

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

JOICE FRAGOSO OLIVEIRA DE ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA E CICATRIZANTE *IN VITRO* DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS: *Mimosa Tenuiflora*
(WILLD.) Poir., *Poincianella Pyramidalis* Tul. e *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.

MACEIÓ
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

JOICE FRAGOSO OLIVEIRA DE ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA E CICATRIZANTE *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS: *Mimosa Tenuiflora* (WILLD.) Poir., *Poincianella Pyramidalis* Tul. e *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Thaís Honório Lins Bernardo

Área de concentração: Enfermagem no cuidado em saúde e na promoção da vida.

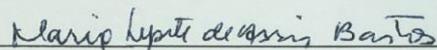
Linha de pesquisa: Enfermagem, ciência, tecnologia e inovação para o cuidado.

MACEIÓ
2018

JOICE FRAGOSO OLIVEIRA DE ARAÚJO

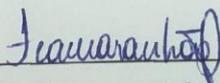
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOTÓXICA E CICATRIZANTE *IN VITRO* DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS: *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Poincianella pyramidalis* Tul. e *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 19 de abril de 2018.

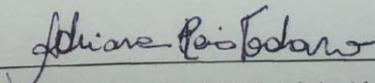


Prof.^a Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos, Universidade Federal de Alagoas (Orientadora)

Banca Examinadora:



(Prof.^a Dr.^a Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão, Universidade Federal de Alagoas)
(Examinador externo)



(Prof.^a Dr.^a Adriana Reis Todaro, Universidade Federal de Alagoas) (Examinador interno)

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

A663a Araújo, Joice Fragoso Oliveira de.
Atividade antimicrobiana, citotóxica e cicatrizante *in vitro* de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais : *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Poincianella pyramidalis* Tul. e *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd ex Mart. / Joice Fragoso Oliveira de Araújo. – 2018.
79 f. : il.

Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.

Orientadora: Thais Honório Lins Bernardo.

Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 64-78.

Anexo: f. 79.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Atividade cicatrizante. 3. *Penicillium*. 4. *Rhizoctonia*.
I. Título.

CDU: 616-083:615.28

AGRADECIMENTOS

Ao Bom Deus, Senhor e Rei da minha vida, pelas graças derramadas e por Sua condução sempre amorosa e Seu infinito amor. Um Amor que constrange, cura, liberta e transforma. Tudo aquilo que tenho e sou, eu devo a Ti!

Aos meus pais, Josilene e João, que dedicaram suas vidas inteiramente para que eu e minha irmã pudéssemos sonhar e escolher. Com eles nós aprendemos, sobretudo, quão valioso é o mergulho nos estudos. Foi, primeiramente, o esforço e o sacrifício de vocês que me fez chegar até aqui. Minha gratidão será eterna, amo vocês!

Ao meu amado esposo Daniel, com quem experimento todos os dias, com a graça de Deus, a feliz experiência que é sermos dois, sendo um só. Obrigada por ser o melhor companheiro, esposo e amigo que Deus poderia me dar. Você é a Vida da minha vida.

À minha irmã Juliane, que me apoia incondicionalmente e me faz desejar nunca parar de estudar, sob hipótese alguma. Aquela que como uma segunda pele, um calo, uma casca, uma cápsula protetora sempre foi para mim uma referência. Em mim tem muito de você!

À Prof.^a Dr.^a Thaís Honório Lins Bernardo, educadora íntegra e ética, por me ensinar a pensar e sempre questionar o porquê daquilo que me proponho a fazer. Sem você não haveria início (quando ainda na graduação você me acolheu como colaboradora no LpTF), com você este todo foi possível. Obrigada pelo carinho e amizade.

À Prof.^a Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos, por todos estes anos de aprendizado e parceria. Sua contribuição à minha formação acadêmica é indiscutível. Obrigada pela confiança!

À Prof.^a Dr.^a Regina Célia Sales Santos Veríssimo, por quem tenho grande carinho e admiração, enquanto pessoa e profissional.

À Prof.^a Dr.^a Adriana Reis Todaro, por dividir seu conhecimento e experiência, de modo a tornar possível a construção do presente estudo. Obrigada pela contribuição!

À Prof.^a Dr.^a Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão pelo excepcional auxílio no isolamento e identificação dos fungos.

À minha querida amiga Letícia Lopes, com quem dividi desde a graduação os desafios, e sobretudo, o amor pela pesquisa. Hoje, junto à nossa amiga Thais Costa, dividimos o amor pela

pesquisa, pelos livros e pelas séries, assim como as aflições próprias deste tempo. Estamos juntas!

Às minhas amigas Rute Maia, Stephanie Jesus e Clarice Pereira que com suas vidas me apontam o Céu, e me fazem perceber que a distância nada é quando um Elo maior nos une. Obrigada pelas orações e amizade de vocês!

À professora Dr^a. Ingrid Martins Leite, coordenadora da pós-graduação, pelo apoio, colaboração e disponibilidade.

À Monique Godoi, secretária da pós-graduação, pelo suporte e presteza ao longo desses dois anos.

Aos membros do Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) ESENFAR/UFAL, componentes essenciais para a ampliação da pesquisa básica na área de Enfermagem, que colaboraram para que esta pesquisa fosse concluída com êxito.

Aos laboratórios parceiros pela contribuição para realização dos testes, Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LAFi/ICBS/UFAL), Laboratório de Microbiologia Clínica (LMC/ICBS/UFAL) e Laboratório de Biologia Celular (LBC/IQB/UFAL).

A todos os membros da “Turma Dasein” que conseguiram tornar até os momentos mais atípicos desta experiência, o mais leve possível. Que alegria foi fazer parte dessa turma maravilhosa!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos curadores e funcionários do Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas, na pessoa da curadora Rosângela Lyra, pela identificação botânica.

Jamais seria honesto dizer “a minha pesquisa”. Ela é de todos nós! Muito obrigada!

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa”.

