

ISOLAMENTO DE LEVEDURAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS
DO SOLO NO MÉDIO AMAZONAS E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MICOCINOGÊNICA DE EXTRATOS.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET

Felippe Farias da SILVEIRA¹ (Felippe_farias@hotmail.com), Maxwell Adriano
ABEGG²(maxabegg@hotmail.com)

ITACOATIARA-AM

JULHO-2015

Isolamento de leveduras e fungos semelhantes a leveduras do solo no médio amazonas e avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e micocinogênica de extratos.

1. Resumo

As leveduras estão entre as fontes antimicrobianas atualmente mais exploradas, sendo que o Brasil possui uma biodiversidade rica, e pouco conhecida sobre metabólitos bioativos produzidos por microrganismos associados ao solo, estudos feitos em florestas brasileiras relataram alta incidência de atividade *killer* em leveduras isoladas, a proposta desse projeto é explorar essa capacidade, executando provas preliminares de identificação das leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados, por métodos fenotípicos convencionais, Testando tanto a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos brutos metanólicos dos isolados através de teste de triagem por difusão em ágar, dentre as leveduras isoladas, cepas com atividade micocinogênica (fenótipo killer). O objetivo foi prospectar leveduras e fungos semelhantes a leveduras a partir de amostras do solo da floresta amazônica, na região do médio amazonas e verificar a capacidade de extratos, destes isolados manifestarem atividade micocinogênica. Dos 113 isolados testados, vinte e dois isolados apresentaram atividade killer para *Candida albicans*. Não foram obtidos extratos com atividade antibiótica nos testes realizados.

2. Abstract

Yeasts are among the antimicrobial sources currently over exploited, while Brazil has a rich biodiversity, and little known on bioactive metabolites produced by microorganisms associated with soil studies in Brazilian forests reported high incidence of killer activity in yeasts, the proposal this project is to exploit this capability by performing preliminary tests for the identification of yeasts and fungi similar to isolated yeast by conventional phenotypic methods, testing both antibacterial and antifungal activity of methanolic crude extracts isolated by diffusion screening test agar as Prospect among isolated yeast strains with micocinogenic activity (killer phenotype). The ultimate goal was to prospect yeasts and fungi like yeast from soil samples of the Amazon rainforest in the middle Amazon region and check the ability of extracts, these isolates express micocinogenic activity. Among the 113 isolates tested, twenty two isolates showed killer activity for *Candida albicans*. Antibiotic activity was not observed among the isolates tested.

3. Introdução

Leveduras se diferenciam dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou

fissão e não formam corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998). Estes microrganismos são principalmente posicionados nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e entre os fungos mitospóricos (Deuteromycetes)(Hawksworth, 2001). São organismos pertencentes ao reino *Fungi*, possuem parede celular rígida, núcleo organizado, aclorofilados, heterotróficos com ausência de motilidade, entre outras.

Embora a maioria das leveduras sejam organismos saprotrófos, decompositores, que assimilam compostos derivados de animais ou plantas, algumas espécies são patógenos de animais ou plantas (Kurtzman & Fell, 1998; Tang et al., 2003; Abegg et al., 2006). Fungos semelhantes a leveduras são fungos dimórficos, cujo dimorfismo não está associado a fatores externos.

Segundo dados estimados até 2007, 120.000 espécies de fungos foram descritas (Webster & Weber, 2007), e ao redor de 100 gêneros e 1500 espécies de leveduras estão descritas (Kirk et al., 2001). Evidências correntes sugerem que essas espécies de leveduras representam menos de 1% das que ocorrem na natureza (Kurtzman & Fell, 1998; Lathar et al., 2010).

De acordo com Rosa & Péter (2006), ecossistemas de florestas são um sítio atrativo para o isolamento de leveduras, nesse contexto as florestas tropicais possuem maior diversidade de espécies, segundo o mesmo, se uma maior diversidade de plantas resulta em uma maior diversidade fúngica, então comunidades fúngicas nos trópicos são provavelmente mais altamente diversas que em regiões temperadas. Alguns estudos demonstraram que existe diferença nas comunidades fúngicas entre regiões tropicais e temperadas (Fröhlich & Hyde, 1999; Taylor & Hyde, 2003). Rossman (1997) afirma que alguns fungos são estritamente tropicais.

