características macroscópicas e submetidos a identificação molecular. A extração de DNA foi realizada por maceração com nitrogênio líquido e pelo kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Após essa etapa, a aferição do DNA extraído foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% a 120V por 90 minutos.

##### *Amplificação do DNA*

A Reação em Cadeia Polimerase (PCR) foi realizada a partir do DNA extraído dos isolados utilizando os primers universais ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCGG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE *et al.*, 1990). As PCRs foram realizadas usando as seguintes concentrações de reagentes: 3,0 µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), tampão 10x 5,0 µL, 3,0 µL mistura dNTP (20 mM cada), 3,0 µL primers diretos e reversos (10 mM cada), Taq DNA

polimerase 0,4 µl (5U/µl), 1µl de DNA molde e o volume total da PCR ajustado para 50 µl com água ultrapura estéril. As condições para a amplificação utilizadas foram 95°C por 4 minutos e 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 5 minutos em termociclador ProFlex™ 3x32-Well PCR System (Thermo Fisher Scientific). Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,0% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 60V por 60 minutos, corados com o corante Blue Green e visualizados em transluminador de luz azul LT BLUE (Loccus).

#### *Reações de Sequenciamento e Análise dos resultados*

Os produtos da PCR para sequenciamento foram secos em estufa a 60°C com propósito de envio para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares (<https://actgene.com.br>). As sequencias obtidas forward e reverse foram analisados e comparados com sequências depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Para confirmação da espécie foi considerado o valor de cobertura e identidade dos alinhamentos.

#### *Análise de dados*

A frequência relativa (Fr) de cada táxon foi calculada a partir do número de isolados de um táxon dividido pelo número total de isolados, sendo o valor dado em porcentagem. Já a frequência de colonização foi calculada (FC%) com a seguinte fórmula (ARAÚJO *et al.*, 2002):

$$FC\% = \frac{Ni \text{ (número de isolados obtidos)}}{Nf \text{ (número de fragmentos inoculados)}} \times 100$$

Além disso, para avaliar o compartilhamento entre taxa entre os pontos amostrados e as partes do vegetal analisadas, foram usados Diagramas de Venn para ilustrar as relações entre os conjuntos.

## **1.5 Resultados e Discussões**

### **1.5.1 Coleta e identificação taxonômica das plantas coletadas**

O material vegetal foi identificado pelo taxonomista vegetal Dr. Marcos Vinícius Batista Soares da Universidade Federal do Oeste do Pará, e depositado no herbário HSTM, tombado com o código de registro HSTM016892 (Figura 7).

**Figura 7-** Exsicata da espécie *Eleutherine bulbosa* depositadas no HSTM.

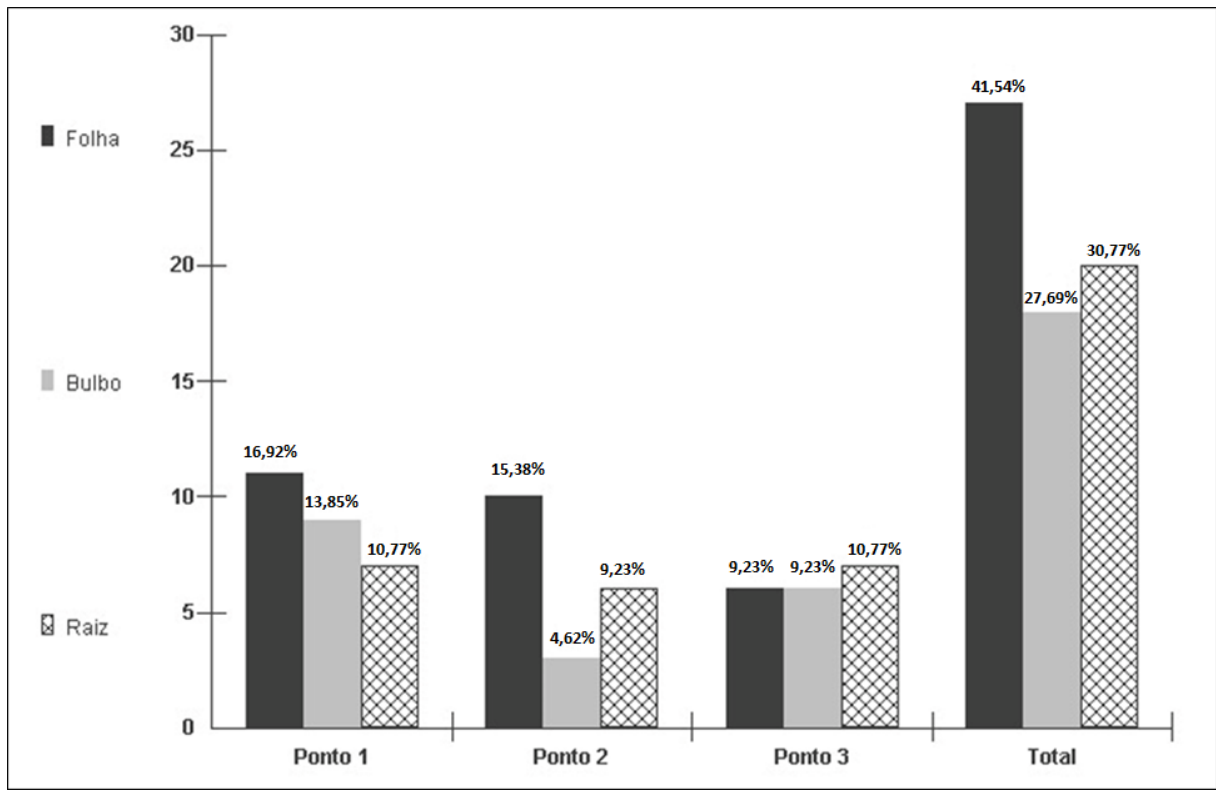


**Fonte:** AUTORA, 2023.

### 1.5.2 Isolamento dos fungos endofíticos

Ao final de cada coleta foram obtidos dois espécimes de *E. bulbosa*, contendo folhas, bulbos e raízes com aspecto saudáveis, totalizando seis amostras da espécie. A partir do isolamento dos fragmentos vegetais, obteve-se um total de 65 fungos endofíticos cultiváveis. Em relação ao total de fungo isolados, a frequência de isolamento mostrou-se maior nas folhas de *E. bulbosa*, com 41,54% de isolados (27). A partir dos bulbos, foi de 27,69% (18) e 30,77% (20) nas raízes (Figura 8).

**Figura 8-** Número de isolados de fungos endofíticos obtidos de diferentes partes de *Eleutherine bulbosa* de diferentes pontos amostrais.



Fonte: AUTORA (2023).

### 1.5.3 Agrupamento morfológico, análise taxonômica e identificação molecular

Os isolados foram previamente identificados a partir da caracterização macroscópica, agrupados em 44 morfotipos diferentes, sendo destes, 36 fungos filamentosos e 8 fungos leveduriformes. Os fungos endofíticos filamentosos foram agrupados de acordo com as suas características macromorfológicas como cor da colônia (frente e anverso), textura, aspecto da borda e topografia, sumarizados de acordo com os critérios adotados no Anexo 1. As colônias de fungos filamentosos isolados podem ser visualizadas na Figura 9.

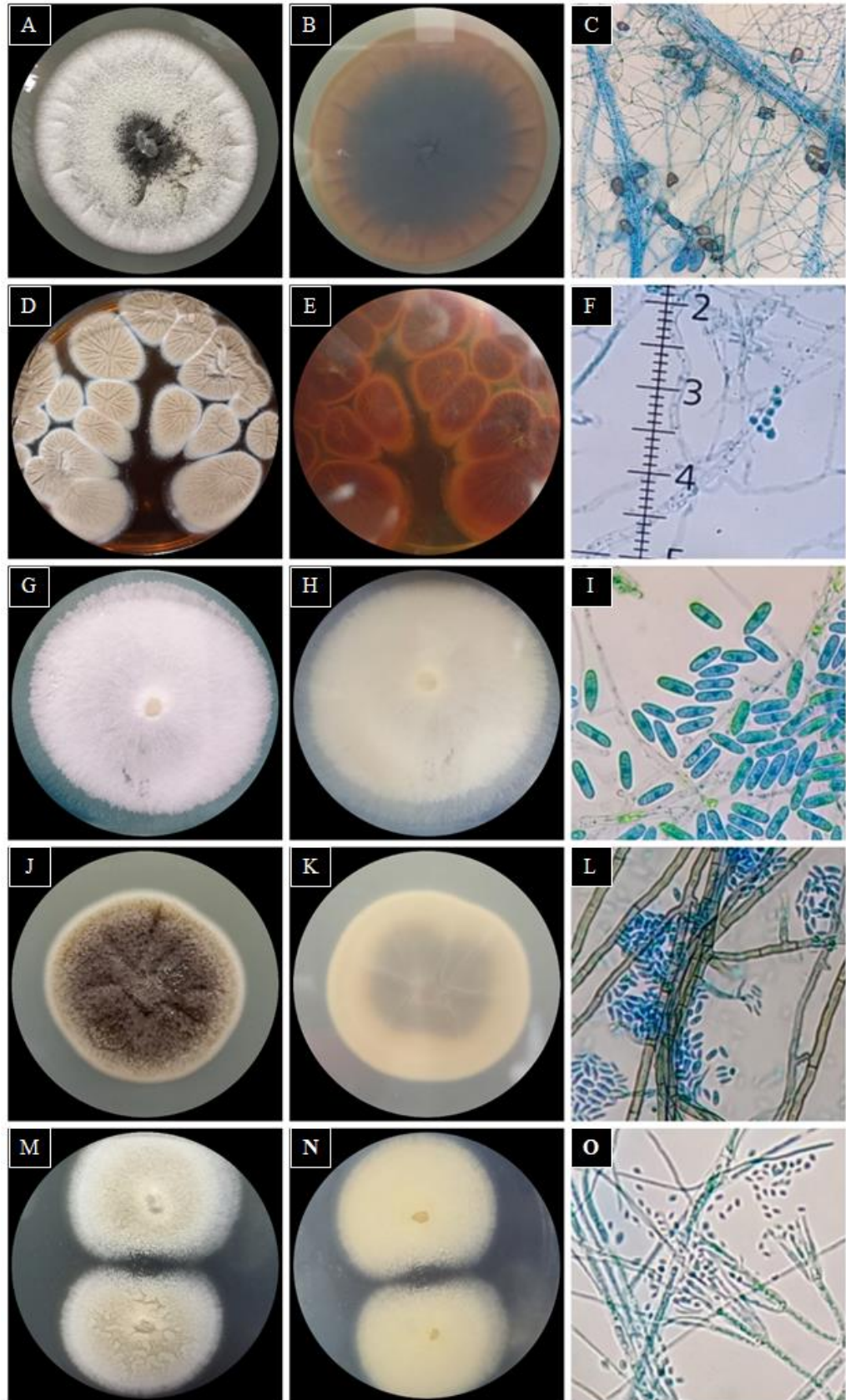
**Figura 9-** Culturas de fungos endofíticos filamentosos obtidas dos isolamentos dos fragmentos de *Eleutherine bulbosa*.



**Fonte:** Autora (2023).

A partir da taxonomia clássica, os fungos endofíticos filamentosos que apresentaram estruturas reprodutivas foram comparados com dados específicos da literatura, onde foi possível identificar a nível de gênero um total de 5 taxa de fungos filamentosos: *Fusarium* spp. (Link), *Muyocopron* spp. (Speg.), *Penicillium* spp. (Link), *Paecilomyces* spp. (Bainier) e *Phaeoacremonium* spp. (W. Gams), os quais suas características macroscópicas e microscópicas podem ser vistas na Figura 10.

**Figura 10-** Caracterização macroscópica e microscópica dos gêneros *Muyocopron* (A, B e C), *Penicillium* (D, E e F), *Fusarium* (G, H e I), *Phaeoacremonium* (J, K e L) e *Paecilomyces* (M, N e O).



Fonte: AUTORA, 2023.