(Santa Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Os micro-organismos endofíticos habitam o interior de tecidos vegetais e vivem em mutualismo com a planta hospedeira, e representam uma fonte rica e pouco estudada de novos compostos naturais biologicamente ativos. O presente estudo objetivou avaliar as atividades antibacteriana, citotóxica e cicatrizante *in vitro* de extratos de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *Acrocomia aculeata*, *Poincianella pyramidalis* e *Mimosa tenuiflora*. Tratou-se de pesquisa básica do tipo experimental *in vitro* com abordagem quantitativa. Inicialmente, os isolados fúngicos foram avaliados em cultura e microscopia, e os extratos foram obtidos a partir de três fungos endofíticos: *Penicillium* sp. (isolado de *Poincianella pyramidalis*), *Rhizoctonia* sp. (isolado de *Mimosa tenuiflora*) e um fungo isolado de *Acrocomia aculeata* que não foi identificado. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima dos extratos contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas por meio do Método da Microdiluição em Caldo, além da atividade citotóxica pelo método colorimétrico Metiltetrazolium (MTT) com macrófagos J774 e fibroblastos 3T3 e a atividade cicatrizante *in vitro* por meio do *Scratch Assay*. No ensaio antibacteriano, os extratos de *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia* sp. não demonstraram atividade frente às bactérias testadas, enquanto o extrato do fungo isolado de *A. aculeata* apresentou atividade antibacteriana contra *S. epidermidis* e *S. aureus*. Quanto à atividade citotóxica, os extratos testados foram atóxicos em todas as concentrações em macrófagos J774, mas em fibroblastos 3T3 os extratos de *Penicillium* sp. e do fungo não identificado isolado de *A. aculeata* foram tóxicos nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, o de *Rhizoctonia* sp. não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Quanto à atividade cicatrizante *in vitro*, os extratos apresentaram atividade cicatrizante positiva com taxa de migração semelhante ao controle. Concluiu-se que as plantas medicinais *A. aculeata*, *P. pyramidalis* e *M. tenuiflora*, abrigam fungos endofíticos com diferentes potenciais farmacológicos, são eles: *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. e um fungo não identificado isolado de *A. aculeata*, que necessita da aplicação de técnicas moleculares para sua identificação, e este último possui atividade contra *S. epidermidis* e *S. aureus*, bem como atividade cicatrizante *in vitro*. Os dados obtidos encorajam a realização de novos estudos a fim determinar as substâncias que contribuem para as atividades evidenciadas no presente estudo, visando uma possível aplicação terapêutica.

Descritores: Atividade antimicrobiana. Atividade cicatrizante. *Penicillium*. *Rhizoctonia*.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms inhabit the interior of plant tissues and live in mutuality with the host plant, and represent a rich and little studied source of new biologically active natural compounds. The present study aimed to evaluate the *in vitro* antibacterial, cytotoxic and healing activities of endophytic fungi isolated from the plant species *Acrocomia aculeata*, *Poincianella pyramidalis* and *Mimosa tenuiflora*. It was a basic *in vitro* experimental research with a quantitative approach. Initially, the fungi isolates were evaluated in culture and microscopy, and the extracts were obtained from three endophytic fungi *Penicillium* sp. (isolated from *Poincianella pyramidalis*), *Rhizoctonia* sp. (*Mimosa tenuiflora* isolate) and a fungi isolated from *Acrocomia aculeata* that was not identified. Minimal Inhibitory Concentration of extracts against Gram positive and Gram negative bacteria was determined by the Broth Microdilution Method, in addition to cytotoxic activity by Methyltetrazolium (MTT) colorimetric method with J774 macrophages and 3T3 fibroblasts and *in vitro* healing activity of Scratch Assay. In the antibacterial assay, extracts of *Penicillium* sp. and *Rhizoctonia* sp. showed no activity against the bacteria tested, while the extract of the fungus isolated from *A. aculeata* presented antibacterial activity against *S. epidermidis* and *S. aureus*. Regarding cytotoxic activity, the extracts tested were nontoxic at all concentrations in front of J774 macrophages, but in 3T3 fibroblasts *Penicillium* sp. and unidentified fungus isolated from *A. aculeata* were toxic at concentrations of 100 and 50 µg/mL, *Rhizoctonia* sp. showed no toxicity at any of the concentrations tested. As for *in vitro* healing activity, the extracts presented positive healing activity with a migration rate similar to the control. It was concluded that medicinal plants *A. aculeata*, *P. pyramidalis* and *M. tenuiflora*, harbor endophytic fungi with different pharmacological potentials, are *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. and an unidentified fungus isolated from *A. aculeata*, which requires the application of molecular techniques for its identification, and the latter has activity against *S. epidermidis* and *S. aureus*, as well as *in vitro* healing activity. The data obtained encourage further studies to determine the substances that contribute to evidenced activities in the present study, aiming at a possible therapeutic application.

Keywords: Antimicrobial activity. Healing activity. *Penicillium*. *Rhizoctonia*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas do processo de cicatrização de lesões cutâneas.	21
Figura 2 - Espécie vegetal <i>Mimosa tenuiflora</i>	27
Figura 3 - Espécie vegetal <i>Poincianella pyramidalis</i>	28
Figura 4 - Espécie vegetal <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. Ex mart.	29
Figura 5 - Micro-organismos endofíticos isolados de plantas como fontes de moléculas bioativas.....	33
Figura 6 - Cultivo dos fungos endofíticos em erlenmeyers com meio líquido Batata Dextrose.	37
Figura 7 - Partição líquido-líquido do caldo de cultivo fermentado com acetato de etila.....	37
Figura 8 - Microcultivo de <i>Poincianella pyramidalis</i> Tui, de acordo com a técnica de Ridell.	38
Figura 9 - Microplaca (contendo 96 poços) para técnica da Microdiluição em Caldo	39
Figura 10 - Esquema geral do ensaio de viabilidade celular do metiltetrazolium (MTT)	41
Figura 11 - Esquema do ensaio in vitro de cicatrização Scratch Assay.	43
Figura 12 - Fungos endofíticos isolados de a) <i>Mimosa tenuiflora</i> , b) <i>Acrocomia aculeata</i> e c) <i>Poincianella pyramidalis</i>	44
Figura 13 - Fungo endofítico isolado de <i>Poincianella pyramidalis</i>	45
Figura 14 - Microscopia óptica do fungo endofítico <i>Penicillium</i> sp. (160 x) corado com azul de lactofenol algodão, isolado de <i>Poincianella pyramidalis</i> em comparação com literatura especializada.....	45
Figura 15 - Fungo endofítico isolado de <i>Acrocomia aculeata</i>	46
Figura 16 - Microscopia óptica do fungo endofítico (160 x) corado com azul de lactofenol algodão isolado de <i>Acrocomia aculeata</i>	46
Figura 17 - Fungo endofítico isolado de <i>Mimosa tenuiflora</i>	47
Figura 18 - Microscopia óptica do fungo endofítico <i>Rhizoctonia</i> sp. (100 x) clarificado com hidróxido de potássio (KOH), isolado de <i>Mimosa tenuiflora</i>	47
Figura 19 - Viabilidade celular do extrato em acetato de etila do fungo <i>Rhizoctonia</i> sp. isolado de <i>Mimosa tenuiflora</i> frente aos macrófagos J774.....	49
Figura 20 - Viabilidade celular do extrato etanólico de <i>Mimosa tenuiflora</i> frente aos macrófagos J774.....	49
Figura 21 - Viabilidade celular do extrato em acetato de etila do fungo isolado de <i>Acrocomia aculeata</i> frente aos macrófagos J774.	50