Atualmente, a busca por novas classes de metabólitos antimicrobianos representa uma das mais importantes estratégias para o desenvolvimento de novas drogas. Durante os últimos 10-15 anos, infecções causadas por microrganismos resistentes a antibióticos incluindo estafilococos meticilina-resistentes, enterococos vancomicina-resistentes, organismos Gram-negativos resistentes a múltiplas drogas e outros tem crescido constantemente e são um problema para o tratamento de doenças (Norrby et al., 2005; Maier & Abegg, 2007; Brötz-Oesterhelt & Sass, 2010).

Segundo Brötz-Oesterhelt & Sass (2010), atualmente, em função do relativo insucesso na síntese química de moléculas pequenas com atividade antibiótica, o interesse em produtos naturais novamente aumentou. Segundo estes autores, isto não surpreende, pois aproximadamente $\frac{3}{4}$ de todas as classes de antibióticos atualmente

utilizados originaram-se de produtos naturais. Cerca de 60% dos medicamentos encontrados no mercado, provêm de produtos naturais, destes, 40% são derivados de fontes microbianas.

A rápida evolução de resistência a drogas ultrapassou a descoberta de novos agentes antimicrobianos, causando uma necessidade urgente de novos antibióticos apresentando novos mecanismos de ação (Butler & Buss, 2006). Conforme comentado, o Brasil possui uma biodiversidade rica, e pouco é conhecido sobre metabólitos bioativos produzidos por microrganismos associados ao solo (Vaz et al., 2009).

Leveduras *killer* (micocinogênicas) secretam toxinas extracelulares letais a outras leveduras e também para outros microrganismos, como fungos filamentosos e certas espécies bacterianas. O fenômeno *killer* em leveduras foi relatado pela primeira vez por Makower e Bevan em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Buzzini & Martini, 2002). Estas toxinas são conjuntamente denominadas toxinas *killer* ou micocinas. Trata-se de proteínas ou glicoproteínas de baixa massa molecular que atuam através de um mecanismo específico que envolve a ligação em receptores da parede e membrana celular da célula sensível, sem necessidade de um contato direto célula-célula (Golubev & Nakasi, 1997). Com raras exceções, as cepas micocinogênicas são imunes para o efeito de sua própria toxina, mas podem ser suscetíveis a toxinas produzidas por outras cepas produtoras de toxinas (Schmitt & Breinig, 2002; 2006). A função e o papel destas toxinas em comunidades naturais de leveduras não são bem conhecidos, porém a maioria dos autores sugere que estas toxinas representam um importante papel na ecologia das leveduras, através da eliminação de linhagens sensíveis em substratos onde estas existem com leveduras *killer*, conforme relata Abranches et al. (1997).

A expressão da atividade *killer* é influenciada por várias variáveis, como pH do meio, temperatura de incubação ou tratamento, composição e propriedades físico-químicas do meio e concentração de células sensíveis. Entretanto, a mais importante condição é o pH do meio de cultura (Llorente et al., 1997; Criseo et al., 1999). Por causa de sua natureza protéica, as toxinas *killer* são inativadas em altas temperaturas e apresentam um decréscimo de atividade em função do tempo (Magliani et al., 2004; Golubev, 2006).

Nos últimos anos, inúmeras aplicações potenciais para o fenômeno *killer* têm sido descobertas. Dentre elas, a inibição do crescimento de fungos patogênicos para o homem (Séguy et al., 1998; Schmitt & Breining, 2002), a atividade contra fungos fitopatogênicos e deterioradores de madeira (Walker et al., 1995), indicando potencial

para biocontrole antimicótico. Além destas aplicações, existe a possibilidade de utilizar leveduras micocinogênicas para a biotipagem de microrganismos (Fuentefria, 2007).