Os isolados que não puderam ser identificados, por não apresentarem estruturas reprodutivas, foram classificados como *Mycelia sterilia*, denominados fungos imperfeitos pertencentes a ordem Agonomycetales. Do total de 36 fungos endofíticos filamentosos isolados, somente 16,92% (n=11), não houve a possibilidade de obter suas identificações, pois não apresentaram esporulação no meio de cultura. Embora tenham sido realizadas outras técnicas para promover a esporulação, como o cultivo dos isolados não esporulantes em meio Ágar Água (AA) e Ágar Extrato de Malte (MEA).

A classificação convencional dos fungos é realizada através das estruturas reprodutivas presentes no meio, e sua ausência torna inviável a identificação. Além disso, a grande diversidade morfológica que os fungos apresentam, torna essa uma etapa um tanto desafiadora (CHETHANA *et al.*, 2020). Uma alternativa é o uso de ferramentas moleculares para identificação desses microrganismos utilizando regiões ITS (RAJA *et al.*, 2021). Um estudo realizado por Shankar e colaboradores (2014), a partir do isolamento de 3611 fungos de sete plantas medicinais diferentes, houve a predominância de 10% de ocorrência de endófitos não esporulantes.

Os fungos endofíticos leveduriformes totalizaram 29 isolados agrupados em 8 morfotipos diferentes isolados dos bulbos e raízes totalizando (44,61%). No entanto, suas identificações não foram realizadas, pois a seu cultivo foi comprometido, não sendo mais viável para a identificação. Poucos são os estudos que possuem o relato de leveduras endofíticas e a associação com suas hospedeiras. No entanto, Vieira e colaboradores (2012) reportaram o aparecimento de leveduras endofíticas nas folhas da planta medicinal *Solanun cernuum* (Vell.). Além disso, Bomfim (2014) para testar a hipótese de que a presença de espécies de leveduras também é de extrema importância, fez a análise de duas espécies de plantas medicinais *Schinus terebinthifolius* (Raddi) e *Tabebuia impertiginosa* (Mart.) Standl., afim de analisar a diversidade presentes nesses vegetais, obtendo um total de 105 leveduras isoladas das folhas, tendo a espécie *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) como a mais frequente em ambas as plantas estudadas.

Através da identificação molecular obteve-se a identificação de nove isolados endofíticos a nível de gênero: *Acrocalymma* (Alcorn) (raiz), *Eutypella* (Nitschke) (folha), *Fusarium* (raiz), *Muyocopron* (folha), *Penicillium* (raiz), *Phaeoacremonium* (raiz) e *Xylaria* (Hill ex Schrank) (folha). Na qual, utilizou-se os primers ITS1 e ITS4 para a amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2, na extração do DNA genômico dos fungos endofíticos. Essa região é

oficialmente a recomendada pelos micologistas, por apresentar alta variação entre as espécies (RAJA *et al.*, 2017).

O presente estudo evidenciou 17 taxa de fungos endofíticos associados as folhas, bulbos e raízes de *E. bulbosa*: *Acrocalymma*, *Eutypella*, *Fusarium*, Levedura 1, Levedura 2, Levedura 3, Levedura 4, Levedura 5, Levedura 6, Levedura 7, Levedura 8, *Muyocopron*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phaeoacremonium* e *Xylaria*. A frequência absoluta e relativa dos táxons encontrados, podem ser visualizados na Tabela 1 e na Figura 11.

**Tabela 1-** Frequência absoluta e frequência relativas dos taxa encontrados.

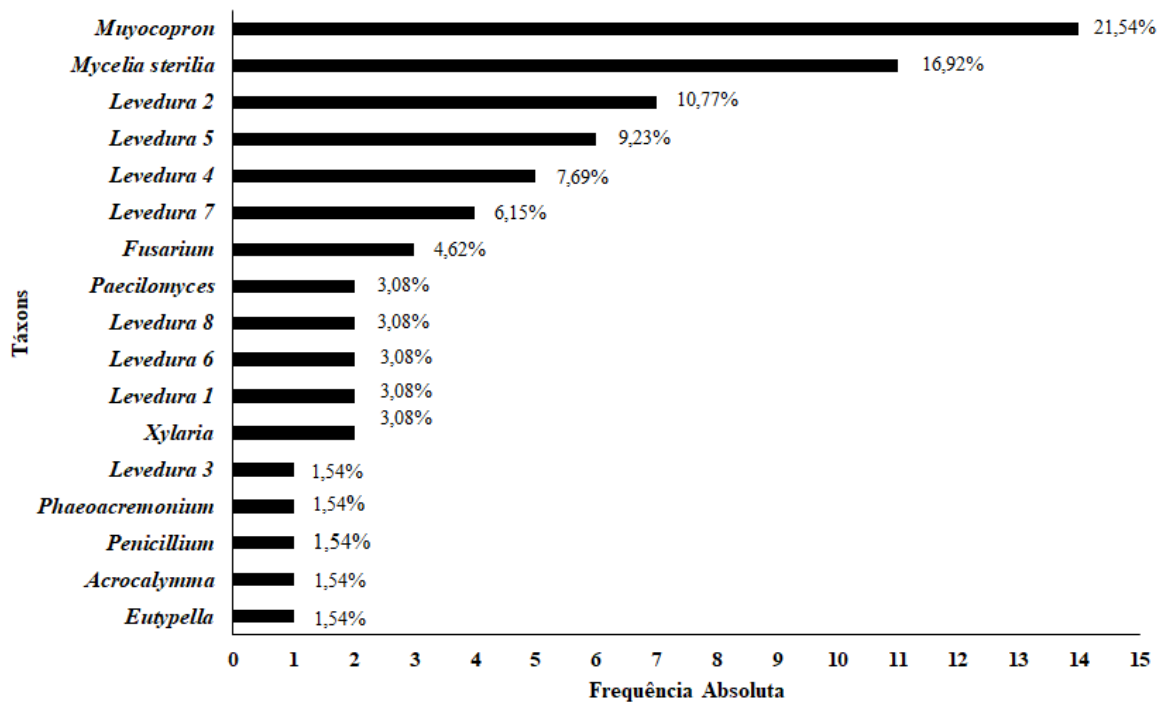
<b>Táxons</b>	<b>Fa</b>	<b>Fr (%)</b>
<i>Eutypella</i>	1	1,54
<i>Acrocalymma</i>	1	1,54
<i>Penicillium</i>	1	1,54
<i>Phaeoacremonium</i>	1	1,54
Levedura 3	1	1,54
<i>Xylaria</i>	2	3,08
Levedura 1	2	3,08
Levedura 6	2	3,08
Levedura 8	2	3,08
<i>Paecilomyces</i>	2	3,08
<i>Fusarium</i>	3	4,62
Levedura 7	4	6,15
Levedura 4	5	7,69
Levedura 5	6	9,23
Levedura 2	7	10,77
<i>Mycelia sterilia</i>	11	16,92
<i>Muyocopron</i>	14	21,54
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>100</b>

\*Fa: Frequência absoluta;

\*Fr: Frequência relativa.

**Fonte:** AUTORA (2023).

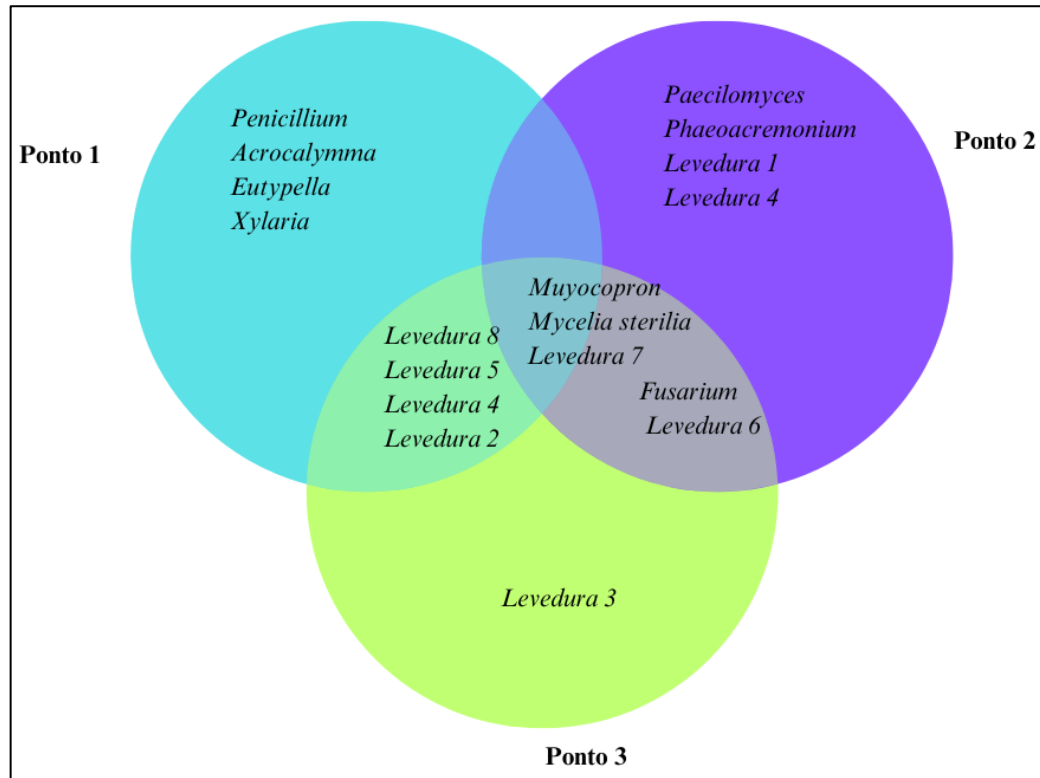
**Figura 11-** Ocorrência de fungos endofíticos isolados de *Eleutherine bulbosa*.



Fonte: AUTORA (2023).

Para avaliar a distribuição dos taxa endofíticos entre os locais de coleta e entre as partes do vegetal estudadas, foram construídos diagramas de Venn, onde foi possível observar a preferência de gêneros de fungos endofíticos em relação ao tipo de órgão vegetal e local de cultivo. Houve o compartilhamento de três táxons entre os três pontos de coleta: *Muyocopron*, *Mycelia sterilia* e *Levedura 7*. Além disso nos pontos 1 e 3 houve também o compartilhamento de quatro morfotipos de leveduras (*Levedura 8*, *Levedura 5*, *Levedura 4* e *Levedura 2*) e entre os pontos 2 e 3 o compartilhamento de *Fusarium* e *Levedura 6* (Figura 11).

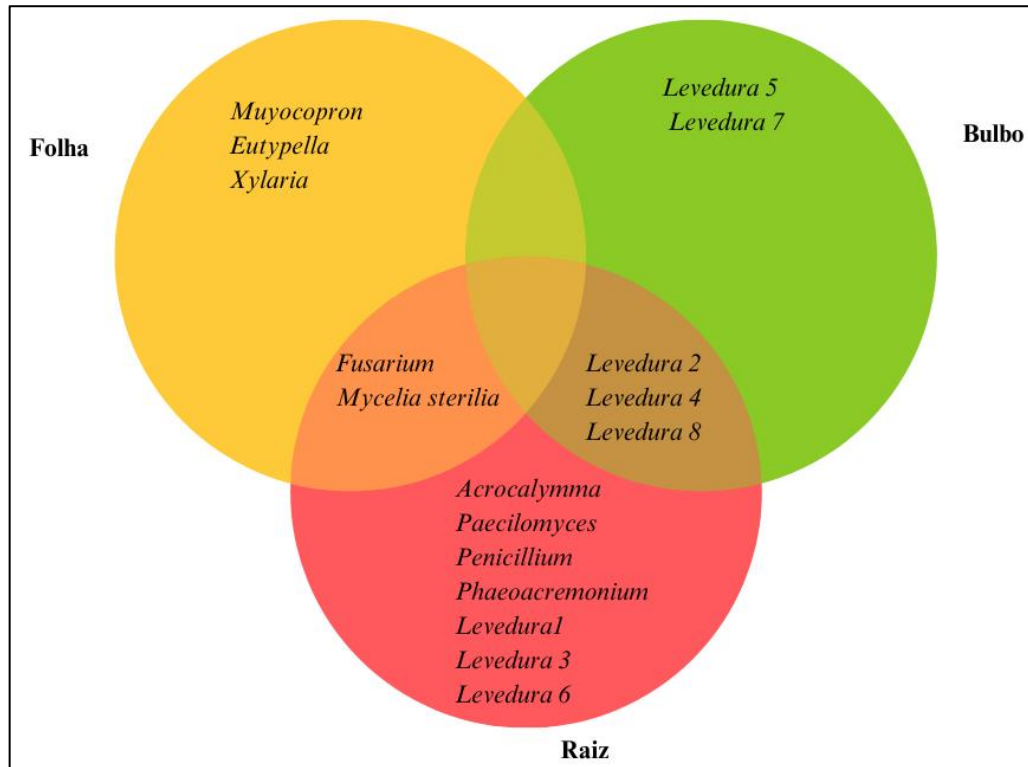
**Figura 12** – Diagrama de Venn mostrando Espécies compartilhadas entre os pontos de coletas.