Figura 22 - Viabilidade celular do extrato etanólico de <i>Acrocomia aculeata</i> frente aos macrófagos J774.....	51
Figura 23 - Viabilidade celular do extrato em acetato de etila de <i>Penicillium</i> sp. isolado de <i>Poincianella pyramidalis</i> frente aos macrófagos J774.....	51
Figura 24 - Viabilidade celular do extrato etanólico de <i>Poincianella pyramidalis</i> frente aos macrófagos J774.....	52
Figura 25 - Efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de <i>Penicillium</i> sp. isolado de <i>Poincianella pyramidalis</i>	52
Figura 26 - Efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de <i>Rhizoctonia</i> sp. isolado de <i>Mimosa tenuiflora</i>	53
Figura 27 - Efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado do fungo endofítico isolado de <i>Acrocomia aculeata</i>	54
Figura 28 - Fotomicrografias representativas das células feridas às 0 e 24 h após o arranhão.	55
Figura 29 - Análise da taxa de migração celular dos fibroblastos 3T3.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Processo normal de cicatrização de feridas.....	22
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos oriundos dos fungos isolados	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Batata Dextrose Ágar
°C	Graus Celsius
CLSI	Clinical and Laboratorial Standars Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
CE	Controle de esterilidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
IMA	Instituto do Meio Ambiente
KOH	Hidróxido de potássio
MAC	Medicina Alternativa e Complementar
mL	Mililitros
MTT	Metiltetrazolium
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PBS	Tampão Fosfato Salino
PMN	Polimorfonucleares
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SFB	Soro Fetal Bovino
SST	Solução Salina Tamponada
SF	Solução Fisiológica
TTC	Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium
UFC	Unidade Formadora de Colônia
nm	Nanômetro
v/v	volume por volume
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1. Feridas e processo de cicatrização	20
3.2. Inserção da enfermagem no cuidado à pessoa com ferida	23
3.3. A utilização de plantas como recurso medicinal.....	24
3.4. <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	25
3.5. <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz	27
3.6. <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. Ex mart.	28
3.7. Micro-organismos endofíticos	30
3.8. Relação entre plantas medicinais e fungos endofíticos.....	31
3.9. Relevância biotecnológica de fungos endofíticos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Tipo de estudo.....	35
4.2. Locais de realização do estudo	35
4.3. Delineamento do estudo.....	35
4.3.1. Coleta do material vegetal.....	35
4.3.2. Isolamento dos fungos.....	35
4.3.3. Obtenção dos extratos	36
4.3.3.1 Preparação dos extratos etanólicos das plantas	36
4.3.3.2 Preparação dos extratos dos fungos isolados das plantas.....	36
4.3.4. Identificação dos Fungos Endofíticos	38
4.4. Ensaio de Microdiluição em caldo.....	38
4.4.1. Linhagens bacterianas utilizadas	38

4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Microdiluição em caldo ..	38
4.5. Ensaio colorimétrico do Metiltetrazolium	40
4.5.1. Linhagem celular	40
4.5.2. Determinação da viabilidade celular	40
4.6. Ensaio cicatrizante <i>in vitro</i> utilizando Scratch Assay	42
4.6.1. Linhagem celular	42
4.6.2 Ensaio de Viabilidade Celular com MTT	42
4.6.3. Determinação da migração celular pelo <i>Scratch Wound Assay</i>	42
5. RESULTADOS	44
5.1. Fungos endofíticos isolados	44
5.2. Identificação macroscópica e microscópica dos fungos endofíticos	44
5.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	48
5.5. Citotoxicidade pelo Método Colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)	48
5.6 Ensaio de migração celular	52
5.6.1. Viabilidade celular com fibroblastos 3T3	52
5.6.2 Ensaio cicatrizante <i>in vitro</i> (Scratch Assay)	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO I	79

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de feridas crônicas, especialmente as infectadas, geralmente envolve estadias hospitalares prolongadas e acompanhamento ambulatorial de longo prazo, assim como intervenções terapêuticas avançadas e dispendiosas (SEN et al., 2009; BRATZLER, 2006). Do mesmo modo, o desenvolvimento de resistência por bactérias e fungos patogênicos às drogas comerciais é um problema relevante enfrentado pelos serviços de saúde (COSTELLOE et al., 2010). Nesse contexto, há uma intensa busca por novos fármacos eficazes, e isso tem sido possível, principalmente, graças aos avanços tecnológicos e desenvolvimento de novos métodos de prospecção de compostos bioativos que conduzirão à descoberta de novas formulações (LAM, 2007).

Durante séculos, o homem tem buscado a superação dos seus males por meio das plantas medicinais, e utilizando seus instintos, conseguiam distinguir as plantas comestíveis daquelas que podiam curar, cicatrizar ou aliviar a dor (BEZERRA, 2014). O Brasil é rico em biodiversidade e possui uma das floras mais abundantes do planeta, apresentando de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil, 32.830 espécies de Angiospermas, 56 % delas endêmicas (FORZZA et al., 2014).

Dentre sua vasta flora, existe a caatinga, bioma unicamente brasileiro que pode ser caracterizado como florestas arbóreas ou arbustivas, compreendendo principalmente árvores e arbustos baixos muitos dos quais apresentam espinhos, microfilia e algumas características xerofíticas. Dentre as espécies lenhosas mais típicas da vegetação das Caatingas estão a *Poincianella pyramidalis* Tul. (“catingueira”, Fabaceae-Caesalpinioideae) e várias espécies de *Mimosa* (“calumbies” e “juremas”, Fabaceae-Mimosoideae) (LEAL, et al. 2003), como a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

Outra planta que tem ganho destaque é a *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., popularmente conhecida como “bocaiúva” ou “macaúba”, e amplamente distribuída na região centro-oeste do Brasil (LORENZI, 2006). Macaúba pode ser usada como alimento (LORENZI, 2006; RAMOS et al., 2008), na produção de cosméticos (SILVA, 2012), e seu uso para prevenção de doenças recentemente aumentou (SILVA, 2012). Entretanto, trabalhos envolvendo a microbiota endofítica existente nestas plantas ainda são incipientes ou inexistentes.

O aproveitamento de recursos naturais na saúde é uma tendência que tem ganho considerável importância, seja por suas vantagens em termos de economia e eficiência, assim

como pela menor apresentação de efeitos colaterais quando comparados à fármacos sintéticos (CRUZ, 2013). No entanto, apesar do uso generalizado destes compostos de plantas na cultura popular, novos estudos devem ser realizados para determinar sua segurança e eficácia (REYES-GARCÍA, 2010).