4. Metodologia

4.1. Amostragem e isolamento de leveduras e fungos semelhantes a leveduras

Amostras de solo serão coletadas a 10 cm da superfície, com o auxílio de espátulas desinfetadas com álcool 70°GL em sacos plásticos limpos e estéreis (Forster, 1995). Dez gramas de cada amostra foram assepticamente pesadas e secas ao ar e então diluídas em série (1:250, 1:500 e 1:1000) em água destilada estéril pH 7,0. As diluições serão agitadas assim que cada diluição for preparada e reagitadas brevemente antes da remoção de cada inóculo. Inóculos de 0,1 mL serão semeados por espalhamento em superfície com alça de Drigalsky em placas de Petri (10 cm de diâmetro), contendo meio ágar Sabouraud-extrato de levedura e cloranfenicol (100 mg/L), em triplicata.

As placas serão incubadas a temperatura ambiente, sendo o crescimento das colônias acompanhado por até 7 dias (Di Menna, 1959). Para a purificação das amostras de leveduras ou fungos semelhantes a leveduras obtidos, serão preparadas suspensões em 2mL de água destilada estéril pH 7,0 contendo 50 mg de cloranfenicol/L. De cada-suspensão, 0,2 mL serão semeados por esgotamento na superfície do mesmo meio de cultura até a obtenção de colônias isoladas. O pH (potencial hidrogeniônico) das amostras de solo será obtido através de um pHmetro digital e a temperatura através de um termômetro de mercúrio.

Considerando que, segundo Forster (1995), uma representatividade absoluta ao triar amostras de solo para o isolamento de microrganismos não é possível de ser obtida, consideraremos outras observações descritas por este autor, para triar 100 amostras em um alqueire de área de floresta. Com relação à área de estudo, o alqueire a amostrar estará localizado em área da Floresta Amazônica, nos arredores do município de Itacoatiara – AM (latitude -03° 08'; longitude -58° 26').

4.2. Identificação fenotípica preliminar de leveduras e fungos semelhantes a leveduras

As cepas de leveduras serão caracterizadas preliminarmente em termos morfológicos seguindo métodos padronizados (Yarrow, 1998; Barnett et al., 2000).

Quanto à morfologia colonial, serão observadas as características coloniais como cor (branca, creme, amarelada, laranja, rosa, vermelha, marrom, preta), brilho (brilhante, opaca), forma (circular, oval ou fusiforme), margem (regular, irregular, lobada ou com raízes), superfície (lisa ou rugosa), elevação (plana, convexa, umbonada ou vulcão) e consistência (cremosa, mucóide, butirosa, membranosa, esfarelada, dura, seca).

Quanto à morfologia celular, serão feitas lâminas à fresco a partir do crescimento de culturas em ágar YEPG com no máximo uma semana de incubação a 25°C e a observação será realizada em microscópio óptico com aumento de 400 e 1000x. As características celulares observadas serão: forma e tamanho da célula, presença de pseudomicélio, tipo de reprodução assexuada (brotamento e/ou fissão) e, caso seja por brotamento, o tipo de brotamento (multipolar, bipolar, unipolar), presença de ascosporos e de balistosporos, segundo Barnett et al. (2000) e Kurtzman & Fell (1998).

4.3. Armazenamento das culturas fúngicas

As culturas serão preservadas em tubos de ensaio contendo ágar GYMP (2% glicose, 2% extrato de malte, 0,5% extrato de levedura, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2% ágar), cobertas por uma camada de vaselina estéril e mantidos em geladeira (4-8°C)(Landell, 2006).

4.4. Teste para detectar linhagens com fenótipo *killer*

A atividade micocinogênica (*killer*) será testada de acordo com Abranches et al. (1997) e Fuentefria (2007). As leveduras isoladas serão testadas contra fungos patogênicos das espécies *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. A atividade *killer* será testada em meio YM contendo 0,003% de azul de metileno, pH 4,2. A cepa patogênica será diluída em água destilada estéril e semeada sobre a superfície do meio com auxílio de um suabe. As leveduras isoladas serão inoculadas com alça de platina na superfície do meio contendo a cepa sensível previamente inoculada. As placas serão incubadas a 25°C, por sete dias. As cepas serão consideradas como possuidoras de atividade *killer* quando houver um halo de inibição do crescimento dos fungos patogênicos ao redor do crescimento das leveduras isoladas.