**Fonte:** AUTORA (2023).

Quanto a distribuição dos taxa entre as partes da planta, não houve compartilhamento de táxons nas três partes, somente entre folha e raiz por *Fusarium* e *Mycelia sterilia*, além de três morfotipos de leveduras: Levedura 2, Levedura 4 e Levedura 8, ambas encontradas nos bulbos e raízes. *Muyocopron*, *Eutypella* e *Xylaria* foram comuns somente as folhas de *E. bulbosa*. Assim como, *Penicillium*, *Acrocalymma*, *Phaeoacremonium* e *Paecilomyces*, ocorreram apenas nas raízes do vegetal (Figura 12). Resultado que corrobora com os encontrados por Silva 2020, no qual evidenciou o compartilhamento dos táxons, observando a presença de gêneros únicos ocorrentes somente uma vez em uma das espécies estudadas e por Coelho et al. (2017) que observaram a preferência dos gêneros isolados à um órgão vegetal e a um local de cultivo.

**Figura 13** – Espécies compartilhadas entre as partes do vegetal – Diagrama de Venn.



Fonte: AUTORA (2023).

O gênero mais frequente foi *Muyocopron* 21,54% (14), o que se assemelha com o trabalho de SANTOS *et al.*, (2020) que verificaram o gênero *Muyocopron* entre vinte e cinco gêneros associados as folhas e sementes do guaraná *Paullinia cupana* (Kunth). Esse táxon também já teve seu isolamento relatado como endofítico em outros estudos por Oliveira *et al.* (2021) na espécie *Poincianella pyramidalis* (Tul.) e em *Psidium cattleianum* (Sab.) por ANDRÉ (2022). No entanto, é geralmente encontrado como patógeno de vegetais e decompositores de matéria orgânica (HERNÁNDEZ-RESTREPO *et al.*, 2019; MOTA *et al.*, 2021; JIANG *et al.*, 2022; PENNERMAN *et al.*, 2020).

Já os gêneros *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Xylaria* isolados duas vezes, e os gêneros *Acrocalymma*, *Eutypella*, *Penicillium* e *Phaeoacremonium* isolados apenas uma vez, foram os menos frequentes. Segundo Arnold e Lutzoni (2007), esses gêneros com baixa frequência de isolamento, representam espécies raras, tendo como consequência o aumento da riqueza e abundância de fungos endofíticos em sua hospedeira. O gênero *Fusarium* possui espécies cosmopolitas, sapróbias e fitopatogênicas, frequentemente encontrado em diferentes hospedeiros de plantas medicinais como em (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.) por SOUSA *et al.* (2018). Os gêneros *Fusarium* e *Xylaria* são comumente isolados em plantas de regiões

tropicais (SILVA-HUGHES *et al.*, 2015), como *Annona squamosa* L. (SILVA *et al.*, 2006) e (*Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth) (ALMEIDA *et al.*, 2015).

De acordo com Moura (2018), o gênero *Penicillium* possui uma ampla diversidade de espécies, relacionadas a sua morfologia e produção compostos naturais, utilizados para uma infinidade de aplicações biotecnológicas como enzimas, antimicrobianos antioxidantes e outros. Além disso, espécies desse gênero são comumente isoladas como endófitos de plantas medicinais como *Kadsura angustifolia* (Kaempf.) por Huang e colaboradores (2015), *Passiflora incarnata* (L.) por Silva (2017). O gênero *Xylaria* segundo Coelho (2017) são fungos generalistas, os quais podem ser encontrados em diferentes tecidos vegetais. Sendo também um gênero endofítico bastante isolados de plantas medicinais, como em *Schinus terebinthifolius* (Raddi) por Santos (2013), isolada de segmentos nodais. Além da espécie *Xylaria regalis* (Cooke), isolada de cones de *Thuja plicata* (Donn) por ADNAN *et al.*, (2018).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nesse estudo, pode-se conhecer parte da diversidade de fungos endofíticos de *Eleutherine bulbosa*, a partir do isolamento em meio de cultura BDA, análise de caracteres macroscópicos, análise taxonômica por meio dos caracteres microscópicos e análise filogenética. Tornando evidente a grande diversidade de fungos endofíticos que a planta possui, o que ainda não foi relatado em estudos com outros gêneros da família Iridaceae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.A.S; ROVIDA, A.F.S; PAMPHILE, J. A. Fungi of Interest: Biotechnological Applications. **Revista UNINGÁ Review**. v.21, n.1, pp. 55-59. 2015.
- ADELEKE, B. S., BABALOLA, O. O. Potencial farmacológico de fungos endófitos associados a plantas medicinais: uma revisão. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, pág. 147, 2021.
- ADNAN, M. et al. Caracterização fisiológica e molecular do fungo endofítico produtor de biosurfactante *Xylaria regalis* dos cones de *Thuja plicata* como um potente promotor de crescimento vegetal com potencial de aplicação. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- ALEFAN Q, HALBOUP A. **Pharmacy practice in Jordan. In: Pharmacy practice in developing countries**; 2016.
- ALMEIDA, C.V. et al. Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 4920-4931, 2015.
- ALY, A., H., DEBBAD, A., PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p.1829-1845, June 2011.
- ANDRÉ, B. L. O. **Diversidade de fungos endofíticos de *Psidium cattleianum* (Araçá)**. 2022.
- ALIBRANDI P, SCHNELL S, PEROTTO S, CARDINALE M. Diversity and structure of endophytic bacterial communities associated with three terrestrial orchid species, as revealed by 16S rRNA Gene Metabarcoding. **Frontiers Microbiology**. vol 11: 604964. 2020.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. 2002.
- ARAÚJO, Atilon Vasconcelos de; DE ALBUQUERQUE, Erlan Kessyo Braga; CARVALHO, Clarice Maia. FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS DE *Morinda citrifolia* Linn. **Revista Thêma et Scientia**, v. 11, n. 2, p. 303-311, 2021.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P. D., KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology letters*. v. 3, n. 4, p. 267-74, 2000.
- ARNOLD, A.E., LUTZONI, F. **Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots?** *Ecology* 88:541–549, 2007.
- ATANASOV, A. G. et al. **Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review**. *Biotechnology advances*, v. 33, n. 8, p. 1582- 1614, 2015.

AZEVEDO J. L., MACCHEORI W. J., ARAÚJO W. L., PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL. **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS; 2002.

AZEVEDO, P. T. M. **Minhocas, fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em mudas de Araucaria angustifolia**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2010.

AZEVEDO, E., BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, 2018.

BANO, N. et al. Production of Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic fungi. **International Research Journal of Engineering and Technology**, v. 6, n. 6, p. 1859-1866, 2016.

BAOUNE, H. et al. Petroleum degradation by endophytic Streptomyces spp. Isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 602-609, 2018.

BARNETT, H. L., & HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. New York, USA: **American Phytopathol.** 1972.

BOGAS, A. C., TORRES, F. L., SOUSA, C. P., & LACAVA, P. T. Bioactivity of endophytes from the Brazilian tropical savannah. **Acta Scientific Microbiology**, 3, 15-22. 2020.

BOMFIM, Flávio Santos. **Diversidade de leveduras endofíticas em plantas medicinais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde (Brasil). Portaria nº. 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União** 29 de março de 2012.

CAPRILES, H., MATA, S., MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.

CARVALHO C. R., GONÇALVES V. N., PEREIRA C. B., JOHANN S., GALLIZA I.V., ALVES T. M. A., RABELLO A., SOBRAL M. E. G., ZANI C.L., ROSA C. A., ROSA L. H. Diversidade, atividade antimicrobiana e anticancerígena de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) do cerrado brasileiro. **Simbiose** 57(2):95–107. 2012.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42, 225-226. 1939.

CHEN, L., ZHANG, QY, JIA, M., MING, QL, YUE, W., RAHMAN, K., et al. Fungos endofíticos com atividades antitumorais: sua ocorrência e compostos anticancerígenos. **Crit. Rev. Microbiol.** 42, 454–473. 2016.



CHEN M.H, CHANG S.S., DONG B., YU L.Y., WU Y.X., WANG R.Z., JIANG W., GAO Z.P., SI S.Y. Ahmpatinin i Bu, a new HIV-1 protease inhibitor, from *Streptomyces sp.* CPCC 202950. **RSC Adv.** 8:5138–5144. 2018.

CHEN, M., WANG, R., ZHAO, W., YU, L., ZHANG, C., CHANG, S., LI, Y., ZHANG, T., XING, J., GAN, M., FENG, F., SI, S. Isocoumarindole A, a chlorinated isocoumarin and indole alkaloid hybrid metabolite from an endolichenic fungus *Aspergillus sp.* **Organic letters.** 21, 1530. 2019.

CHETHANA, K.W.T. et al. Hurdles in fungal taxonomy: effectiveness of recent methods in discriminating taxa. **Megataxa**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 114-122, 31 mar. 2020.

CHOWDHARY K, KAUSHIK N. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. **PloS ONE.** 2015.

COELHO, Carla Figueiredo et al. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da malva.** 2017.

CORREA, R.C.G.; RHODEN, S.A.; MOTA, T.R.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A.; SOUZA, C.G.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; Bracht, A.; Peralta, R.M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 41: 1467-1478. 2014.

CORREIA, A. M. L. et al. Fungal endophyte communities in Begonia species from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 441-449, 20 nov. 2017.

CORREIA, A. M., LIRA, S. P., ASSIS, M. A., & RODRIGUES, A. Fungal endophyte communities in Begonia species from the Brazilian Atlantic rainforest. **Current Microbiology**, 75, 441-449. 2018.

COUTO, C. L., MORAES, D. F., MARIA DO SOCORO, S. C., DO AMARAL, F. M., & Guerra, R. N. *Eleutherine bulbous* (Mill.) Urb.: A review study. **Journal of Medicinal Plants Research**, 10(21), 286-297. 2016.

DANTAS, P. V. P. (2017). **Prospecção biotecnológica de fungos endofíticos de bambu (*Bambusa vulgaris*) micropropagado na produção de enzimas e atividade antimicrobiana.** Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco.

DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-43. 2015.

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

EGGERS, L. **Eleutherine in. Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020.