Muitas plantas medicinais habitualmente abrigam endófitos que apresentam metabólitos secundários e atividades medicinais semelhantes às de sua planta hospedeira (STROBEL e DAISY, 2003). Acredita-se que todas as espécies de plantas, incluindo plantas não vasculares, samambaias, coníferas e angiospermas, vivem em relação simbiótica com fungos endofíticos (RODRIGUEZ et al., 2009). Os micro-organismos endofíticos têm se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos, especialmente os fungos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia (PAMPHILE et al., 2014). Quando comparados com outras fontes naturais como plantas e animais, os micro-organismos são fontes que podem ser facilmente renovadas e reproduzidas. Em torno de 130 fármacos utilizados comumente são de origem microbiana e tantos outros estão em fase de desenvolvimento clínico (TEJESVI et al., 2007).

Estudos anteriores no sentido de explorar a diversidade botânica para buscar novos fármacos levou à descoberta de isolados microbianos capazes de sintetizar compostos bioativos inicialmente considerados exclusivamente vegetais. Nos últimos 25 anos, há a evidência de que todas as plantas são habitadas por ao menos uma comunidade microbiana, além da contínua constatação de que estes micro-organismos são capazes de produzir os metabólitos secundários iguais aos de sua planta hospedeira. Neste sentido, despertou-se o interesse para a investigação de micro-organismos endofíticos com potencial aplicação em áreas como a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentícia e química (NICOLETTI; FIORENTINO, 2015).

A busca por novos produtos para a indústria farmacêutica é um processo contínuo e a exploração de substratos naturais constitui a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novas moléculas de importância industrial e biotecnológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades cicatrizante, antibacteriana e citotóxica *in vitro* de fungos endofíticos isolados das plantas medicinais *Acrocomia aculeata*, *Poincianella pyramidalis* e *Mimosa tenuiflora*.

2.2. Objetivos específicos

- Coletar o material vegetal das folhas das plantas medicinais estudadas;
- Isolar fungos endofíticos das folhas das plantas medicinais coletadas;
- Obter extratos dos filtrados das culturas dos fungos endofíticos isolados em solvente orgânico;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos;
- Avaliar os extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos quanto à atividade citotóxica;
- Verificar a atividade cicatrizante dos extratos obtidos a partir dos fungos endofíticos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Feridas e processo de cicatrização

A pele e os anexos formam o sistema tegumentar, que é o sistema responsável pela interação entre o corpo e o meio ambiente estando sujeito às adversidades ambientais, como a agressão por agentes físico, químico ou biológico que promovem sua ruptura e caracterizam a ferida (CARNEIRO, 2010). Ferida é compreendida do ponto de vista biológico como uma agressão sofrida na pele, uma imperfeição na qual há a quebra de sua integridade, de modo que camadas superficiais ou mais profundas podem ser afetadas (CARVALHO, 2012).

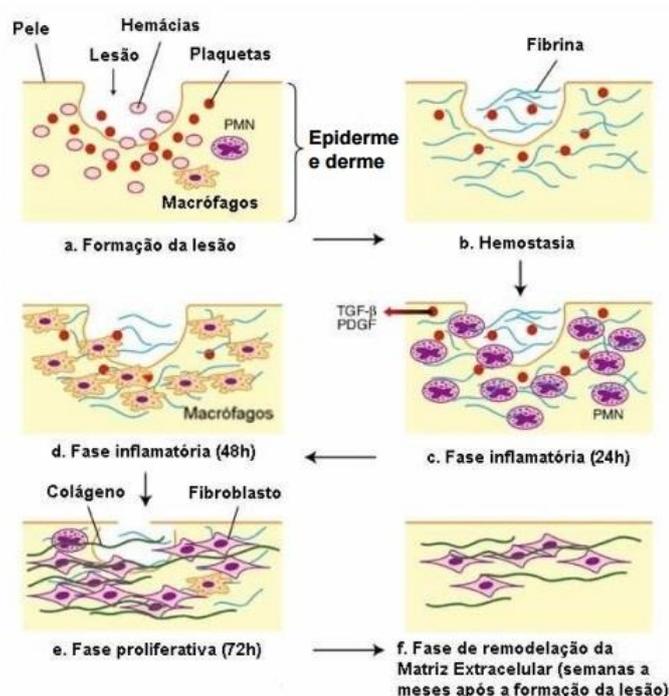
As feridas cutâneas podem ser classificadas em função da sua profundidade. Nas úlceras rasas, ou lesões de espessura parcial, a agressão acomete parcialmente a derme; nas úlceras profundas ou lesões de espessura total, toda a derme está envolvida. Quando a agressão se restringe à epiderme, ocorre reparação completa da pele a estado estrutural e funcional semelhante ao de pré-injúria (PALERMO et al., 2012).

Nas lesões de espessura parcial, os anexos da pele ainda viáveis funcionam como fonte de queratinócitos que migram a partir dessas estruturas, além das bordas, para formar nova epiderme. Nas feridas de espessura total, os anexos cutâneos são destruídos, e a única fonte de queratinócito são as bordas da lesão, e, além disso, a reparação não irá regenerar os anexos, mas, sim, substituí-los por tecido cicatricial (PALERMO et al., 2012).

O processo cicatricial surge a partir dessa injúria com o objetivo principal de restaurar/cicatrizo o rompimento da continuidade da pele, sendo este um processo dinâmico e complexo, no qual a sua resposta está diretamente ligada às condições gerais do indivíduo (CARVALHO, 2012). O processo de cicatrização de feridas compreende quatro fases altamente integradas e sobrepostas, são elas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tissular (GOSAIN; DIPIETRO, 2004). Estas fases e suas funções biológicas e fisiológicas devem ocorrer na sequência correta, em um momento específico, e contínuo com uma intensidade ideal para uma duração específica, a depender de cada indivíduo (MATHIEU, 2006).

A finalidade do processo de cicatrização consiste em promover a reepitelização e a reconstituição do tecido (MANDELBAUM et al., 2003), sendo um processo complexo e dinâmico que envolve um grande número de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, tipos celulares e complexas interações (PALERMO et al., 2012). A figura 1 ilustra o processo de cicatrização e suas fases.

Figura 1 - Etapas do processo de cicatrização de lesões cutâneas.



Fonte: Elaborado por OLIVEIRA (2008) adaptado de BEANES et al., 2003.

