

1 Obtenção e ensaio antimicrobiano de extratos de leveduras isoladas de frutos e bebidas  
2 fermentadas

3

4

5 Robert Langlady LIRA ROSAS FILHO (Universidade Federal do Amazonas – Instituto  
6 de Ciências Exatas e Tecnologia UFAM/ICET) – jr\_rob\_@hotmail.com

7 Maxwel Adriano ABEGG (Universidade Federal do Amazonas – Instituto de Ciências  
8 Exatas e Tecnologia UFAM/ICET) – maxabegg@gmail.com

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

## 21 **Resumo**

22 Os fungos são uma das fontes de biodiversidade menos exploradas em todo o mundo. O  
23 Brasil detém grande parte dessa biodiversidade, mas que ainda é pouco estudada quanto  
24 às suas interações com outros seres vivos ou explorada na busca por novos  
25 medicamentos. Devido ao surgimento de microrganismos resistentes às drogas já  
26 antifúngicas atualmente existentes, os fungos ganharam maior importância na busca por  
27 novos fármacos, uma vez que alguns são vistos como grandes produtores de metabólitos  
28 secundários de potencial interesse farmacológico. O presente trabalho teve por objetivo  
29 inicial extrair metabólitos de leveduras isoladas de bebidas fermentadas consumidas na  
30 Região do Médio Amazonas e de leveduras isoladas de diferentes espécies de frutos  
31 obtidos na mesma região e posteriormente testar os extratos obtidos para atividade  
32 antibacteriana e antifúngica pela difusão de disco. Extratos com atividade nos testes  
33 preliminares seriam ainda testados para determinar sua concentração inibitória mínima  
34 (CIM). Após o trabalho de padronizar a obtenção dos extratos, foi possível obter 20  
35 extratos metanólicos brutos de cepas de leveduras, sendo 3 obtidas de bebidas  
36 fermentadas e 5 de frutos. Todos os 8 extratos foram testados frente as bactérias  
37 bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* (cepa de laboratório) e  
38 às leveduras *Candida albicans* ATCC 188041, *Candida parapsilosis* ATCC 220191.  
39 Nenhuma das espécies testadas apresentou atividade antimicrobiana. Contudo, neste  
40 trabalho foi possível padronizar a obtenção de extratos brutos metanólicos e testá-los  
41 para atividade frente a quatro espécies microbianas potencialmente patogênicas para  
42 humanos. Os demais extratos obtidos em outros trabalhos do grupo serão  
43 subsequentemente testados pela metodologia aqui padronizada.

44 **Palavras – chave:** Fermentação em estado sólido, técnica de difusão de disco,  
45 metabólitos secundários.

46 **Abstract**

47 Fungi are a source of biodiversity least exploited throughout the world. Brazil has much  
48 of this biodiversity, but little research as to their interactions with other living beings or  
49 exploited in the search for new drugs. Due to the emergence of drug-resistant  
50 microorganisms have antifungal currently existing fungi have gained greater importance  
51 in the search for new drugs, since some are seen as major producers of secondary  
52 metabolites potential pharmacological interest. The present study aimed to extract initial  
53 metabolites of yeasts isolated from fermented beverages consumed in the Middle  
54 Amazon Region and yeasts isolated from different species of fruits obtained in the same  
55 region and then test the extracts for antibacterial and antifungal activity by disc  
56 diffusion. Extracts with activity in preliminary testing would still be tested to determine  
57 their minimum inhibitory concentration (MIC). After working to standardize obtaining  
58 the extracts was achieved for 20 methanol extracts crude yeast strains, and 3 obtained  
59 from fermented beverages and fruit 5. 8 All extracts were tested against the bacteria  
60 *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* (laboratory strain) and the  
61 yeast *Candida albicans* ATCC 188041, *Candida parapsilosis* ATCC 220191. None of  
62 the species tested showed antimicrobial activity. However, this work has been possible  
63 to standardize obtaining methanol extracts and test them for activity against four  
64 microbial species potentially pathogenic for humans. The other extracts obtained in  
65 other work of the group will be subsequently tested by standardized methodology here.

66 **Key - words:** Solid state fermentation technique, disk diffusion, secondary metabolites.