- FELBER, A. C. et al. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v. 66, p.765–775, 2016.
- FELBER, A. C.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; MOURAO, K. S. M.; PAMPHILE, J. A. Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 3, p. 933-940, 2019.
- FERREIRA, I. S., SANTOS, C. C., SOUZA M. C., SOUZA, L. M. Avaliação da diversidade de fungos endofíticos isolados da planta *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, 8(2), 132–141. 2021.
- GONZAGA, L. L., COSTA, L. E. O., SANTOS, T. T., ARAÚJO, E. F., & QUEIROZ, M. V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of applied microbiology**, 118(2), 485-496. 2014.
- GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 39, n. 20, p. 107-134, mar. 2020.
- HANH, Pham Thi Bich et al. Toxicity and anti-inflammatory activities of an extract of the *Eleutherine bulbosa* rhizome on collagen antibody-induced arthritis in a mouse model. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 7, p. 1934578X1801300725, 2018.
- HERNÁNDEZ-RESTREPO M, Bezerra JDP, Tan YP, et al. Re-evaluation of *Mycocleptodiscus* species and morphologically similar fungi. **Persoonia** 4: 205-227. 2019.
- HUGHES, E. Endophytic Fungi Diversity, Characterization and Biocontrol. *Microbiology Research Advances*. **New York, Nova Publishes**, pp. 1-163. 2016.
- JAKUBIEC-KRZESNIAK, K., RAJNISZ-MATEUSIAK, A., GUSPIEL, A., ZIEMSKA, J. & SOLECKA, J. Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. **Polish Journal of Microbiology**, 67(3) 259-272. 2018.
- JAYAWARDENA, R. S., LI, X. H., LIU, M., ZHANG, W., & YAN, J. Y. Mycosphere essay 16: *Colletotrichum*: biological control, biocatalyst, secondary metabolites and toxins. **Mycosphere**, 7(8), 1164-1176. 2016.
- JIA, M., CHEN, L., XIN, H.-L., ZHENG, C.-J., RAHMAN, K., HAN, T., et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. p. 1-14, 2016.
- JIANG, H. et al. First report of *Muyocopron laterale* causing a new leaf disease of *Camellia sinensis* in China. **Beverage Plant Research**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-4, jun. 2022.
- KAMADURIN, A.A., SAYUTI, N.H., SAAD, N., RAZAK, N.A.A., ESA, N. M. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Bulb: Review of the Pharmacological Activities and Its Prospects for Application. **Int. J. Mol. Sci.** 22, 6747. 2021.
- KHAN, A. L., AL-HARRASI, A., AL-RAWAHI, A., AL-FARSI, Z., AL-MAMARI, A., WAQAS, M., ASAF, S., ELYASSI, A., MABOOD, F., SHIN, J. H. Endophytic fungi from 52

frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic Acid. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 1-19, 2016.

KHARWAR, R. N. et al. Diversity and Biopotential of Endophytic Fungal Flora Isolated from Eight Medicinal Plants of Uttar Pradesh, India. In: **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. Springer India. P. 23-39. 2014.

KUMAR, A., VERMA, J. P. Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review?. **Microbiological research**, v. 207, p. 41-52, 2018.

KUSARI, S., PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Paradigmas mutualísticos inexplorados ligando plantas hospedeiras e produção de fungos endofíticos de metabólitos secundários bioativos semelhantes. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81-87, 2013.

LACAVAL, P. T., DE SOUSA, C. P. Role of endophytic actinomycetes in crop protection: plant growth promotion and biological control. **Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes**, p. 147-160, 2016.

LACERDA, L. T.; GUSMÃO, L. F. P.; RODRIGUES, A. Fungal communities in different aged leaves of *Eucalyptus microcorys* F. Muell. **Brazilian Journal of Botany**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 499-508, set. 2019.

LARONE, D. H. Medically important fungi; a guide to identification. Washington: **American Society for Microbiology**, v. 230. 1993.

LI, Z., ZHENG, J., & LI, W. D. Z. Diverse strategic approaches en route to Taxol total synthesis. **Chinese Chemical Letters**, 33(12), 4957-4968. 2022.

LÓCIO, C. J. F. et al. **Avaliação das atividades antibióticas e antiparasitária de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa***. 2019.

MACEDO, K. L. et al. **Estudo fitoquímico e toxicológico da espécie *Eleutherine bulbosa* (miller) Urb.** 2022.

MAIA, P. L. C., DOS SANTOS, J. K. G., DE BARROS, N. B., & BARROS, R. R. Atenção farmacêutica: uma abordagem sobre a resistência antimicrobiana e o uso inadequado na vida cotidiana. **Brazilian Journal of Development**, 7(4), 43347-43362. 2021.

MALHEIROS, L. C., DE MELLO, J. C. P., & BARBOSA, W. L. R. *Eleutherine plicata*—quinones and antioxidant activity. In *Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health*. **IntechOpen**. 2015.

MANOHARACHARY, C. et al. *Mycology and Microbiology: A Textbook for UG and PG Courses*. India, **Scientific Publishers**. 2016.

MANZOTTI A, BERGNA A, BUROW M, et al. Insights into the community structure and lifestyle of tomato fungal root endophytes, combining amplicon sequencing and isolation approaches with phytohormone profiles. **FEMS Microbiology Ecology**. 96 (5): f1aa052. 2020.

MARTÃO, V. M. **Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental**. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado)- Fundação Universidade Federal de Rondônia, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Porto Velho. 2013.

MELO, R. D. O. A. **Isolamento, avaliação e identificação de micro-organismos endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra* e suas interações com a lectina de folhas (BmoLL)**. 2017.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. 350f. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 1993.

MISHRA, R., KUSHVEER, J.S., REVANTHBABU, P. and SARMA, V.V., 2019. Endophytic fungi and their enzymatic potential. In: B. SINGH, ed. **Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges** Cham: Springer, pp. 283-337.

MOTA, S. F. et al. Biological control of common bean diseases using endophytic *Induraria* spp. **Biological Control**, [S.L.], v. 159, n. 2021, p. 104629, ago. 2021. Elsevier BV.

MOURA, C.M.R. DA. **Produção de tanase por amostras de *Penicillium* spp. isoladas do semi-árido do estado de Pernambuco, utilizando meios contendo resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco. Pernambuco. 2018.

MÜLLER, C. A., OBERMEIER, M. M., BERG, G. Bioprospecção de microbiomas associados a plantas. **Journal of Biotechnology**, v. 235, p. 171-180, 2016.

MUNAENI, W. et al. Phytochemical analysis and antibacterial activities of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Extract against *Vibrio parahaemolyticus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 9, n. 9, p. 397- 404, 2019.

MUSSI-DIAS, V., et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

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

NICOLETTI, R., & FIORENTINO, A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatophyta. **Agriculture**, 5(4), 918-970. 2015.

NISA, H., KAMILI, A. N., NAWCHOO, I. A., SHAFI, S., SHAMEEN, N., & BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial pathogenesis**, 82, 50-59. 2015.

- OLIVEIRA, TG, BEZERRA, JD, SILVA, IRD, SOUZA-MOTTA, CM, MAGALHÃES, O. Diversidade de fungos endofíticos nos folíolos e ramos de *Poincianella pyramidalis*, uma espécie endêmica da floresta tropical seca brasileira. **Acta Botanica Brasilica**, 34, 755-764. 2021.
- ORLANDELLI, R. C., Specian, V., Felber, A. C., & Pamphile, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, 7(3). 2012.
- PADHI, L.; PANDA, S. Antibacterial activity of *Eleutherine bulbosa* (Miller) Urban (Iridaceae) against multidrug resistant bacteria. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 3, p. 53- 61, 2015.
- PADMAVATHY, J.; SARAVANAN, D. Natural product as a source of prodrug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 151-161, maio 2017.
- PENNERMAN, K. K. et al. Identifying candidate *Aspergillus* pathogenicity factors by annotation frequency. **BMC Microbiology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-11, 11 nov. 2020.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Review**, 6, 1-5. 2012.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W. H. V. D. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p. 789–799. 2013.
- PINTO, D. L. P. Análise da atividade antibacteriana dos bulbos de *Eleutherine plicata* herb. (Iridaceae). **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, V.23, n.2, pp. 07-11. 2018.
- PINTO, R. A. F. O. et al. **Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** 2019.
- PRAMEELA, R. e cols. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae): Um novo registro de distribuição para a flora de Ghats Oriental, Índia. **Tropical Plant Research**, v. 5, n. 3, pág. 303-305. 2018.
- PRATIWI RH, HANAFI M, ARTANTI N, PRATIWI RD. Bioactivity of antibacterial compounds produced by endophytic actinomycetes from *Neesia altissima*. **J Trop Life Science**; 8:37–42. 2018.
- RAI, M. et al. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. **Symbiosis**, v. 62, n. 2, p. 63-79. 2014.
- RAJA, H. A. et al. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 756–770. 2017.
- RAJA, H. A., OBERLIES, N. H., STADLER, M. **Occasional comment: Fungal identification to species-level can be challenging.** 2021.
- RAJAMANIKYAM, M. et al. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017.

RIDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, 42(2), 265-270. 1950.

RODRIGUES, R. A.; ARAUJO, A. V.; CUNHA, R. M.; CARVALHO, C. M. Antibacterial activity of endophytic fungi from the medicinal plant *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 15, p. 179-185, 2018.

RODRIGUEZ, R.J., WHITE, J.F..Jr., ARNOLD, A.E., REDMAN, R.S.. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**. 182: 314-330. 2009.

RUSTAMOVA, N., BOZOROV, K., EFFERTH, T. and YILI, A. Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. **Phytochemistry Reviews**, vol. 19, no. 2, pp. 425-448. 2020.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 46, n. 5, p.657-674, 10 nov. 2018.

SANTOS, G. D. **Influência dos fungos endofíticos no potencial antimicrobiano de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae)**. 2013.

SANTOS, C. et al. Fungal endophytic community associated with guarana (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*): diversity driver by genotypes in the centre of origin. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 123. 2020.

SAVI, D.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Erratum: Brazilian Plants. **Planta Medica**, p.619- 636, 21 fev. 2019.

SHANKAR, R.; HARSHA, S.; BHANDARY, R. A practical guide to identification and control of cucumber diseases. **Tropical seeds**. 2014.

SHI, P. et al. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. **Food science & nutrition**, v. 7, n. 1, p. 148-154. 2019.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 3, p. 649-655. 2006.

SILVA, J. A. (2013). **Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão de *Eleutherine plicata* Herb**. Belém, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFPA.

SILVA, Igor. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopedia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.

SILVA-HUGHES AF, WEDGE DE, CANTRELL CL, CARVALHO CR, PAN Z, MORAES RM, MADDOXX VL, ROSA LH. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi

associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. **Microbiological Research**, 175: 67-77, 2015.

SILVA SMM, SILVA CAG, BAZZO YMF, MAGALHÃES PO, SILVEIR D. *Eugenia dysenterica* Mart. ExDC. (cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. **Revista Infarma Ciências Farmacêuticas**. 2015; 27(1):49-95.

SILVA, M. H. R. D. (2017). **Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico**.

SOUSA, B. D. S., OLIVEIRA, D. R. D., ROCHA, F. V. R. D., CANTO, E. S. M., OLIVEIRA, D. P. D., SANTOS, T. T. D. Fungos endofíticos associados à planta medicinal corama (*Kalanchoe pinnata* [Lam.] Pers.). **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**. v. 5, n. 3, p. 30-45, 2018.

SOUSA, Fulvia Soares Campos de. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Pyrostegia venusta***. 2021.

STELLA, P. F. et al. Maturação, amadurecimento de frutos e controle de podridões de *Penicillium* spp. em maçãs ‘Fuji’ com a aplicação pré-colheita de indutores de resistência. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 2013.

STEPNIEWSKA Z., KUZNIAR A. Endophytic microorganisms-promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 97:9589–596, 2013.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **J Fungi (Basel)**, v. 4, 2018.

SUDHA, V., GOVINDARAJ, R., BASKAR, K., AL-DHABI, N. A., DURAI PANDIYAN, V.. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 59, e16150436, 2016.

SUN, X.; GUO, L.; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 85-95, 2011.

TANG, Z. et al. Isolation and identification of flavonoid-producing endophytic fungi from medicinal plant *Conyza blinii* H. Lévl that exhibit higher antioxidant and antibacterial activities. **PeerJ**, v. 8, p. e8978, 2020.

TROVÃO, J., PEREIRA, L. Introdução ao estudo dos Microfungos Guia simples para a iniciação à identificação. **Researchgate**. 2018.

TCHAMGOUE, E. N., FANCHE, S. A. Y., NDJAKOU, B. L., MATEI, F., & NYEGUE, M. A. Diversity of Endophytic Fungi of *Psidium guajava* (Myrtaceae) and Their Antagonistic Activity against Two Banana Pathogens. **Methodology**. 2020.

VALE, V.V.; CRUZ, J.N.; VIANA, G.M.; POVOA, M.M.; BRASIL, D.D.; DOLABELA, M.F. Naphthoquinones isolated from *Eleutherine plicata* herb: In vitro antimalarial activity and molecular modeling to investigate their binding modes. **Med. Chem. Res.**, 3, 487–494, 2020.