A fase de hemostasia depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, tendo início após o surgimento da ferida. Após o surgimento do dano tecidual, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes estimulam compostos vasoativos a promoverem uma vasoconstrição imediata, visando diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular (KUMAR et al., 2005).

A fase inflamatória da cicatrização está intimamente ligada à fase de hemostasia, com a inflamação de inúmeros mediadores químicos e das células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM et al., 2003). Essa fase é caracterizada pela resposta vascular e celular, e a magnitude dessa resposta é determinada pela severidade da lesão. A boa irrigação do tecido e a perfusão sanguínea estão diretamente relacionadas com o início da fase inflamatória e sua intensidade (THEORET, 2005).

A fase proliferativa é responsável pela restauração da pele após a lesão, sendo didaticamente dividida em três subfases: fibroplasia, angiogênese e reepitelização (MALDEBAUM et al., 2003). Na reepitelização, faz-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens naquelas de espessura total (CHRISTOPHER, 1972). A fibroplasia

representa um processo de proliferação de fibroblastos, produção de um novo colágeno e outras proteínas da matriz celular, que contribuem para a formação do tecido de granulação (LI et al., 2007). A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MALDEBAUM et al., 2003).

Uma vez restabelecidos o fluxo sanguíneo e a oxigenação, o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido e os vasos neoformados começam a diminuir (NETO, 2003). A partir deste evento, inicia-se a fase de contração das paredes marginais da lesão, uma ação realizada pelos fibroblastos ativados, os quais se diferenciam em miofibroblastos (PAGANELA et al., 2009). O miofibroblasto é uma célula que está presente no tecido de granulação e confere capacidade contrátil, reduzindo a área de sangramento e facilitando a epitelização (SARANDY, 2007).

Na fase de remodelação, a ferida torna-se menos vascularizada e as fibras de colágeno são reorganizadas de forma linear às margens da ferida. Há uma constante e coordenada degradação e síntese de colágeno, em que o tecido cicatricial é remodelado e se torna semelhante ao tecido normal após um longo período de tempo (DEALEY, 2006). Ocorre a substituição do tipo de colágeno, do tipo III para tipo I, bem como alteração em sua organização de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para fibras entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de stress (GONZALEZ et al., 2016). Tais fases e suas funções biológicas e fisiológicas acontecem sequencialmente, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1- Processo normal de cicatrização de feridas.

Fases	Eventos celulares, biológicos e fisiológicos
Hemostasia	1. Constrição vascular 2. Agregação plaquetária, degranulação e formação de fibrina (trombo)
Inflamação	1. Infiltração de neutrófilos 2. Infiltração de monócitos e diferenciação em macrófagos 3. Infiltração de linfócitos
Proliferação	1. Reepitelização 2. Angiogênese 3. Síntese de colágeno 4. Formação da matriz extracelular
Remodelação	1. Remodelação de colágeno 2. Regressão e maturação vascular

Fonte: Elaborado por GUO; DIPIETRO (2010) baseado em MATHIEU et al., 2006.

No entanto, a cicatrização de feridas pode ser retardada por diversos fatores, tradicionalmente divididos em fatores sistêmicos e locais (PALERMO et al., 2012). Os fatores locais influenciam diretamente as características da própria ferida, enquanto os fatores sistêmicos estão relacionados à saúde ou à doença do estado geral do indivíduo que afetam a sua capacidade de cura (GUO; DIPIETRO, 2010). A infecção pode ser considerada um desses fatores que atua no retardamento da cicatrização da ferida.

A pele intacta é a melhor defesa para a invasão bacteriana, mas danos na pele permitem a entrada de bactérias, fungos e leveduras. Mais de 200 espécies diferentes de bactérias vivem normalmente na pele (BENBOW, 2010), porém quando esses micro-organismos tem acesso aos tecidos lesionados podem originar a infecção. Todavia, para que isso aconteça, além da presença desses organismos, existem outros fatores que irão influenciar, como resposta imune do hospedeiro, o número de espécies diferentes presentes na ferida, a virulência das bactérias ou fungos e as interações sinérgicas entre as diferentes espécies (WYSOCKI, 2002). O processo de infecção prolonga a fase inflamatória, retarda a epitelização e diminui a deposição de colágeno (PALERMO et al., 2012).

Quando feridas, especialmente as crônicas, são pobremente perfundidas eles estão mais suscetíveis à infecção, visto que o sangue transporta e fornece oxigênio, nutrientes e células do sistema imunológico, proporcionando assim pouca oportunidade para micro-organismos colonizar e proliferar (BOWLER, 2001). Tecido desvitalizado, combinado com fluido e nutrientes do exsudato da ferida proporcionam um ambiente ideal para proliferação bacteriana (CUTTING, 2010).

As estirpes bacterianas que frequentemente causam infecção em feridas são as Gram positivas *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. e as Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e da família Enterobacteriaceae como exemplo, *Escherichia coli* (ROMLING; BALSALOBRE, 2012).

3.2. Inserção da enfermagem no cuidado à pessoa com ferida

A assistência às pessoas com lesões de pele exige uma abordagem holística, planejamento de estratégias e de intervenções que possibilitem alcançar os objetivos propostos (SILVA, 2007). O enfermeiro, como profissional que mantém contato prolongado com paciente portador ou com risco de desenvolver ferida, exerce papel de grande relevância na assistência do mesmo. É responsabilidade do enfermeiro avaliar e acompanhar a evolução da lesão, planejar e coordenar os cuidados, além de supervisionar e executar os curativos. Seu destaque

nesta área se deve, em parte, a abordagem exaustiva desses cuidados nos componentes curriculares durante sua formação acadêmica (COSTA et al., 2012).

Atualmente, estudos experimentais à base de plantas medicinais e outros elementos que atuam no processo de cicatrização e no controle de infecção estão sendo desenvolvidos reafirmando o importante papel da enfermagem no desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de feridas (OLIVEIRA, 2010). Ademais, o profissional de saúde deve considerar tal recurso de origem popular na sua prática de cuidar, viabilizando um cuidado singular que valoriza as crenças, valores e o estilo de vida das pessoas a que prestam seus cuidados (ISERHARD, 2009).

Uma das muitas contribuições da enfermagem na interseção entre a pesquisa básica com a área assistencial é por meio da sua integração em pesquisas com plantas medicinais na descoberta de novos fitoterápicos, uma vez que a enfermagem é a principal facilitadora do cuidado, e aqui em especial, no que diz respeito ao de feridas (ALVES et al., 2004).

Mesmo hoje, baseado em uma atividade profissional multidisciplinar, o tratamento de feridas acrescentou para a enfermagem um vasto meio para demonstrar o saber, além de poder de decisão nas condutas. É válido destacar que a criteriosa escolha do produto selecionado e sua adequada utilização são imprescindíveis para que o tratamento obtenha êxito (FERREIRA et al., 2003).