67

68

69

## 70 **1- Introdução**

71 O Brasil abrange cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente  
72 envolvendo a Floresta Amazônica, onde está a maior fonte de matérias-primas para  
73 diversos setores. Apesar da grande diversidade biológica amazônica, o conhecimento  
74 sobre as espécies que as compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas,  
75 muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (Souza *et al.*  
76 2004).

77 Leveduras são organismos pertencentes ao reino Fungi com as seguintes  
78 características: presença de parede celular, núcleo organizado com membrana nuclear,  
79 aclorofilados, nutrição heterotrófica através de absorção de nutrientes, reprodução  
80 sexuada através de células especializadas denominadas esporos e ausência de  
81 motilidade. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo  
82 predominantemente unicelular e realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou  
83 fissão e não formarem corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998).

84 Um grande número de fungos é conhecido como produtores de metabólitos  
85 secundários, ativos sobre diversos organismos vivos provocando inibição do  
86 crescimento (Diener & Davis, 1969).

87 A prática do uso de produtos naturais no tratamento de doenças causadas por  
88 infecções bacterianas é utilizada globalmente há séculos, na maioria dos casos,  
89 embasadas apenas no conhecimento empírico. A pesquisa de novos antimicrobianos se  
90 faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos  
91 existentes (Penna *et al.*, 2001). A resistência microbiana tornou-se um sério problema  
92 de saúde pública (Salvador *et al.* 2003).

93 Atualmente, a pesquisa por novas classes de metabólitos com potencial  
94 antimicrobiano é a estratégia mais importante para o desenvolvimento de novas drogas

95 para este fim. Durante anos, infecções causadas por microrganismos antibiótico  
96 resistentes, incluindo estafilococos a meticilinas, enterococos resistentes à vancomicina,  
97 organismos gram-negativos resistentes a drogas de amplo espectro e outras que tem  
98 aumentado com frequência e agora apresentam problemas ao controle de doenças  
99 infecciosas (Norrby *et al.* 2005).

100 Algumas características são importantes para o processo de extração de  
101 metabólitos. A natureza lipofílica da maioria dos metabólitos fúngicos e outras  
102 características físico-químicas permitem a sua recuperação por extração em solventes  
103 orgânicos, tipicamente metanol ou acetona.

104 Embora a extração líquida seja ainda amplamente utilizada (Onofre *et al.* 1999;  
105 An, 2005; Tong & Latifah, 2011), mais recentemente, técnicas de extração em meio  
106 sólido têm sido propostas considerando propiciarem uma maior praticidade de execução  
107 (Vaz *et al.* 2009 ).

108 Fungos têm sido considerados fontes promissoras de componentes com  
109 diferentes atividades biológicas, por isso são objetivos importantes em trabalhos para a  
110 descoberta de novas classes de produtos naturais bioativos (Rosa *et al.* 2012).

111 Os dois métodos mais comumente utilizados para o *screening* de extratos com  
112 potencial antibacteriano são o de difusão em ágar e o de diluição em caldo, onde o  
113 método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou  
114 *template* (Chand *et al.* 1994; Cordeiro *et al.* 2006).

115 Considerando o exposto anteriormente, o presente trabalho teve por objetivo  
116 obter extratos e testar a capacidade de extratos de leveduras, isoladas de bebidas  
117 fermentadas e de frutos no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET/UFAM,  
118 manifestarem atividade antimicrobiana através dos testes de triagem frente à cepas de

119 bactérias e fungos potencialmente patogênicos, a fim de explorar o potencial  
120 antimicrobiano destes extratos.

121

## 122 **2-Materiais e Métodos**

### 123 2.1 Preparação da suspensão de leveduras isoladas

124 Utilizaram-se, para um teste piloto, as cepas de leveduras: ICET B-2311 e ICET  
125 B-2321, isoladas de frutos em outro projeto de iniciação científica. Foram preparadas  
126 suspensões ( $OD_{600nm} = 0,15$ ) destas cepas.

### 127 2.2 Obtenção de Extratos Brutos

#### 128 1° Ensaio

129 Realizou-se os ensaios a partir de modificações na metodologia descrita por Vaz  
130 et al. (2009). Para o teste, utilizou-se a placa de 24 poços, onde se adicionou 100mL de  
131 meio ágar micológico em cada poço, após a solidificação, adicionou-se 20 $\mu$ L da  
132 suspensão obtida na superfície de cada poço.