VANDANA U.K., RAJKUMARI J., SINGHA L.P., et al. The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. **Biology (Basel)**. 10(2): 101, 2021.

VARGAS, S. L. P.; ALBUQUERQUE, E. K. B.; RIBEIRO, S. A. L.; ARAUJO, A. V.; CUNHA, R. M.; CARVALHO, C. M. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Croton lechleri* (Euphorbiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 15, p. 170-178, 2018.

VAZ, A. B. M. **Diversidade e aplicações biotecnológicas de fungos endofíticos associados a espécies da sub-família Mirtoideae (Myrtaceae) presentes em ecossistemas do Brasil, Argentina e Espanha.** 2012.

VIEIRA, M.L.A., HUGHES, A.F.S., GIL, V.B., VAZ, A.B.M., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Canadian Journal of Microbiology**. 58: 54-66, 2012.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WHITE, J. F. et al. Review: Endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p.2558-2565, 27 jul. 2019.

YAN, L. et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 102, n. 15, p. 6279-6298. Springer Science and Business Media LLC. 29 maio 2018.

YAN, L. et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 103, n. 8, p.3327-3340, 7 mar. 2019.

YAO, Y. Q. et al. Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: Diversity and biocontrol potential against phytopathogens. **Microbiologyopen**, v. 6, n. 3, p.1-0, 15 mar. 2017.

ZAPNI, D. C. et al. **Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil.** *Rodriguésia*, 66(4), 1085-1113, 2015.

ZHANG, Y. et al. Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 7, p. 963-968, 2012.



## CAPÍTULO II- FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

### 2.1 Introdução

Os diferentes biomas presentes no Brasil possuem características distintas e específicas a cada um deles, que favorece a descoberta de novos compostos bioativos, potencialmente capazes de solucionar problemas terapêuticos (FLORINDO, 2019). A busca por novos produtos naturais com potencial biotecnológico relacionados a biodiversidade amazônica, tem conduzido um número crescente de pesquisas para a obtenção de compostos capazes de desenvolver novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2016; ÍOCA *et al.*, 2018). Essa busca iniciou desde a descoberta da Penicillina por Alexander Fleming em 1928, que contribuiu no tratamento de infecções por patógenos bacterianos (SILVA, 2016; PEREIRA; PITA 2018). E teve continuidade a partir da investigação de produtos naturais bioativos a partir de microrganismos endofíticos, devido seu grande potencial na produção de metabólitos primários e secundários, proporcionando uma gama de benefícios para sua hospedeira (HARDOIM *et al.*, 2015).

Os fungos, na maioria das vezes, são tidos como microrganismos causadores de doenças nos humanos, animais e plantas. No entanto, são microrganismos com grande importância ecológica, industrial, farmacêutica, ambiental e alimentícia (HUGHES, 2016). Onde se destacam os fungos endofíticos, microrganismos que vivem no interior dos tecidos das plantas de forma assintomática (FLORINDO, 2019; ADELEKE; BABALOLA, 2021). Essa interação entre plantas e fungos, resulta na produção de subprodutos pelo metabolismo único que os fungos possuem, sendo estes: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão relacionados ao crescimento e reprodução (PARDO *et al.*, 2022). Já os metabólitos secundários estão relacionados as respostas ao stress, como mecanismos de defesa e capacidade de se manter em condições extremas (KHAN *et al.*, 2015; YUN *et al.*, 2018).

As substâncias ativas produzidas por esses endófitos estão sendo bastante exploradas quanto a produção de fármacos para diversas finalidades (ALVIN *et al.*, 2014), levando em conta a diversidade de atividades biológicas que atuam como: propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, citotóxica, imunossupressora e antiparasitárias (CHAPLA *et al.*, 2013; PAMPHILE *et al.*, 2017). Entre os metabólitos fúngicos originários dos endofíticos, encontra-se o Taxol, isolado primeiramente da espécie *Talaromyces andreanae* (Strobel), responsável pela indução da apoptose de células cancerígenas, e posteriormente encontrado em outros endófitos (CHAPLA *et al.*, 2013; PAMPHILE *et al.*, 2017). Tendo assim, os fármacos

antimicrobianos derivados de fungos, como uma alternativa de produção com menores impactos ambientais e econômicos, além de apresentarem uma alta produtividade e rentabilidade, em comparação aos metabólitos oriundos de outros microrganismos ou produzidos sinteticamente, devido ao aumento da resistência de bactérias e fungos aos múltiplos antimicrobianos (WHO, 2014; FORTKAMP, 2018; MANGANYI e ATEBA, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana (RAM) é definida como a capacidade de um microrganismo impedir a atuação de um antibiótico. Essa resistência ocorre devido microrganismos como bactérias, fungos, vírus e parasitas resistentes mudarem a resposta aos antimicrobianos (MAIA *et al.*, 2021). O antibiótico, é um antimicrobiano, medicamento utilizado na prevenção e tratamento de infecções bacterianas (MIRANDA *et al.*, 2022). A resistência antimicrobiana se tornou uma ameaça mundial, devido ao uso constante, incorreto e desnecessário de antibióticos pela população (DREKONJA, 2015; SCOTT *et al.*, 2019; DUART *et al.*, 2019). Essa prática do uso inadequado favorece a disseminação e resistência de microrganismos patogênicos como bactérias e fungos em diferentes ambientes (KHAN *et al.*, 2017). As infecções por esses organismos resistentes resultam no aumento das taxas de mortalidade, pois possuem tratamentos mais caros, devido as internações hospitalares mais longas, resultando em uma carga maior para os sistemas de saúde (ALEFAN, 2016). Além disso, a resistência dos microrganismos aos antibióticos pode estar relacionada a ausência de inovação e pesquisa, no qual os mecanismos de combate não conseguem acompanhar o mesmo ritmo da evolução desses microrganismos (ESTRELA, 2018).

Os principais grupos bacterianos associados às infecções humanas são: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; PRESTERL *et al.*, 2019). As bactérias apresentam mecanismos de resistência frente aos agentes antimicrobianos, como a limitação na absorção do fármaco, modificação do alvo do fármaco, inativação e efluxo ativo do fármaco (CANTO, 2020). Esses diferentes mecanismos podem ser naturais dos microrganismos, através da formação de biofilmes, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, mutações, produção de  $\beta$ -lactamases, bombas de efluxo, entre outros (LIEW *et al.*, 2019; PINTO, 2019). Ou adquiridos por meio de transferência horizontal de genes e recombinação genética de outros microrganismos, quando administradas grandes quantidades de antimicrobianos, resultando na expressão de genes resistentes, e no seu compartilhamento com outras bactérias, aumentando gradativamente as

taxas de resistência (BAPTISTA, 2013; MAIA, 2021), além da variabilidade de resistência intrínseca e adquirida entre as espécies (SANGUINETTI *et al.*,2015).

Com o avanço da Biotecnologia, a bioprospecção de metabólitos secundários resultantes da interação de plantas com os fungos endofíticos, tem despertado interesse na realização de novos estudos para avaliar suas potenciais aplicações biotecnológicas. Possibilitando a partir dos microrganismos endofíticos, a descoberta de novas alternativas derivadas de fontes naturais promissoras, com atividades clínicas e farmacológicas. As propriedades antimicrobianas da espécie vegetal *Eleutherine bulbosa*, já foram relatadas na literatura, no entanto, o potencial bioativo dos fungos endofíticos da espécie ainda não foram relatados. Diante disso, o trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano dos caldos metabólitos brutos de fungos endofíticos isolados da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Geral

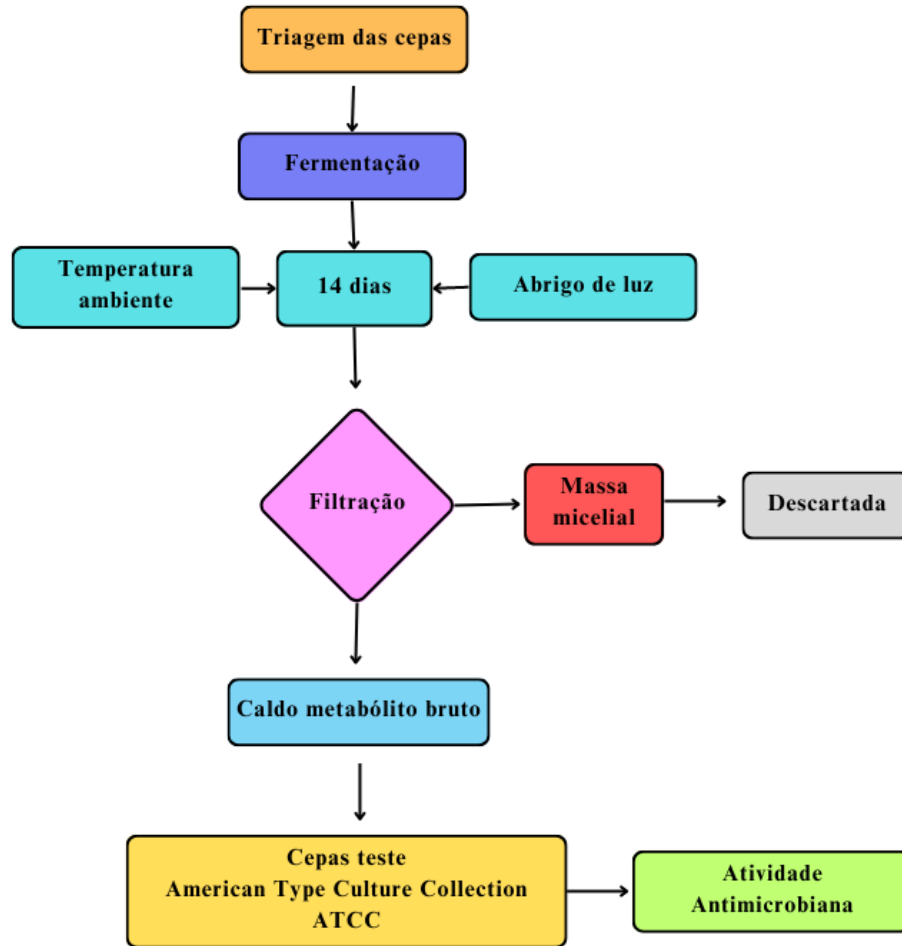
Investigar o potencial antimicrobiano dos caldos metabólitos brutos de fungos endofíticos isolados da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.

### 2.2.2 Específicos

- Isolar fungos endofíticos que apresentem metabólitos com potencial antimicrobiano;
- Avaliar se os fungos cultiváveis presentes em amostras de *Eleutherine bulbosa* possuem atividade antimicrobiana.

## 2.3 Metodologia

Figura 1- Metodologia da fermentação e obtenção dos caldos metabólitos brutos para teste antimicrobiano.



Fonte: AUTORA (2023).

### 2.3.1 Isolamento dos fungos endofíticos

Foram selecionados 4 fragmentos de (folhas, bulbos e raízes) de 6 espécimes de *E. bulbosa*, para o isolamento dos fungos endofíticos. As partes do vegetal analisadas, foram previamente submetidas ao processo de desinfecção superficial em etanol 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos, novamente em etanol 70% (v/v) e lavagens em água destilada (GONZAGA *et al.* 2014).