3.3. A utilização de plantas como recurso medicinal

As plantas são utilizadas como recurso medicinal, e este fato tem aumentado por influência de diversos fatores, como o alto custo dos medicamentos industrializados, o conhecimento e a tendência da população ao uso de produtos de origem natural, bem como o difícil acesso da população à assistência médica. Acredita-se, que a utilização de plantas medicinais pode ser favorável à saúde humana, de modo que o indivíduo tenha conhecimento prévio de sua finalidade, além dos riscos e benefícios (ISERHARD, 2009).

O poder curativo das plantas é tão antigo que se equipara ao aparecimento da espécie humana atual na terra, pois acredita-se que desde os primórdios, as primeiras civilizações notaram a presença de princípios ativos nas essências de determinadas plantas, os quais revelaram empiricamente possuir ação eficaz no combate a determinadas doenças (BADKE, 2011). As diferentes culturas influenciam na utilização das plantas apontando para a manutenção da saúde e o tratamento de doenças, o que salienta por sua vez, as suas potencialidades terapêuticas aplicadas ao longo das gerações.

Os produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diversas doenças, seja de forma tradicional ou pela utilização de espécies vegetais como fonte de moléculas ativas (CARVALHO; SILVEIRA, 2010). No entanto, o uso popular, e mesmo tradicional, não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Dessa forma, é importante realizar estudos experimentais para que seja avaliada sua segurança e comprovada ou não sua eficácia.

O Brasil é um país que oferece uma variedade terapêutica bastante promissora para a população, por possuir um terço da flora mundial, além de ser a Amazônia a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. Esta intensa presença vegetal no país faz com que as pesquisas e o próprio desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos possam ocorrer como destaque no cenário científico mundial (YUNES et al., 2001; FRANÇA et al., 2008).

A Caatinga é um dos biomas brasileiros mais ricos em termos de biodiversidade, abrigando várias espécies de plantas nativas ou cultivadas. Muitas espécies de plantas desta região são utilizadas na medicina popular ou como ervas comerciais para tratar diferentes condições (BIASI-GARBIN, 2016). Ocupando cerca de 850 mil Km², a caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e o mais fragilizado (GUILIETTI et al., 2002), e o uso insustentável de seus solos e recursos naturais ao longo de centenas de anos de ocupação, associado à imagem de local pobre e seco, fazem com que a Caatinga esteja bastante degradada. Entretanto, pesquisas recentes vêm revelando a riqueza particular do bioma em termos de biodiversidade e fenômenos característicos, o que o considera um ecossistema único por sua heterogeneidade, apresentando um número expressivo de táxons raros e endêmicos (NEUTZLING et al., 2012; GIULIETTI et al., 2002).

3.4. *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.

A família Fabaceae (Leguminosae) é a terceira maior família de angiospermas, com 727 gêneros e cerca de 20.000 espécies, e é encontrada em todos os continentes, exceto na Antártida, o que demonstra uma ampla distribuição geográfica, com variação de pequenas ervas transitórias e anuais até árvores de grande porte (QUEIROZ, 2009; QUEIROZ et al., 2009). No Brasil, essa é considerada uma das famílias de maior diversidade nos biomas do país. Está amplamente representada, com cerca de 3200 espécies distribuídas em 176 gêneros (QUEIROZ et al., 2009), e muitas dessas espécies são características de locais abertos e degradados, sendo, portanto, bem adaptadas a condições precárias (ILDS, 2011).

A Fabaceae está constituída por três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae/Faboideae), sendo a Papilionoideae a maior destas, com cerca de dois terços de todos os gêneros e espécies e encontrada preferencialmente em regiões temperadas, com a maior parte das espécies herbáceas. Caesalpinioideae e Mimosoideae compõem-se, em sua maioria, por árvores e arbustos tropicais ou subtropicais (ILDS, 2011).

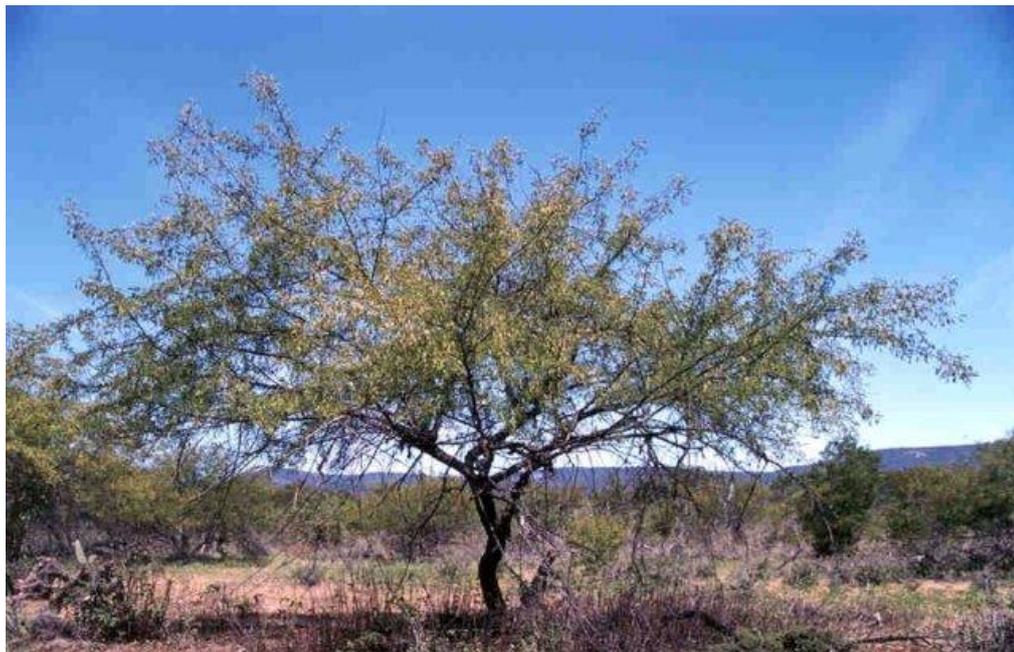
A subfamília Mimosoideae apresenta cerca de 3.270 espécies agrupadas em 82 gêneros, distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais com diversos gêneros ocorrendo também em regiões temperadas (LEWIS et al. 2005). As plantas desta família são principalmente arbustos que apresentam suas folhas verdes praticamente o ano inteiro e seus frutos são geralmente legumes (NIELSEN, 1992).