133 Após 48h, retirou-se de cada poço um plug de aproximadamente 5mm com o  
134 auxílio de um cano de alumínio com as medidas dos orifícios superiores e inferiores  
135 determinadas.

136 Os plugs foram transferidos para outra placa de 24 poços, aos poços  
137 correspondentes. A placa foi incubada em B.O.D. durante 7 dias. Após este período de  
138 incubação, adicionou-se 2mL de metanol em cada poço com o material seco e macerou-  
139 se. A placa foi então deixada em geladeira por um período de 24h. Após a maceração,  
140 filtrou-se o produto em papel filtro.

#### 141 2° Ensaio

142 Devido a não obtenção de volume suficiente para testes do produto final  
143 (extrato), para um segundo ensaio substituiu-se o ágar micológico pelo meio Sabouraud,

144 utilizou-se placas de Petri descartáveis e nelas o volume de 20mL do meio. Desta vez,  
145 utilizou-se uma placa de Petri de vidro maior onde foram colocadas as placas menores,  
146 desta forma proporcionando uma câmara de umidade com um algodão hidrofílico  
147 embebido em água. O material foi incubado durante 7 dias a 30°C. Após o tempo de  
148 incubação, retirou-se 7 plugs de cada placa e colocou-se em tubos cônicos de 15mL.  
149 Adicionou-se 2mL de metanol, macerou-se e armazenou-se os tubos em geladeira  
150 durante 24h e prosseguiu-se com a filtração. Ainda assim, o volume de extrato bruto  
151 obtido após a filtração não foi suficiente para a realização dos testes de atividade  
152 antimicrobiana.

### 153 3° Ensaio

154 Para o terceiro ensaio, por sugestão de M. Vieira e L. Rosa, utilizou-se uma  
155 placa de Petri grande com a finalidade de obter mais material a ser filtrado, esperando  
156 obter mais extrato metanólico e conseqüentemente mais extrato bruto. Utilizou-se  
157 novamente o meio Sabouraud para melhor crescimento de leveduras. Após a  
158 solidificação, inoculou-se com *swab* a suspensão da levedura ICET – 2311 e aguardou-  
159 se o tempo de 48h para o crescimento. Após esse período, retirou-se todo o meio da  
160 placa e transferiu-se o mesmo para tubos cônicos de 50 mL. Adicionou-se  
161 aproximadamente 35mL de metanol e armazenou-se em geladeira durante 24h. Após  
162 esse período na geladeira, prosseguiu-se com a filtração em papel filtro.

### 163 2.3 Ensaio antimicrobiano

164 Preparou-se uma suspensão de *E. coli* ATCC 25922  $OD_{600nm} \approx 0,15$  e esta  
165 suspensão foi inoculada com *swab* em meio ágar nutriente para a formação de um  
166 tapete. Utilizou-se discos de papel filtro com diâmetro de aproximadamente 6mm onde  
167 foi adicionado 100µL do extrato obtido na extração metanólica e diluído (dilúente: 1:1

168 Tween 80 2% + Dimetilsufóxido 50%). O disco foi colocado no centro de cada placa  
169 (triplicata).

170 Através da observação da necessidade de secar os extratos em menos tempo e  
171 considerando a falta de centrífuga a vácuo, outras técnicas foram testadas, como a  
172 secagem do extrato por evaporação em banho-maria e também em temperatura  
173 ambiente.

174 2.4 Preparação da suspensão de leveduras isoladas de frutos e bebidas para a  
175 obtenção de extratos brutos metanólicos

176 Utilizaram-se as leveduras isoladas no ICET em outros projetos do grupo. Foram  
177 processadas 20 cepas, das quais 8 foram testadas para atividade antimicrobiana até o  
178 momento. Essas leveduras foram ativadas em meio Sabouraud e posteriormente feita  
179 uma suspensão de turvação igual ao tubo 1 da escala de McFarland. Estas suspensões  
180 foram utilizadas no processo de extração e obtenção de extratos.