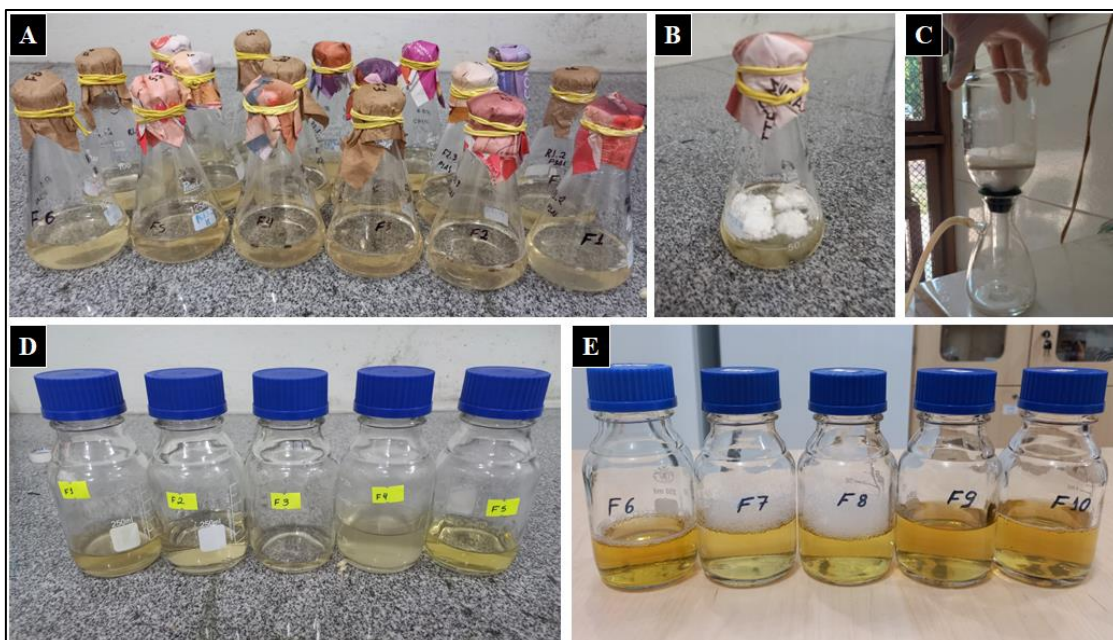
Após a desinfecção, fragmentos de aproximadamente 5 mm foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA: batata 250g/L, ágar 25g/L, dextrose 10g/L, acrescido de extrato de levedura 1,5g/L) acrescido com o antibiótico cloranfenicol (0,05g/L). Em seguida, as placas foram incubadas a 27°C de 5 a 14 dias.

À medida que haviam crescimentos fúngicos, os mesmos eram transferidos para novas placas de Petri contendo BDA para purificação. Com os isolados já purificados, foi realizada a preservação em tubos de ensaios de vidro, contendo meio de cultura BDA inclinado (CAPRILES *et al.*, 1989) e preservação pelo método Castellani (1939).

### 2.3.2 Fermentação das culturas fúngicas para obtenção do caldo metabólito bruto

Para a avaliação do potencial antibacteriano foi realizada a obtenção de caldo metabólito bruto de dez isolados fúngicos (cinco isolados obtidos das folhas e cinco isolados obtidos das raízes), através de cultivo submerso em meio líquido Caldo Batata Dextrose (CDB: 120 g/L de batata, 10 g/L de dextrose). Para isso, as culturas foram repicadas em placa de Petri contendo BDA e incubadas por sete dias. Após esse período, foram retirados discos de 5 mm da cultura do isolado e inoculados em 50 mL de caldo batata dextrose em Erlenmeyer de 125 mL, em triplicata (Figura 2 A). Estes foram incubados em caixas isotérmicas, em condições estáticas por 14 dias em temperatura ambiente e ausência de luz (Figura 2 B). Posteriormente, os inóculos foram submetidos a filtração utilizando papel de filtro (Quanty JP42) em funil de Buchner acoplado a um kitassato e bomba a vácuo, para a separação do micélio (Figura 2 C). Os caldos metabólitos brutos obtidos foram transferidos para frascos reagentes graduados com tampa até o momento da testagem (Figura D-E).

**Figura 2-** Obtenção dos caldos metabólitos brutos: fungos inoculados em meio líquido CDB (A); isolado após 14 dias de fermentação (B); filtração a vácuo (C); caldos metabólitos brutos armazenados em frascos graduados (D e E).



Fonte: AUTORA (2023).

### 2.3.3 Cepas testes

Foram utilizadas linhagens padrão American Type Culture Collection – ATCC de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 33591 e *Enterococcus faecium* ATCC 6560), gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) e levedura (*C. albicans* ATCC 60193). Os microrganismos testes foram obtidos a partir da coleção de cultura de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UFOPA, adquiridas do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). As cepas testes foram previamente incubadas a 37°C por 24h em Ágar Müeller Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA: ágar 15g/L; dextrose 40g/L; peptona 10g/L) para levedura.

### 2.3.4 Determinação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em poços. Os caldos metabólitos brutos foram submetidos à técnica de perfuração em ágar, de acordo com o Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI (2012), (EUA: norma M02-A-1 - Padrões de Desempenho Antimicrobiano para Testes de Sensibilidade em disco) com modificações. Para a preparação do inóculo, as cepas testes foram diluídas em solução salina a 0,85% ajustando a turvação para escala de 0,5 MacFarland, padronizando o inóculo em comprimento de onda 625nm e absorvância de 0,08 a 0,1 para bactérias e comprimento de onda 530nm e absorvância de 0,12 para levedura, medidas em espectrofotômetro (1105 BEL PHOTONICS®).

Por meio do Método *pour-plate*, adicionou-se 1 ml da suspensão de células as placas de Petri estéreis, em seguida foram adicionados 25 mL de meio fundido Ágar Müeller Hinton (Kasvi®) para as suspensões bacterianas, e 25 mL de meio fundido Ágar Sabouraud Dextrose para a suspensão fúngica, as quais foram submetidas a suaves movimentos rotativos para homogeneizar a mistura da suspensão com o ágar. Após a solidificação do Ágar, as suspensões testes foram semeadas com o auxílio de swab estéril em diferentes direções no meio de cultura. Foram removidas pequenas porções do meio de cultura sólido Ágar Müeller Hinton (Kasvi®) e do meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose com o auxílio de ponteiros de 1.000µL, que formaram poços regulares de aproximadamente 6mm de diâmetro.

Os poços foram preenchidos com 100µL dos caldos metabólitos brutos em triplicata na mesma placa. Como controle positivo de crescimento bacteriano foram adicionados 10µL de Ciprofloxacino (50µg), como controle positivo da levedura foram adicionadas 10µL de

Fluconazol (25µg), e como controle negativo foram adicionadas 100µL de solução salina (0,85%). Posteriormente as placas inoculadas foram levadas a estufa a 37°C por 24 horas. Passado esse período, o caldo metabólito endofítico que não permitiu o crescimento bacteriano ao redor do poço foi considerado antibacteriano e o que não permitiu o crescimento fúngico foi considerado antifúngico.

#### 2.3.5 Análise de dados

Para a análise da atividade antimicrobiana, foi avaliada a presença ou ausência dos halos de inibição. Quanto a presença, foi realizada a medição das triplicatas dos halos de inibição, em milímetros, com o auxílio de um paquímetro. Em seguida, foram tiradas as médias dos halos.

### 2.4 Resultados e Discussão

O presente estudo encontrou fungos endófitos dos gêneros *Penicillium* (Link), *Fusarium* (Link), *Paecilomyces* (Bainier), *Phaeoacremonium* (W. Gams) e *Muyocopron* (Speg.), pertencentes ao filo Ascomycota, com atividade antimicrobiana promissora entre os dez isolados submetidos ao bioprocessamento, analisado de acordo com a Tabela 1. Segundo MARTINEZ-KLIMOVA *et al.*, (2017), estudos mostram que mais de 80% dos isolados endofíticos de importância biotecnológica relatadas são ascomicetos.

No teste realizado com os caldos metabólitos brutos fúngicos, verificou-se atividade de inibição de crescimento em ao menos uma das cinco cepas ATCC testadas: *Enterococcus faecium* ATCC 6560, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 60193. Os gêneros *Muyocopron* e *Paecilomyces* apresentaram halos de inibição de crescimento frente a cepa *E. faecium* ATCC 6560, o gênero *Fusarium* apresentou halos de inibição contra a cepa *C. albicans* ATCC 60193 e o gênero *Phaeoacremonium* apresentou halos de inibição frente a cepa *E. coli* ATCC 25922, somente o caldo do isolado do gênero *Penicillium* apresentou atividade para duas cepas testadas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. faecium* ATCC6560. A Tabela 1 apresenta a média dos halos de inibição dos caldos metabólitos brutos testados.

**Tabela 1-** Média dos halos de inibição em (mm) dos caldos metabólitos brutos dos isolados fúngicos de *Eleutherine bulbosa*.

Táxon	Microrganismos teste				
	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Ca</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>
Halos de inibição (mm)					
F1- <i>Fusarium</i>	-	-	21,8 ± 4,75	-	-
F2- <i>Xylaria</i>	-	-	-	-	-
F3- <i>Xylaria</i>	-	-	-	-	-
F4- <i>Phaeoacremonium</i>	-	-	-	9,3 ± 1,15	-
F5- <i>Penicillium</i>	-	7,5 ± 0,50	-	-	5,3 ± 0,76
F6- <i>Muyocopron</i>	-	-	-	-	-
F7- <i>Paecilomyces</i>	-	5,3 ± 0,58	-	-	-
F8- <i>Muyocopron</i>	-	6,5 ± 1,32	-	-	-
F9- <i>Acrocalymma</i>	-	-	-	-	-
F10- <i>Eutypella</i>	-	-	-	-	-

\**Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Ef*: *Enterococcus faecium*; *Ca*: *Candida albicans*; *Ec*: *Escherichia coli*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*.

\* (-) Ausência do halo de inibição.

**Fonte:** Autora (2023).

A cepa teste que mais apresentou susceptibilidade aos caldos metabólitos brutos foi *E. faecium*, 3 (30%), uma bactéria gram-positiva. Esse resultado sugere uma ação antimicrobiana com alvo principal a camada peptidoglicana presente na parede celular bacteriana (PINTO, 2019). Seguida de *P. aeruginosa* e *E. coli* bactérias gram-negativas, e *C. albicans* fungo leveduriforme.

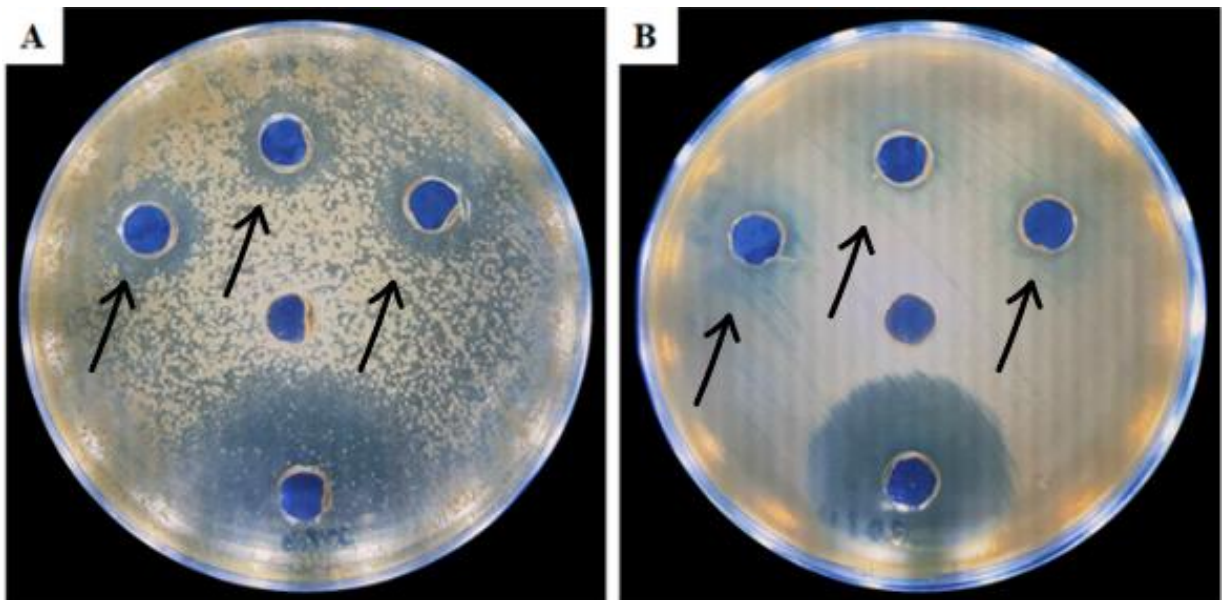
O caldo metabólito bruto do gênero endófito *Penicillium*, foi o que se mostrou promissor entre os taxa estudados, ao apresentar atividade frente a duas cepas patogênicas testadas com halos de inibição com média de (7,5 mm) demonstrando atividade bactericida para *E. faecium* e (5,3 mm) para *P. aeruginosa*, com atividade bacteriostática. Além disso, *Penicillium* é um gênero intensamente empregado em diversos processos biotecnológicos (PARK *et al.*, 2017), possuindo atividade antimicrobiana já relatada (DINESH *et al.*, 2017), o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo. De acordo com a NCBI (2016), a bactéria *P. aeruginosa* está entre as bactérias mais resistentes em ambientes hospitalares, devido a sua grande resistência aos antibióticos de última geração, por meio de mecanismos de resistência como bombas de efluxo, alteração de canais porinas, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, produção de



$\beta$ -lactamases, mutações de topoisomerasas e formação de biofilmes, o que tem sido um dos pontos principais discutidos pela OMS.