O gênero *Mimosa* foi estabelecido por Linnaeus (1753) com 53 espécies, entretanto, foram realizados tratamentos taxonômicos mais abrangentes por Bentham (1841, 1875, 1876), Burkart (1948) e Barneby (1985). Em 1991, Barneby realizou a revisão mais completa do gênero, incluindo 479 espécies do Novo Mundo. Em estudo realizado por Dourado et al. (2013) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, foram descritas cerca de 130 espécies novas e estabelecidos 200 táxons infraespecíficos. A prospecção fitoquímica de *Mimosa tenuiflora* atraiu um interesse considerável, principalmente devido à presença de alcalóides e taninos (proantocianidinas) (RIVERA-ARCE et al., 2007).

A *M. tenuiflora*, conhecida popularmente como jurema-preta, pertence à família Fabaceae e subfamília Mimosoidae. É uma planta característica da caatinga e apresenta grande potencial de produção de forragem constituindo-se como uma importante fonte de alimentação animal nesta região, na maioria das vezes (CALDAS PINTO, 2006). É também utilizada como madeira e carvão, bem como na medicina caseira em tratamentos de queimaduras, acne e problemas de pele (MAIA, 2004).

Estudo realizado por Bezerra (2009) demonstrou a eficácia do extrato de *M. tenuiflora* sobre cepas de *S. aureus* em diferentes concentrações, de modo que foram observados halos de inibição entre 6 e 25 mm. Da casca da *M. tenuiflora* foram isolados vários compostos com atividade biológica que vêm sendo estudados e publicados nos últimos anos (MECKES-LOZOYA, 1991a; JIANG et al., 1991; JIANG, et al., 1992; VEPSÄLÄINEN et al., 2005; PEREIRA et al., 2015), dando cada vez mais destaque à espécie nos avanços do conhecimento químico-farmacológico. A abundância de taninos e flavonóides detectados no extrato acetato de etila de *M. tenuiflora* são os prováveis responsáveis pela atividade antimicrobiana da planta (MECKES-LOZOYA et al., 1990b).

Figura 2 - Espécie vegetal *Mimosa tenuiflora*.



Fonte: APNE/CNIP.

3.5. *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz

Espécies vegetais da família Fabaceae são comumente utilizadas no tratamento de doenças devido às propriedades curativas e terapêuticas, e muitas delas são usadas tanto na farmacologia quanto na medicina popular, e dentre as mais utilizadas está a *Poincianella pyramidalis* (catingueira) (GOMES et al., 2008). Loiola et al. (2010) destacam o uso de Fabaceae como recurso medicinal em várias comunidades rurais da caatinga nordestina, mencionando a utilização dessas plantas em rituais religiosos além de enfatizarem a influência desse grupo de plantas na cultura sertaneja.

Poincianella pyramidalis (sín. *Caesalpinia pyramidalis* Tul.) é uma árvore (Figura 3) pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), que é endêmica do Nordeste do Brasil, especialmente no bioma Caatinga (OLIVEIRA, 2013). *P. pyramidalis* é frequente e bastante resistente à seca e cresce com poucas espécies associadas (LEAL, et al. 2003).

Espécies nativas brasileiras como *Caesalpinia* spp. apresentam diversas atividades biológicas, em especial, atividade antimicrobiana (SAAED; SABIR, 2001). *C. pyramidalis* Tui., sendo endêmica da região Nordeste e uma das espécies predominantes na caatinga. Popularmente conhecida como "Catingueira" ou "pau-de-rato", suas folhas são comprovadamente empregadas na medicina tradicional há décadas como diurético, para tratar infecções digestivas e como antipirético. (GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA, 1979).

Figura 3 - Espécie vegetal *Poincianella pyramidalis*.



Fonte: Reis et al., 2016

As folhas são utilizadas na preparação de infusões e decocções pela população como diuréticos e antidionépticos, bem como para o tratamento da febre (ALBUQUERQUE, 2007; CARTAXO, 2010). Além disso, o extrato aquoso das folhas de *P. pyramidalis* demonstrou resultados promissores quando testado para tratar nematódeos gastrointestinais em cabras (BORGES-DOS-SANTOS, 2012). Estudos farmacológicos demonstraram que as partes aéreas da planta possuem propriedades anti-inflamatórias (SANTANA, 2012), antifúngicas (CRUZ, 2007) e antimicrobianas (SARAIVA, 2012).

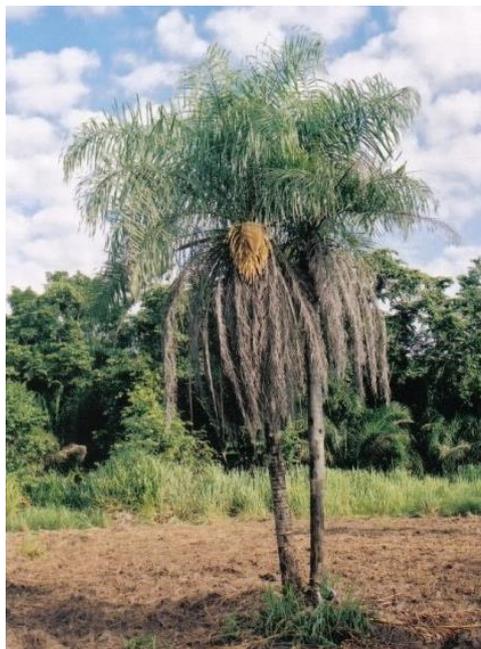
3.6. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex mart.

A família Arecaceae inclui várias plantas tropicais importantes, especialmente palmeiras, e muitos autores consideram esta família como a mais importante na vida das pessoas que vivem na floresta, como fonte de subsistência (PASSOS; MENDONÇA, 2006). A palavra palma é de origem remota, e os povos itálicos aplicavam-na à tamareira (*Phoenix dactilifera* L.) da África Mediterrânea e do Oriente Médio, enquanto que os gregos chamavam-na fóinix, palavra de origem fenícia (LORENZI et al., 1996).

A espécie vegetal *A. aculeata* possui diversos nomes populares dependendo da região, podendo ser chamada de macaúba, macaúva, bocaiuva, coco-de-espinho, macaíba, coco de

catarro, bacaiúva, macacaúba, marajuba, macaibeira, mucajá e mucajuba (LORENZI, 1992). Esta espécie é distribuída nas Américas tropicais e subtropicais, com centro de origem no Brasil (LANES et al., 2015).

Figura 4 - Espécie vegetal *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex mart.



Fonte: Lorenzi, 2006.