4.5. Extração de metabólitos secundários dos isolados

Para o cultivo dos isolados, utilizou-se placas de 140nm em meio sabouraud onde as cepas armazenadas a 30°C por 10 dias obteve-se material necessário para a obtenção de extratos, onde o conteúdo será macerado e incubado a 10°C por 24h para facilitar a difusão do metanol. O macerado fúngico será filtrado e as fases orgânicas serão completamente secas em uma temperatura de 37°C. Soluções estoque de extratos brutos a 10 mg/mL serão preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas a -20°C. Estas soluções serão diluídas em água e ensaiadas a uma concentração final de 100 mg/mL (com as concentrações de DMSO perfazendo abaixo de 1%) (Vaz et al., 2009).

4.6. Ensaio antimicrobiano

Os ensaios de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, serão executados utilizando os protocolos descritos por Rosa et al. (2003) e Vaz et al. (2009), utilizando um painel com cepas ATCC (American Type Culture Collection, EUA) dos seguintes microrganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. O inóculo dos microrganismos alvo será ajustado ao padrão 1 de McFarland em densidade óptica para leveduras, correspondendo a 3×10^8 UFC/mL, e ao padrão 0,5 em densidade óptica para bactérias, correspondendo a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. As respectivas concentrações serão confirmadas via leitura espectrofotométrica a 580 e 620 nm para leveduras e bactérias, respectivamente. As amostras de leveduras serão inoculadas usando swab em ágar Sabouraud e as bactérias serão semeadas em ágar infuso cérebro-coração (BHI) (peptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de carne 0,3%, ágar 2%).

As soluções dos extratos a 10 mg/mL em DMSO serão aplicadas (10µL) a discos de papel filtro (6mm de diâmetro) em placas de Petri contendo o microrganismo-alvo e incubado por 24-48 h a 37°C. Após a incubação, as zonas de inibição em torno dos pontos de aplicação serão mensuradas. Anfotericina B e cloranfenicol, ambos a 100 mg/mL, serão utilizados como controles-positivos para leveduras e bactérias, respectivamente. O solvente (DMSO) e extratos de meio de cultura serão usados como controles-negativos. Todos os experimentos serão executados em triplicata.

5. Resultados

Foram isoladas 113 colônias sugestivas de leveduras de amostras de solo de diferentes localizações: Rio Carú (S03°08.601',W058°25.872'), Mata Serpa (S03°04.626',W058°28.773'), próximo ao rio Urubu (S03°07.625',W058°28.770'), Solo adjacente de TPA de Itacoatiara (S03°07.304',W058°37.501) e TPA de Parintins (S02°292.5.41', W056°29.10.33).

Os isolados tiveram ainda suas características fenotípicas determinadas, por métodos padronizados.

Nos 133 isolados, a atividade micocinogênica (*killer*) foi testada em 110 culturas de leveduras isoladas de solos já descritos frente a duas espécies patogênicas - *Candida albicans* e *Candida krusei*. A atividade killer foi testada em meio extrato de levedura-peptona-dextrose e azul de metileno (YEPD-MB), pH 4,5. A cepa patogênica foi diluída em uma suspensão de 1×10^6 de células por mL e semeada sobre a superfície do meio com auxílio de um suabe. Das 110 culturas testadas tanto para *C. albicans* como para *C. krusei*, 22 isolados apresentaram atividade killer para *C. albicans* e nenhum isolado para *C. krusei*.

Considerando o considerável trabalho na obtenção dos extratos, para conclusão em tempo do projeto, 30 isolados de leveduras foram selecionadas em função de apresentarem características macroscópicas e microscópicas particulares, sugerindo a possibilidade de tratar-se de diferentes espécies, para a obtenção dos extratos brutos e teste de atividade antibiótica. Nenhum dos isolados testados apresentou atividade inibitória. Na sequência, foi realizado o procedimento de extração de metabólitos das leveduras isoladas, conforme descrito acima. 30 culturas foram escolhidas para o teste de obtenção de extratos.

6. Discussão

O principal objetivo deste estudo foi o de isolar e triar estirpes de leveduras de solos Amazônicos para atividade micocinogênica e antibiótica. As leveduras não foram identificadas em definitivo, como que por sequenciamento, sendo apenas realizada a identificação fenotípica preliminar de leveduras e fungos semelhantes a leveduras.