181 2.5 Preparação da suspensão para teste de atividade antimicrobiana

182 Os extratos foram testados contra cepas de leveduras: *Candida albicans* ATCC  
183 188041 e *Candida parapsilosis* ATCC 220191 e bactérias patogênicas: *Escherichia coli*  
184 ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* (cepa de laboratório). Com estes  
185 microrganismos foram preparadas suspensões ajustadas à escala de McFarland nº 1 para  
186 as leveduras ( $\approx 3 \times 10^8$  CFU/mL) e nº 0,5 para as bactérias ( $\approx 2 \times 10^8$  CFU/mL). Estas  
187 cepas foram incubadas a 37 °C por 24h para bactérias e a 30 °C por 48h para as  
188 leveduras. A escala de McFarland foi preparada de acordo com a adaptação de Chapin  
189 & Lauderdale (2003).

190

191

192



193           2.6 Obtenção de extratos brutos metanólicos

194           A obtenção de extratos e os ensaios antimicrobianos foram realizados de acordo  
195 com a metodologia descrita por (Rosa *et al.* 2012); com modificações e ajustes  
196 posteriores em face à comunicação pessoal de L. Rosa & M Vieira.

197           Após o preparo das suspensões descrita no item 2.1, foram ao todo 8 cepas  
198 testadas. Utilizou-se *swabs* estéreis para a inoculação em placas com ágar Sabouraud.  
199 Estas placas foram incubadas em B.O.D. a 30 °C no período de 10 dias para o processo  
200 de fermentação em estado sólido (Rosa *et al.* 2012). Após este tempo de incubação,  
201 todo o material contido nestas placas foi transferido para frascos cônicos de 50 mL e  
202 adicionados 30 mL de metanol. O material foi macerado com bastão de vidro estéril e  
203 mantido em geladeira durante 48 h para extração de metabólitos solúveis.

204           Após a retirada da geladeira, filtrou-se o material obtido em papel filtro e  
205 transferiu-se o extrato bruto metanólico para béqueres de 50 mL. Estes frascos béquer  
206 tiveram seu peso inicial determinado, a fim de obter o peso final do extrato seco. Os  
207 frascos foram identificados segundo as cepas em estudo, e estes de forma aberta, sem  
208 tampão ou lacre, foram colocados em um béquer de 2 L, que foi fechado com papel e  
209 esterilizado. Mantiveram-se os extratos em estufa à aproximadamente 37 °C durante um  
210 período de aproximadamente 4 dias. A esterilidade foi assegurada pelo  
211 acompanhamento da secagem e verificação da ausência de turvação.

212           2.7 Ensaio antimicrobiano

213           Após o período de aproximadamente 4 dias de secagem, obteve-se os extratos  
214 secos em estufa. O peso bruto dos extratos secos obtidos foi determinado a partir da  
215 subtração do peso do béquer vazio pelo béquer contendo os extratos secos.

216           Obteve-se a concentração de 100 µg/mL do extrato seco por diluição com  
217 água/metanol (9:1). Utilizou-se uma alíquota de 10µL do extrato diluído em cada disco

218 de aproximadamente 6 mm. Cada extrato foi testado em disco (triplicata) frente à 4  
219 cepas de bactérias e fungos potencialmente patogênicos.

220 Com auxílio de *swab* estéril, inoculou-se as suspensões padronizadas das cepas  
221 de leveduras e bactérias a fim de se obter um tapete de células para os testes de  
222 suscetibilidade. Adicionou-se os 10µL de cada extrato, no total 8 obtidos dos isolados  
223 de frutos: ICET 1631, ICET 1221, ICET 3232, ICET 7731, ICET 1523 e bebidas  
224 fermentadas: ICET 3221, ICET 4311, ICET 5422. Cada um destes extratos foram  
225 testados em triplicata contra as 4 cepas de bactérias e leveduras.

226

### 227 **3- Resultados**

#### 228 3.1 Extração de metabólitos secundários e obtenção de extratos brutos

229 No 1º ensaio, após a difusão do metanol em geladeira, prosseguiu-se com o  
230 processo de filtração. O líquido impregnou-se no papel filtro e não foi possível obter um  
231 produto para a secagem. No segundo ensaio, mesmo com a modificação na  
232 metodologia, após passar o material macerado que estava na geladeira pelo papel filtro,  
233 este novamente foi absorvido pelo papel e não proporcionou um volume de filtrado para  
234 testes.

235 Já no terceiro ensaio, transferiu-se o material em metanol contido no tubo cônico  
236 para o papel filtro obtendo um filtrado de  $\approx$  10mL de cor amarelada. Esse produto foi  
237 colocado um béquer em estufa a 37 °C para a evaporação do metanol durante 7 dias. O  
238 produto final foi o extrato seco de característica cerosa. Após a modificação e a  
239 iniciativa de colocar os béqueres menores em outro béquer maior e lacrado na parte  
240 superior, foi possível obter extratos secos livres de contaminação.