A atividade bacteriostática de *Penicillium* frente a cepa bacteriana gram-negativa *P. aeruginosa*, sugere que esse resultado pode ser justificado pela barreira de permeabilidade composta por lipopolissacarídeos (LPS) presente na membrana externa dessas bactérias, as quais podem ter afetado o desempenho do caldo metabólito bruto do isolado (AUER e WEIBEL 2017). Na Figura 3 são apresentados os halos de inibição de *Penicillium* frente as cepas *E. faecium* e *P. aeruginosa*.

**Figura 3-** Halos de inibição do fungo endofítico do gênero *Penicillium* frente as cepas de bactérias: *Enterococcus faecium* gram-positiva (A) e *Pseudomonas aeruginosa* gram-negativa (B).

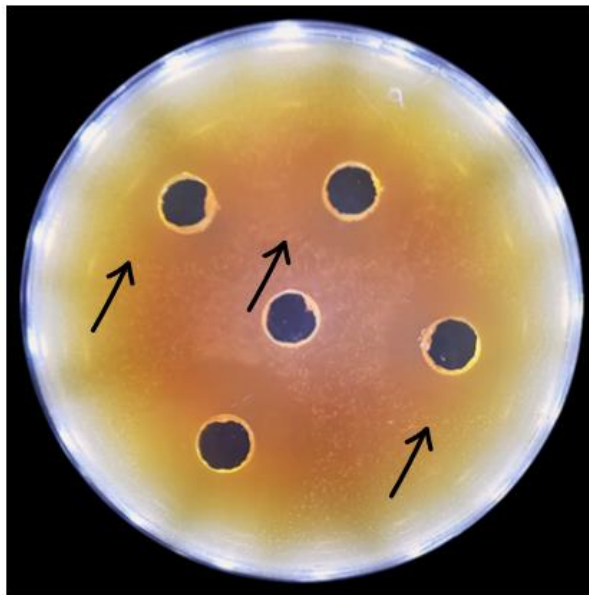


**Fonte:** AUTORA (2023).

Os halos de inibição do endófito do gênero *Fusarium* com média de (21,8 mm), demonstrando atividade fungistática frente a cepa *C. albicans*. A atividade antimicrobiana de *Fusarium* observada nesse estudo, corrobora com o de KyeKyeku *et al.* (2017), que relatou a produção de seis compostos derivados da fusarina com atividade inibitória. Além da atividade antimicrobiana, o gênero produz outro importante metabólito secundário anticancerígeno, a vincristina, isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* (Schltdl.) obtido da planta *Catharanthus roseus* (L.) já foi relatada em literatura (KUMAR *et al.*, 2013). Segundo Whaley e colaboradores (2017), a crescente resistência entre as espécies de *Candida* aos fármacos, é resultado da exposição prévia em terapias fúngicas, onde cada espécie possui seus próprios mecanismos de escape, seja através de mutação ou regulação gênica frente ao fármaco.

O gênero *Phaeoacremonium* é caracterizado como fitopatogênico, onde na literatura não se tem relatos como endófito, nem possuindo atividade antimicrobiana. No entanto, a atividade antimicrobiana bactericida obtida no presente trabalho frente a cepa bacteriana *E. coli* com halos de inibição com média (9,3 mm) já foi relatada em um estudo de Garcia et al. (2012), no qual apresentou atividade antimicrobiana a partir de metabólitos secundários originados de fungos endofíticos da planta medicinal *Sapindus saponaria* (L.) contra a cepa bacteriana *E. coli*. A figura 4 apresenta halos de inibição de *Phaeoacremonium* frente a cepa *E. coli*.

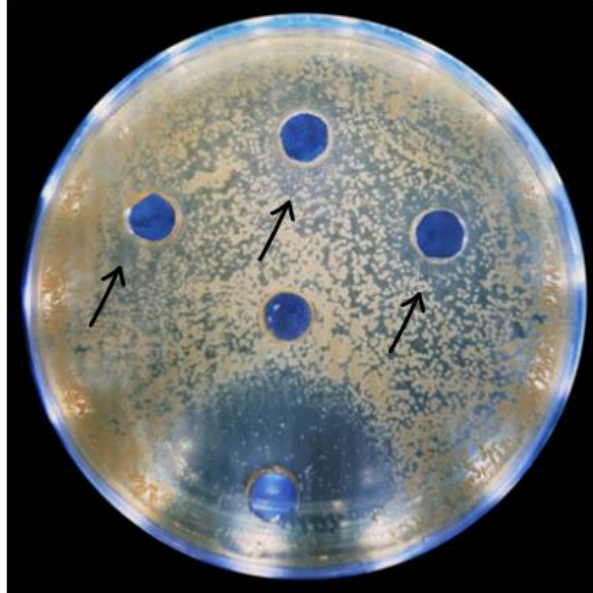
**Figura 4-** Halos de inibição do endófito *Phaeoacremonium* frente a cepa bacteriana gram-negativa *Escherichia coli*.



**Fonte:** AUTORA (2023).

A atividade antimicrobiana bacteriostática do gênero *Paecilomyces* observada neste estudo frente a cepa bacteriana gram-positiva *E. faecium*, apresentando halos de inibição com média (5,3 mm), corrobora com a potencial atividade antimicrobiana que o gênero possui, encontrada em um estudo de Guimarães *et al.* (2013), onde o fermentado do isolado endofítico *Paecilomyces clavisporus* (Hamm.) obtido da planta medicinal erva-de-passarinho *Cladocolea michrantha* (Eichler), foi ativamente capaz de inibir o crescimento da cepa de bactéria gram-negativa *E. coli*, além das cepas *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A Figura 5 apresenta os halos de inibição de *Paecilomyces* frente a cepa *E. faecium*.

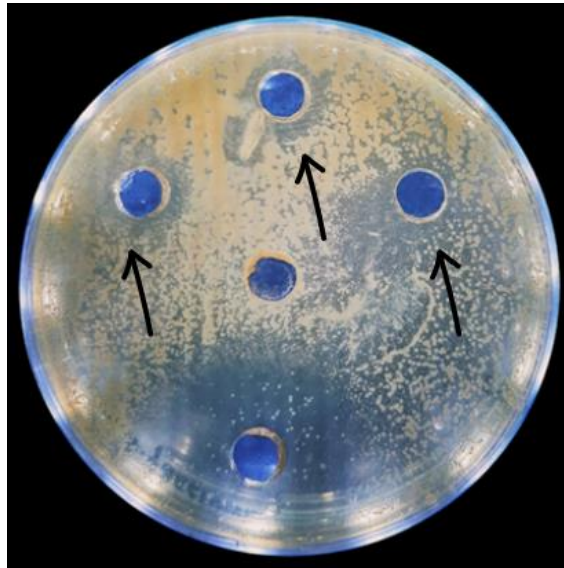
**Figura 5-** Halos de inibição do endófito *Paecilomyces* frente a cepa bacteriana gram-positiva *Enterococcus faecium*.



**Fonte:** AUTORA (2023).

O gênero endófito (F8) *Muyocopron*, apresentou atividade antimicrobiana bacteriostática frente a cepa *E. faecium* com halos de inibição com média (6,5 mm). O que corrobora com o estudo de Nakashima e colaboradores (2020), no qual a espécie endofítica *Muyocopron laterale* (Alcorn) isolada das folhas da espécie vegetal *Canavalia lineata* (Thunb.), apresentou atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de bactérias gram-positivas quando submetidas a ensaios antimicrobianos com duas azafilonas produzidas pelo endófito. Espécies do gênero *Muyocopron* são caracterizadas pela produção de um biocomposto conhecido como azafilona, um corante natural pertencente a uma classe de policetídeos fúngicos com diversas atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana (GAO *et al.*, 2013). A figura 6 apresenta halos de inibição de *Muyocopron* frente a cepa *E. faecium*.

**Figura 6-** Halos de inibição do endófito *Muyocopron* frente a cepa bacteriana gram-positiva *Enterococcus faecium*.



**Fonte:** AUTORA (2023).

Segundo Song e colaboradores (2014) o gênero *Xylaria* é caracterizado por seu grande potencial relacionado a produção de metabólitos secundário de diferentes classes, isolados de várias espécies vegetais (RADIC; STRUKELJ, 2012), como a *Ginkgo biloba* (L.) (LIU *et al.*, 2008). No entanto, não apresentou atividade inibitória contra nenhuma das cepas testadas nas condições submetidas, o que difere de trabalhos como o de Santos (2013), onde uma espécie de *Xylaria* isolada da planta *Schinus terebinthifolius* (Raddi), apresentou atividade frente as cepas *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, este gênero está entre o grupo de fungos endofíticos produtores de citocalasinas, uma classe de metabólitos secundários estruturalmente complexos (ZHANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014), com importantes atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana (XU *et al.*, 2009).

Neste estudo, não houve a presença de atividade antimicrobiana contra a cepa *S. aureus*. Esse resultado difere de trabalhos como os de Santos (2013), no qual os fungos endofíticos do gênero *Fusarium*, *Xylaria* e *Epicoccum* isolados das folhas de *Schinus terebinthifolius* demonstraram halos de inibição frente a cepa *S. aureus*. Assim como no estudo de Pinto (2019), no qual o maior número de inibições dos fungos endofíticos isolados de (*Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub.), foram observados frente a cepa *S. aureus*.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Contudo, a partir da fermentação dos isolados fúngicos e obtenção dos caldos metabólitos brutos, pode-se realizar testes para avaliar a produção de atividade antibacteriana frente as cepas de interesse médico. Portanto, acredita-se que substâncias produzidas por fungos endofíticos são uma alternativa para a composição de fármacos antimicrobianos mais eficientes. Ressaltando a necessidade de se realizar novos estudos, para investigar substâncias produzidas por fungos endofíticos presentes em plantas consideradas medicinais, afim de conhecer novos compostos com diferentes aplicações voltadas a saúde pública.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELEKE, B. S., BABALOLA, O. O. Potencial farmacológico de fungos endófitos associados a plantas medicinais: uma revisão. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, pág. 147. 2021.
- ALEFAN Q, HALBOUP A. **Pharmacy practice in Jordan. In: Pharmacy practice in developing countries.** 2016.
- ALVIN, Afonso; MILLER, Kristin I.; NEILAN, Brett A. Explorando o potencial de endófitos de plantas medicinais como fontes de compostos antimicobacterianos. **Pesquisa microbiológica**, v. 169, n. 7-8, pág. 483-495. 2014.
- AUER, G. K., WEIBEL, D. B. Bacterial cell mechanics. **Biochemistry**, v. 56, n. 29, p. 3710-3724. 2017.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos.** 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacê-ticas) - Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 2013.
- CANTO, E. S. M. **Diversidade e produção de antimicrobianos dos fungos decompositores de madeira submersa em lagos da região do baixo rio –apajós - Pará.** 117 p. Dissertação (Doutorado em Biodiversidade e Biotecn–logia) - Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus. 2020.
- CAPRILES, H., MATA, S., MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 42, 225-226. 1939.
- CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. **Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais.** Revista Virtual de Química, v.5, n.3. 2013.
- CLSI. (2012). **M02-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition.** Disponível em: < [www.clsi.org](http://www.clsi.org) > Acesso em 12 de dez. 2022.
- DINESH, S. et al. Pharmacological evaluation of endophytic *Penicillium pimateouiense* SGS isolated from *Simarouba glauca* DC. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 9, p.142-147, set. 2017.
- DREKONJA DM, FILICE GA, GREER N, OLSON A, MACDONALD R, RUTKS I, WILT TJ. Antimicrobial stewardship in outpatient settings: a systematic review. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2015.