Os isolados testados não apresentaram extratos brutos com atividade antibiótica. Na literatura, trabalhos semelhantes buscaram atividade antibiótica a partir de extratos

de leveduras, porém igualmente com poucos resultados. Um exemplo com metodologia semelhante é o trabalho de Vieira et al. (2012), onde 225 fungos filamentosos e 21 leveduras endofíticas da planta *Solanum cernuum* foram testados, porém igualmente com reduzidos resultados no caso de leveduras.

As leveduras isoladas foram submetidas posteriormente a atividade micocinogênica, onde esta atividade tem grande importância porque pode ser aplicada no controle de fungos fitopatogênicos de importância econômica. O número de estirpes (22) com atividade micocinogênica, chama a atenção no sentido de explorar leveduras para a obtenção de metabólitos fungicidas. Na literatura, são observados trabalhos em linha semelhante e com resultados similares, como por exemplo, o de Brizzio & van Brook (1998), onde 123 isolados de leveduras de fontes diversas no parque nacional Nahuel Huapi, Argentina, com um percentual de atividade *killer* de aproximadamente 28%.

A presença de prováveis novos biótipos encontradas neste projeto, mostra a importância deste ecossistema tropical na busca de leveduras com possíveis aplicações biotecnológicas. Possivelmente os isolados obtidos contenham novas espécies de leveduras não descritas previamente.

7. Conclusão

Através do trabalho, foi possível padronizar os roteiros práticos de obtenção de extratos brutos de cultivo de leveduras e do teste de triagem de fenótipo *killer* em leveduras. Ainda, 22 isolados de solo obtidos manifestaram atividade *killer* frente a espécies patogênicas de *Candida*, o que estimula a continuidade dos trabalhos com estas cepas isoladas.

8. Agradecimentos

Agradeço ao professor Maxwell Adriano Abegg pelo apoio e incentivo e a FAPEAM pela bolsa de iniciação científica.

9. Referências

Abegg, M.A., Cella, F.L., Faganello, J., Valente, P., Schrank, A., Vainstein, M.H. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden, *Mycopathologia*, 161: 83-91, 2006.

Abranches, J., Morais, P.B., Rosa, C.A., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N. The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 328-336, 1997.

Brizzio, S. & van Brook, M. Characteristics of wild yeast killer from Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina). *Food Techn. Biotechn.*, 36(4): 273-278, 1998.

Brötz-Oesterhelt, H. & Sass, P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol.*, 5: 1553–1579, 2010.

Butler, M.S. & Buss, A.D. Natural products – the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem. Pharmacol.*, 71: 919-929, 2006.

Buzzini, P. & Martini, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1020-1025, 2002.

Criseo, G., Gallo, M., Pernice, A. Killer activity at different pHs against *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A by environmental yeast isolates. *Mycoses*, 42: 601-608, 1999.

Fröhlich, J. & Hyde, K.D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic. *Biodiversity and Conservation*, 8: 977-1004, 1999.

Fuentefria, A.M. Bioprospecção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 144p.

Golubev, W. & Nakase, T. Myconinogeny in the genus *Bullera*: taxonomic specificity of sensitivity to the mycocin produced by *Bullera sinensis*. FEMS Microbiology Letters, 146: 59-64, 1997.

Golubev, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (Rosa, C.A. & Peter, G. eds.), pp 197-219, Springer, 2006.

Hawksworth, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, 105: 1422-1432, 2001.

James, S.A., Barriga, E.J.C., Bond, C.J., Cross, K., Núñez, N.C., Portero, P.B., Roberts, I.N. *Candida carvajalis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from the Ecuadorian amazon jungle. FEMS Yeast Research, 9: 784-788, 2009.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A., eds. Dictionary of the fungi, 9th edn. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2001.

Kurtzman, C.P. & Fell, J.W., Eds. The yeasts, a taxonomic study. 4th Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. 1088 p.

Lathar, P.K., Sharma, A., Thakur, I. Isolation and random amplified polymorphic DNA analysis of wild yeast species from 17 different fruits. Journal of Yeast and Fungal Research, 1: 146-151, 2010.

Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M., Spencer-Martins, I. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1165-1167, 1997.

Maier, C.R., ABEGG, M. A. Avaliação da utilização de antibióticos por profissionais de saúde e pela população na cidade de Toledo, Paraná, Brasil. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 11:19-26, 2007.