241 A ideia de transferir todo material contido em placa após a incubação para o  
242 processo de fermentação de aproximadamente 10 dias, trouxe resultados satisfatórios,

243 pois aumentou o produto final de extrato seco, atingindo um máximo de produto de 248  
244 mg de extrato seco da cepa ICET 3232.

245 Após diferentes tentativas de secagem dos extratos, na ausência de uma  
246 centrífuga à vácuo, optou-se pela secagem dos extratos metanólicos em estufa a 37°C.  
247 Tal procedimento proporcionou a secagem de extratos em mais ou menos 4 dias.

### 248 3.2 Ensaio antimicrobiano pelo teste de difusão em ágar

249 Após diferentes tentativas e a partir de modificações realizadas em técnicas  
250 descritas na literatura, uma última adaptação foi feita para o ensaio antimicrobiano. Os  
251 discos impregnados com o extrato diluído numa proporção de 1:1 Tween/DMSO  
252 (diluente) não apresentou halo de inibição. Os discos controles negativos, com apenas o  
253 diluente, também não apresentaram halo de inibição contra espécies de *E. coli*.

254 Contudo, os extratos testados, após o período de incubação das bactérias e  
255 leveduras, a princípio não apresentaram atividade antimicrobiana frente as espécies de  
256 bactérias e leveduras, uma vez que não foi possível observar qualquer halo de inibição  
257 ao redor do disco teste.

258

## 259 **4- Discussão**

260 Para a obtenção de resultados satisfatórios no processo de extração, fez-se  
261 necessário a mudança do meio de cultura, de meio YEPD para Sabouraud, bem como o  
262 aumento no volume de metanol utilizado. O meio de cultura é de suma importância,  
263 pois é ele que vai determinar a qualidade do isolado e o grau de crescimento das cepas.  
264 Para a produção de metabólitos por esses microrganismos é necessário que se  
265 proporcione nutrientes adequados, tanto para o seu crescimento, quanto para a produção  
266 de metabólitos secundários. Por se tratar de cepas isoladas de frutos, que ainda não  
267 foram identificadas e caracterizadas quanto as suas características enzimáticas, o meio

268 de cultura deve ser testado com diversos ensaios até que se chegue a um adequado que  
269 proporcione o crescimento satisfatório da espécie e também a produção de extrato  
270 (metabólitos) suficiente para os ensaios de atividade antimicrobiana (Vaz *et al.* 2012).

271 O aumento do volume de metanol teve a finalidade de aumentar o volume final  
272 de extrato obtido para se obter maior quantidade de extrato após a secagem. Tendo em  
273 vista que o metanol e a acetona são mais utilizados na extração de metabólitos fúngicos,  
274 com base nas características lipofílicas destes, o metanol não apresentou pontos  
275 negativos no processo de extração (Ausubel & Lewis, 2006).

276 Quando se utiliza o método de difusão, vários fatores podem influenciar no  
277 resultado final, tais como a composição do meio de cultura, preparação incorreta do  
278 meio, espessura do meio de cultura, densidade incorreta do inóculo, uso de *swab* com  
279 excesso de caldo para inoculação das placas, temperaturas e tempo de inoculação  
280 inadequados, interações entre o antimicrobiano ou agente teste com o meio de cultura,  
281 leitura prematura, erro na medida da zona de inibição ou uso de culturas mistas ou  
282 contaminadas (Silva, 1999).

283 Em testes preliminares, o extrato inicialmente obtido não mostrou-se ativo  
284 contra *E. coli*. Desta forma, não foi possível a determinação da concentração inibitória  
285 mínima.

286 Com os resultados dos últimos testes pode-se dizer que o processo de secagem  
287 em estufa é suficiente para a evaporação do metanol e obtenção do extrato seco  
288 necessário. Também o diluente à base de metanol e água mostrou-se eficiente na  
289 diluição do extrato, apesar de a parte maior ser de solvente polar (água).