DUART, S.M.S. et al. Revisão Sistemática da Resistência e Farmacodinâmica de Antibióticos. **Brazilian Journal of Development**, v.5 (10), p. 21476-21489. 2019.

ESTRELA, T.S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. Brasil, Ministério da Saúde. Assessoria de assuntos internacionais de saúde. **Saúde e política externa**, 20: 1998. 2018.

FLORINDO, R.H.S. **Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do 38 Rio Doce, Minas Gerais**. Universidade Federal de Ouro Preto. Dissertação de Mestrado. 2019.

FORTKAMP, D. **Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.

GARCÍA A., RHODEN S. A., FILHO C.J. R., NAKAMURA C. V., PHAMPILE J. A. Diversity of Foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindussaponaria* L. and their Localization byscannin gelectron microscopy. **Biol Res**. 45: 139-148. 2012.

GAO, H. et al. Diorcinols B-E, new prenylated diphenyl ethers from the marinederived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60. **The Journal of Antibiotics** 2013 66:9, v. 66, n. 9, p. 539–542, 15 maio 2013.

GONZAGA, L. L., COSTA, L. E. O., SANTOS, T. T., ARAÚJO, E. F., & QUEIROZ, M. V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of applied microbiology**, 118(2), 485-496. 2014.

GUIMARÃES, A. C. et al. **Investigação preliminar da composição micelial e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da erva-de-passarinho amazônica *Cladocolea micrantha* (Eichler) Kuijt (Loranthaceae)**. 2013.

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

HUANG, R; MA, K; XIE, X; WANG, T; WU, S. Secondary metabolites of an endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n.2, p.392-394. 2015.

HUGHES, E. Endophytic Fungi Diversity, Characterization and Biocontrol. **Microbiology Research Advances**. New York, Nova Publishes, pp. 1-163. 2016.

IÓCA, L. P.; NICACIO, K. J.; BERLINCK, R. G. Natural Products from Marine Invertebrates and Microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 998–1031. 2018.

KHAN, A.R. et al. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 9, p. 1461–1466. 2015.

- KHAN, H. A., BAIG, F. K., MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 5, p. 478-482. 2017.
- KUMAR, S. et al. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PloS one*, v. 8, n. 2, p. e56202. 2013.
- KYEKYEKU, J. O. et al. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. *Fitoterapia*, v. 119, p. 108-114. 2017.
- LIEW, S. M. et al. Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PeerJ*, v. 7, p. e6217. 2019.
- LIU, XIAOLI; DONG, M.; CHEN, X. et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.78, p.241–247, 2008.
- MAIA, P. L. C. et al. Atenção farmacêutica: uma abordagem sobre a resistência antimicrobiana e o uso inadequado na vida cotidiana. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 4, p. 43347-43362. 2021.
- MAIA, P. L. C., SANTOS, J. K. G., BARROS, N. B., & BARROS, R. R. Atenção farmacêutica: uma abordagem sobre a resistência antimicrobiana e o uso inadequado na vida cotidiana. *Brazilian Journal of Development*, 7(4). 2021.
- MANGANYI, M. C.; ATEBA, C. N. Untapped Potentials of Endophytic Fungi: A Review of Novel Bioactive Compounds with Biological Applications. *Microorganisms*, v. 8, n. 12, p. 1934, 2020.
- MARTINEZ-KLIKOVA, E., RODRÍGUEZ-PEÑA, K., SÁNCHEZ, S. Endófitos como fontes de antibióticos. *Farmacologia bioquímica*, v. 134, p. 1-17, 2017.
- MIRANDA, I. C. S., VIEIRA, R. M. S., SOUZA, T. F. M. P. Consequências do uso inadequado de antibióticos: uma revisão da literatura. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, v. 11, N. 7, pág. e58411730225-e58411730225. 2022.
- NAKASHIMA, K. I., TOMIDA, J., HIRAI, T., KAWAMURA, Y., & INOUE, M. Absolute configurations of talaromycones A and B,  $\alpha$ -diversonolic ester, and aspergillusone B from endophytic *Talaromyces* sp. ECN211. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16(1), 290-296. 2020.
- NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, v. 79, n. 3, p. 629-661. 2016.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Relatório alerta para aumento de resistência a antibióticos em infecções bacterianas**. 2022.



- PAMPHILE, J.A. et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum sp.* **Revista UNINGÁ**, Maringá, v. 53, n. 1, p. 113-119. 2017.
- PARK, H. et al. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. **Advances In Applied Microbiology**, p.161-202. 2017.
- PARDO, Sthefani Nicole Frosi et al. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 33120-33140, 2022.
- PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prémio Nobel (1945). **História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto**, v. 6. 2018.
- PRESTERL, E. et al. Multiresistant Microorganisms and Infection Control. In: **Basic Microbiology and Infection Control for Midwives**. Springer, Cham, 2019. p. 97- 105.
- PINTO, R. A. F. O. et al. **Bioprospecção e caracterização de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos isolados de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.** 2019.
- RADIC, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi — The treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v.19, p.1270–1284. 2012.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2-13. 2015.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Escape Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- SANTOS, G. D. **Influência dos fungos endofíticos no potencial antimicrobiano de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae).** 2013.
- SCOTT, H. M. et al. Antimicrobial resistance in a One Health context: exploring complexities, seeking solutions, and communicating risks. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1441, n. 1, p.3-7, 29 mar. 2019.
- SILVA, S. M. D. et al. **Correlação metabólica entre fungos endofíticos de amaryllidaceae e as plantas hospedeiras na busca por substâncias bioativas.** 2016. 98f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará, 2016.
- SONG, F.; WU, S.; XUAN, Q.; WANG, T.; CHEM. Biodiversity, 11, 673; Kirk, P. M.; Cannon, P. F.; Minter, D. W.; Stalpers, J. A.; **Ainsworth & Bisby's Dictionary of th<sup>e</sup> Fungi**, 10th ed. 2014.
- WHALEY, S. G. et al. Resistência a antifúngicos azólicos em *Candida albicans* e espécies emergentes de *Candida* não albicans. **Fronteiras em microbiologia**, v. 7, p. 2173, 2017.
- WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, v. 1, p. 234, 2014.

XU, L. L., HAN, T., WU, J. Z., ZHANG, Q. Y., ZHANG, H., HUANG, B. K., QIN, L. P. Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. **Phytomedicine**, 16(6-7), 609-616. 2009.

YUN, H.-G. et al. Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea*. **Mycobiology**, [s.l.], v. 45, n. 3, p. 192–198, 2018.

ZHANG, P. et al. Varioxepine A, a 3H-Oxepine-Containing Alkaloid with a New Oxa-Cage from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Paecilomyces variotii*. **Organic Letters**, v. 16, n. 18, p.4834-4837, 28 ago. 2014.

ZHANG, F. et al. A thiopyranchromenone and other chromone derivatives from an endolichenic fungus, *Preussia africana*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 2, p. 230-237, 2012.

## ANEXO 1

Tabela 2 - Caracterização Macroscópica dos isolados cultiváveis obtidos de *Eleutherine bulbosa*.

Código	Textura	Morfologia	Topologia	Elevação	Margem
F1.1 P1A1	Veludo	Rugosa	Circular	Plana	Inteira
F1.2 P1A1	Veludo	Rugosa	Filamentosa	Plana	Filamentosa
F2.1 P1A1	Veludo	Rugosa	Circular	Elevada	Irregular
F2.2 P1A1	Veludo	Rugosa	Filamentosa	Plana	Filamentosa
F2.3 P1A1	Glabra	Umbiculada	Circular	Umbiculada	Ondular
R1.1 P1A1	Veludo	Rugosa	Circular	Plana	Inteira
R2.2 P1A1	Granular	Rugosa	Circular	Plana	Inteira
F1.1 P1A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.2 P1A2	Veludo	Rugosa	Circular	Plana	Inteira
F1.3 P1A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.4 P1A2	Cotonosa	Umbiculada	Circular	Umbiculada	Inteira
F2.1 P1A2	Veludo	Rugosa	Circular	Elevada	Filamentosa
F2.2 P1A2	Granular	Rugosa	Circular	Elevada	Inteira
R2.1 P1A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Irregular
F1.1 P2A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.2 P2A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.3 P2A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F2.1 P2A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F2.2 P2A1	Cotonosa	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F2.3 P2A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
R2.1 P2A1	Cremosa	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
R2.2 P2A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
R2.3 P2A1	Cremosa	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.1 P2A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.2 P2A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F2.1 P2A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F2.2 P2A2	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
R2.1 P2A2	Glabra	Rugosa	Circular	Umbiculada	Inteira
F1.1 P3A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F1.2 P3A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
F2.1 P3A1	Veludo	Rugosa	Circular	Plana	Inteira
F2.2 P3A1	Veludo	Rugosa	Circular	Plana	Inteira
F2.3 P3A1	Veludo	Umbiculada	Circular	Plana	Inteira
R1.1 P3A1	Veludo	Umbiculada	Filamentosa	Plana	Filamentosa
R1.2 P3A1	Veludo	Umbiculada	Filamentosa	Plana	Filamentosa
F2.1 P3A2	Veludo	Umbiculada	Filamentosa	Plana	Filamentosa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
REITORIA  
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

**1. Identificação do autor**

Nome completo: Rayane Bonfim Ferreira

CPF: 015.542.612-52 RG: 7948304 Telefone: (93) 99192-1007

E-mail: [rayane09bf@gmail.com](mailto:rayane09bf@gmail.com)

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página de rosto?

(X) Sim( ) Não

**2. Identificação da obra**

( ) Monografia (X) TCC ( ) Dissertação ( ) Tese ( ) Artigo científico ( ) Outros: \_\_\_\_\_

Título da obra: Identificação e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos isolados da espécie

*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae).

Programa/Curso de pós-graduação: Bacharelado em Ciências Biológicas/ Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas

Data da conclusão: 15/06/2023.

Agência de fomento (quando houver): \_\_\_\_\_

Orientador: Eveleise Samira Martins Canto

E-mail: [eveleisesamira@hotmail.com](mailto:eveleisesamira@hotmail.com)

Co-orientador: Aysla Mclane Lobato dos Santos

Examinadores: Dra. Graciene do Socorro Taveira Fernandes

Dr. Marcos Diones Ferreira Santana

**3. Informação de disponibilização do documento:**

O documento está sujeito a patentes? ( ) Sim (X) Não

Restrição para publicação: ( ) Total ( ) Parcial (X) Sem restrição

Justificativa de restrição total\*: \_\_\_\_\_

**4. Termo de autorização**

Autorizo a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) a incluir o documento de minha autoria, acima identificado, em acesso aberto, no Portal da instituição, no Repositório Institucional da Ufopa, bem como em outros sistemas de disseminação da informação e do conhecimento, permitindo a utilização, direta ou indireta, e a sua reprodução integral ou parcial, desde que citado o autor original, nos termos do artigo 29 da Lei nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, e da lei 12.527 de novembro de 2011, que trata da Lei de Acesso à Informação. Essa autorização é uma licença não exclusiva, concedida à Ufopa a título gratuito, por prazo indeterminado, válida para a obra em seu formato original.

Declaro possuir a titularidade dos direitos autorais sobre a obra e assumo total responsabilidade civil e penal quanto ao conteúdo, citações, referências e outros elementos que fazem parte da obra. Estou ciente de que todos os que de alguma forma colaboram com a elaboração das partes ou da obra como um todo tiveram seus nomes devidamente citados e/ou referenciados, e que não há nenhum impedimento, restrição ou limitação para a plena validade, vigência e eficácia da autorização concedida.

Santarém, 28/06/2023.

Assinatura do autor

**5. Tramitação no curso**

**Secretaria / Coordenação de curso**

Recebido em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Responsável: \_\_\_\_\_

Siapa/Carimbo