Norrby, S.R., Nord, C.E., Finch, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis.*, 5:115-9, 2005

Rosa, C., Péter, G., Eds. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. 577p.

Rossman, A.Y. Biodiversity of tropical microfungi: an overview. In: Hyde KD (ed) *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong University Press, Hong Kong, 1997, pp 1–10.

Schmitt, M.J. & Breinig, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Letters*, 26: 257-276, 2002.

Schmitt, M.J. & Breinig, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Letters*, 26: 257-276, 2002.

Schmitt, M.J. & Breinig, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 212-221, 2006.

Séguy, N. et al. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*: perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22: 145-149, 1998.

Singh, B.K. & MacDonald, C. A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. *Drug Discov. Today*, 15: 792-799, 2010.

Tang, A.M.C., Hyde, K.D., Corlett, R.T. Diversity of fungi on wild fruits in Hong Kong. *Fungal Diversity*, 14: 165-185, 2003.

Taylor, J. & Hyde, K.D. *Microfungi of Tropical and Temperate Palms*. *Fungal Diversity Research Series*, 12: 1-459, 2003.

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

Vieira, M.L.A., Hughes, A.F.S., Gil, V.B. et al. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Can. J. of Microbiol.*, 58: 54-66, 2012.

Walker, et al. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127: 213-222, 1995.

Webster, J. & Weber, R.W.S. *Introduction to fungi*. Third edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK, 2007. 875 p.

10. Tabelas e Figuras



Figura 1: Cepas selecionadas para o obtenção de extratos.



Figura 2: Placa de petri de 140mm utilizada para obter o maior número de material para obtenção do extrato bruto.

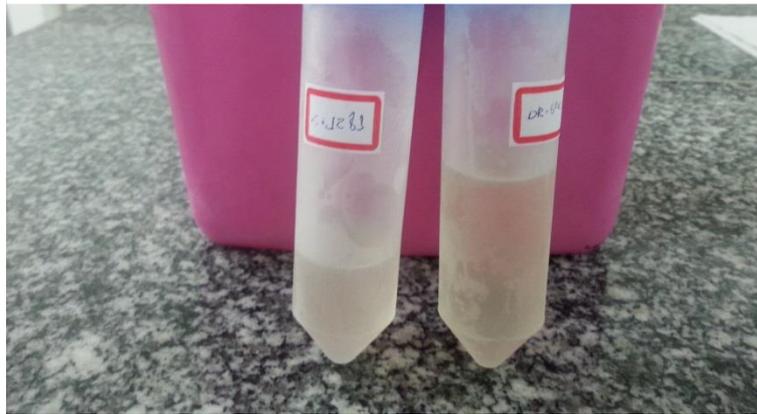


Figura 3: Extratos brutos



Figura 4: Extratos brutos.

Tabela 1: Extratos obtidos de cepas selecionadas, peso bruto e o valor em miligramas do extrato formado.

Cepa	Peso Inicial (g)	Extrato Seco (g)	Extrato (mg)
-------------	-------------------------	-------------------------	---------------------

S1123	32.340	32.784	394.3
S3311	33.428	33.504	76
DR5461	33.001	33.132	131
S1332	33.320	34.452	132
S5471	34.917	43.905	12
S1211	35.543	35.592	49.4
S1121	34.143	34.181	38.2
S1224	34.225	34.650	425
DR5491	52.546	52.570	24
DR5411	33.956	34.075	119
DR5401	33.124	34.050	926
S4213	48.907	49.400	493
S4211	32.948	33.672	724
S4112	31.206	31.251	45
DR3611	47.687	47.740	54
S1281	32.291	32.440	149
DR2541	33.387	33.415	28.1
S3121	31.524	31.560	37
DR2551	34.679	34.712	32.8
S3211	32.588	32.641	52.7
S1312	33.427	33.484	57.2
S1225	31.973	31.775	198
S1271	50.081	49.708	373
S3232	51.894	51.647	247
S1225	48.730	49.001	271
S5471	33.892	34.101	209
S3432	33.163	33.354	191
DR2561	31.463	31.628	165
S1241	33.083	33.366	283
S2111	47.041	47.393	222