290 Para um ensaio antimicrobiano posterior, modificações como a troca de diluente,  
291 do DMSO/TWEEN para água/metanol (9:1), determinaram a possibilidade de trabalhar  
292 com um diluente com componentes químicos mais baratos e de fácil acesso. Vale

293 ressaltar que os discos testes de controle negativo também mostraram que o diluente  
294 utilizado não apresentou qualquer atividade que pudesse influenciar no crescimento das  
295 espécies.

296 O meio de cultura e o tempo de incubação são de suma importância para a  
297 produção e extração de metabólitos secundários (Rios *et al.* 1988). Observou-se que,  
298 com o aumento do tempo de incubação no processo de fermentação, o produto final foi  
299 maior, produzindo maior quantidade de extrato seco. Subentende-se que o processo de  
300 fermentação sem auxílio enzimático catalítico se torna mais lento, portanto precisa de  
301 maior tempo para ação enzimática dos próprios microrganismos.

302 Nos testes de atividade antimicrobiana, os extratos testados não mostraram  
303 atividade sobre as espécies de *Candida* e bactérias. No entanto, a formação de tapetes de  
304 células não foi uniforme para todas as espécies nem mostraram consistência e aparência  
305 distintas entre as espécies de bactérias e leveduras. Isso pode ser devido ao meio de  
306 cultura utilizado ou condições proporcionadas para o crescimento, como temperatura.

307 Outro detalhe observado foi que os discos impregnados com o mesmo extrato  
308 apresentavam características diferentes. Alguns apresentavam intenso crescimento da  
309 espécie teste ao seu redor, enquanto outros apresentavam um crescimento menos intenso  
310 ou até mesmo nenhum crescimento comparando às outras placas, apesar de não  
311 apresentarem halo visível ao redor.

312 Para assegurar melhor resultado, faz-se necessário testes com concentrações  
313 diferentes dos extratos segundo a determinação máxima e mínima da NCCLS (1998).  
314 Isso poderia apresentar resultados diferentes, proporcionando na continuação a  
315 determinação da concentração inibitória mínima (MIC).

316

317

318 **5- Conclusão**

319 Após trabalhos de padronização da metodologia para obtenção de volumes  
320 satisfatórios de extratos brutos, conclui-se que é possível realizar a extração pela técnica  
321 de fermentação em estado sólido.

322 Mesmo com a ausência de alguns equipamentos necessários para este processo  
323 de extração e secagem, algumas modificações foram importantes, se mostraram mais  
324 viáveis e eficientes, como por exemplo, a troca de diluente e meio para crescimento do  
325 início ao final do trabalho.

326 Apesar de os resultados não demonstrarem até o momento qualquer atividade  
327 antibacteriana e antifúngica, algumas observações foram importantes para reflexão  
328 sobre a importância de certos fatores, como as características físico-químicas dos  
329 diluentes e o conhecimento deste no momento de determinar qual o melhor a ser  
330 utilizado na diluição ou extração de metabólitos secundários, ressaltando que essas  
331 determinações variam para diferentes espécies.

332 Portanto, os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana, apesar do êxito  
333 no processo de extração, armazenamento e obtenção dos extratos brutos. Com base  
334 nesses resultados, pretende-se continuar com os testes com novas cepas até o momento  
335 da apresentação final do presente projeto.

336

337 **6-Agradecimentos**

338 Agradecemos ao apoio financeiro da FAPEAM e às doações de cepas recebidas  
339 do grupo de pesquisa.

340

341

342

343 **7- Referências Bibliográficas**

344 An, Z., Handbook of Industrial Mycology. v. 22, p. 197, 2005

345 Chand, S.; Lusunzi, I.; Veal, D. A.; Willians, L. R.; Karuso, P.; *J. Antibiot.* 1994,  
346 47, 1295.

347 Cordeiro, C. H. G.; Sacramento, L. V. S.; Corrêa, M. A.; Pizzolitto, A. C.; Baub,  
348 T. M.; *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006, 42, 395.

349 Chapin, K. C. & Lauderdale T., Reagents, stains and media: bacteriology, p.  
350 358. In P. R. Murray, E. J. Baron. J. H. Jorgenen, M. A. Pfaller, and R. H. Yoken (ed.),  
351 Manual of microbiology, 8<sup>th</sup> ed. ASM. Washington. D. C. 2003.

352 Diener, L.U.; Davis, N.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Em:  
353 OLDBLATT, L. A. [Ed.] *Aflatoxin*. New York: Academic Press, 1969.

354 Kurtzman, C.P.; J.W. Fell. The yeasts, a taxonomic study. 4th Ed. Amsterdam:  
355 Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p. Ribeirão Preto. 34: 131 – 136, 29 de jan  
356 2004.

357 Lewis, K. & Ausubel, M. F. prospects for plant-derived antibacterials. Nature  
358 biotechnology. vol 24. nº 12, dezembro de 2006.

359 Norrby, S.R., Nord, C.E., Finch, R. Lack of development of new antimicrobial  
360 drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect. Dis.* 5(2): 115–119.  
361 PMID:15680781. 2005.

362 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS -  
363 NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of  
364 conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee  
365 for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 28 : 1998.

366 Onofre, S.P., Riveiros, R., Costa, S. O. P., Barros, N. M. Avaliação da atividade  
367 antimicrobiana de metabólitos produzidos pelo fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow)  
368 Samson. *Arq. Ciência. Saúde Unipar*, 3(1): 29-33, 1999.

369 Penna, C.; Marino, S.; Vivot, E.; Cruañes, M.C.; Muñoz, J.D.; Cruañes, J.;  
370 Ferraro, G.; Gutkind, G.; Martino, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in  
371 the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania*  
372 *brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.77, p.37-40, 2001.

373 Rios, J. L.; Recio, M. C.; Villar, A.; *J. Ethnopharmacol.* 23, 127. 1988.

374 Souza, A. Q.L., Souza, A. D. L., FILHO, S. A., Pinheiro, M.L.B., Sarquis,  
375 M.I.M., Pereira, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas  
376 tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *strychnos cogens* betham.  
377 Brasil. *Rev. Acta Amazônica* vol. 34(2): 185-195, 2004.

378 Salvador, J. M. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of  
379 callus culture and adult plants extracts from *Althernathera maritima* (Amaranthaceae).  
380 *Brazilian Journal of Microbiology* (2003) 34:131-136

381 Silva, C. H. P. M.; *Bacteriologia: Um Texto Ilustrado*, Ed. Eventos: Teresópolis,  
382 1999.

383 Tong, W. Y., Darah, I., Latiffah, Z., Antimicrobial activities of endophytic  
384 fungal isolates from medicinal herb *orthosiphon stamineus* Benth. *Journal of medicinal*  
385 *plants research* vol. 5(5), pp. 831-836, 4, 2011.



386 Vaz, A.B.M., Mota, R.C., Bomfim, M.R.Q., Vieira, M.L.A., Zazi, C.L., Rosa,  
387 C.A., Rosa, L.H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with  
388 Orchidaceae in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, 55: 1381–1391, 2009.

389 Vieira, M.L.A., Hughes, A. F. S., Gil, V. B., Vaz A. B. M., Alves, T. M. A,  
390 Zani, C. L., Rosa, C. A., Rosa, L. H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal  
391 endophyte community associated with the traditional brazilian medicinal plant *Solanum*  
392 *cernum Vell. (Solanaceae)*. *Can. J. Microbiol.*, 58: 54 – 66, 2012.

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

## 8-Figuras

412

413

414

415

416



417

Figura 1. Tentativa de secagem de extratos em banho-maria

418

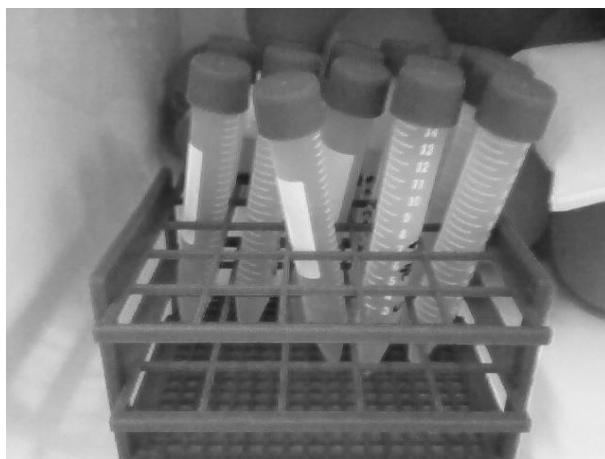
419

420

421

422

423



424

Figura 2. Extratos metanólicos armazenados em geladeira.

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434



Figura 3. Extratos secos em estufa a 37°C.

435

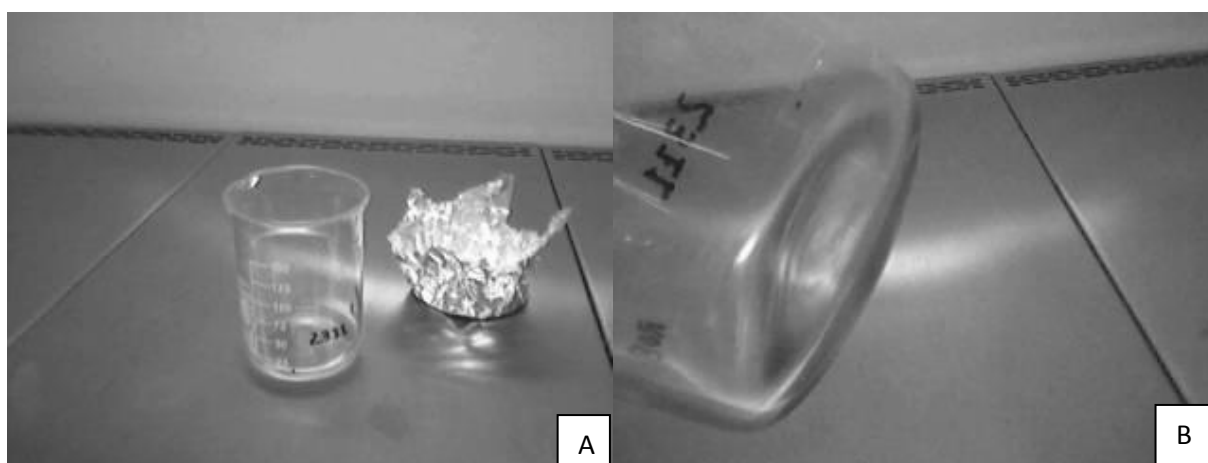
436

437

438

439

440



Figuras 4 e 5. Extratos metanólicos. (A) Extrato bruto metanólico e (B) extrato seco em estufa 37°C.

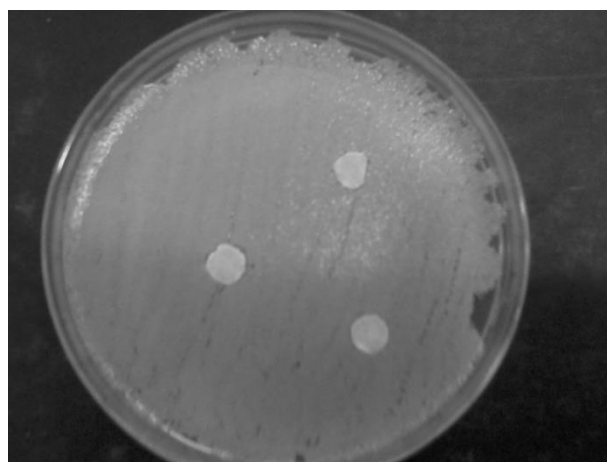
442

443

444

445

446



447

448

Figura 6. Exemplo de placa teste do extrato ICET 5422 frente à espécie *Staphylococcus aureus*, mostrando ausência de atividade inibitória do crescimento.

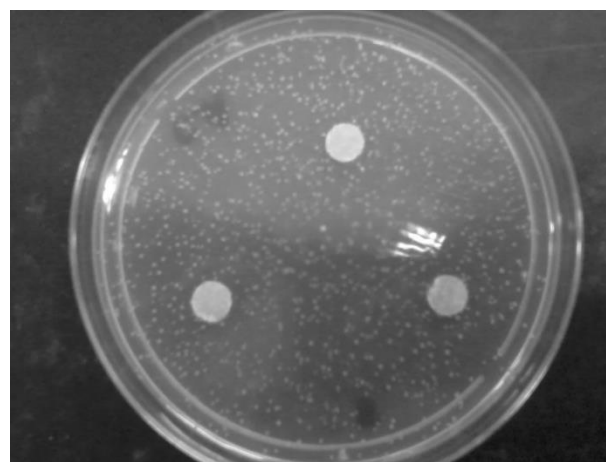


Figura 7. Placa teste com extrato ICET 5422 frente à *Candida albicans* (ATCC 188041), demonstrando ausência de atividade antifúngica. Porém, nota-se crescimento insatisfatório do fungo.