No Brasil a *A. aculeata* é uma planta que não tem muito reconhecimento e importância comercial, deste modo, a exploração da macaúba atualmente é realizada de forma extrativista, aproveitando os povoamentos nativos dessa planta, e para a exploração industrial, faz-se necessário a substituição da atividade extrativista por cultivos racionais e sustentáveis (MOTOYKE et al. 2011).

A polpa de *A. aculeata* pode ser usada como alimento (LORENZI, 2006; RAMOS et al., 2008), na produção de cosméticos e seu uso para prevenção de doenças recentemente aumentou (SILVA, 2012). Esta planta medicinal tem sido tradicionalmente usada para tratar doenças respiratórias e apresenta propriedades laxantes, analgésicas e restauradoras (LORENZI, 2006). Além disso, estudo demonstrou que a mesma pode reduzir a glicemia plasmática e os níveis totais de colesterol (SILVA, 2012).

Embora essa palmeira tenha grande potencial produtivo e sua utilização econômica de forma extrativista seja uma atividade consolidada, não é explorada racionalmente devido a pouca informação sobre seu cultivo (MOTOYKE et al., 2013).

3.7. Micro-organismos endofíticos

A mais ampla e atual definição de endófitos diz que são todos os micro-organismos cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar mal ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas, excluindo desta maneira bactérias nodulantes e fungos micorrízicos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2006; MARTINEZ-KLIMOVA, 2017).

O termo endófito tornou-se um sinônimo de mutualista (MANI et al., 2015), e os endofíticos entram nos tecidos das plantas por meio de feridas ou raízes, ou, alternativamente, criando feridas através da secreção de enzimas como celulases ou por ranhuras causadas pelo atrito com o solo durante o crescimento (ZHANG et al., 2006).

O endofitismo é, portanto, uma combinação única de benefício e custo-benefício definida por "localização" (não "função") que é transitoriamente assintomática, discreta e estabelecida inteiramente dentro dos tecidos vivos da planta hospedeira (KUSARI; SPITELLER, 2011). A relação simbiótica entre planta e endofítico é benéfica para ambas as partes: para o endófito devido à disponibilidade dos nutrientes da planta (WILSON, 1995), e ainda os endofíticos melhoram a resistência da planta hospedeira à adversidade por secreção de metabólitos bioativos (TAN, 2001).

Os endofíticos mais encontrados são fungos filamentosos (GUNATILAKA, 2006), que desenvolveram mecanismos para competir com outro micro-organismos no meio intracelular da planta, e os mesmos têm sido estudados por sua capacidade de produzir compostos antibacterianos, antivirais, anticancerígenos, antioxidantes, antidiabéticos e imunossupressores (MARTINEZ-KLIMOVA et al. 2017).

A seleção das plantas e a minuciosidade das técnicas de esterilização utilizadas são de extrema importância, e a planta que parece saudável sugere que o isolado é um endofítico, e não um patógeno. Do mesmo modo, a completa higienização da superfície das amostras de tecidos se faz necessária para garantir que o isolado é oriundo das estruturas internas da planta e não é um contaminante do meio ambiente (MARTINEZ-KLIMOVA et al. 2017). Sabe-se atualmente que diversas espécies vegetais que foram previamente estudadas hospedam pelo menos um micro-organismo endofítico (KUSARI, 2012a; JOUDA, 2015; UZMA, 2016).

Embora os primeiros fungos endofíticos tenham sido isolados da semente de *Lolium temuleatum* há mais de 100 anos, o estudo dos fungos endofíticos foi impulsionado em 1993 com o trabalho pioneiro de Stierle et al. (1993), que descobriram o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* produtor de taxol isolado da planta *Taxus brevifolia*. Esta descoberta forneceu não só um novo método alternativo para explorar compostos terapeuticamente úteis da natureza,

mas também uma maneira de proteger recursos vegetais limitados em todo o mundo (WANG et al., 2011). O fungo *Seimatoantlerium tapuiense* isolado de *Maguireothammus speciosus* (Rubiaceae) também produz paclitaxel (STROBEL, 2003), essa habilidade pode reduzir a coleta de plantas raras, de crescimento reduzido e ameaçadas de extinção, preservando-se assim, a biodiversidade (GONÇALVES et al., 2013).

Com sua biodiversidade, diversidade química e metabólitos com atividade biológica única, os fungos endofíticos são um recurso promissor para novas descobertas nas ciências e têm o potencial de fornecer agentes terapêuticos para muitas doenças (WANG et al., 2011). Uma vantagem potencial da pesquisa de micro-organismos endofíticos, conforme sugerido por Verma et al. (2009), é que novos estilos de vida microbianas podem aumentar a probabilidade de encontrar novos compostos bioativos.

3.8. Relação entre plantas medicinais e fungos endofíticos

Devido à grande variedade vegetal com potencial terapêutico e à diversidade cultural das pessoas, os hábitos relacionados ao uso de plantas medicinais incluem desde pequenas ervas até árvores, bem como também existem diferenças nas partes vegetais utilizadas, podendo ser raízes, folhas, frutos, sementes, cascas, entre outras, e de acordo com a região do Brasil, as necessidades terapêuticas também mudam, diversificando as características de produção/obtenção dos materiais vegetais para uso medicinal e resultando em uma complexidade de aspectos a serem estudados. Todos estes fatores estimulam a curiosidade e inventividade da pesquisa e dos pesquisadores, professores e alunos proporcionando novas pesquisas (MING et al, 2012).

A existência de fungos dentro dos órgãos de plantas de forma assintomática tem sido conhecida desde o final do século XIX (GUERIN, 1898), e o termo "endofítico" foi proposto pela primeira vez em 1866 (DE BARY, 1866). Uma vez que os micro-organismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por Darnel (*Lolium temulentum*) (FREEMAN, 1904), eles têm sido isolados de vários órgãos de diferentes espécies de plantas, como musgos, samambaias, desde os trópicos até os ecossistemas árticos (ARNOLD, 2007), e todas as espécies de plantas estudadas abrigaram pelo menos um microrganismo endofítico (KUSARI, 2012b).

Apesar dos micro-organismos endofíticos terem sido mencionados pela primeira vez no início do século XIX, quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas foi Bary, em 1866. Entretanto, foi apenas no século XX, no fim da década

de 70, que os micro-organismos endofíticos começaram a adquirir importância científica, quando foi verificado que eles apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (AZEVEDO et al., 2002).

Comumente, o uso terapêutico das plantas é conhecido pela sabedoria convencional. No entanto, este uso deve basear-se não apenas na observação, mas também nos resultados da experimentação científica (AVERSI-FERREIRA et al., 2013). Desde milhares de anos a natureza é considerada uma abundante fonte de compostos medicinais, e até os dias atuais pode ser considerada uma inesgotável fonte de novos compostos bioativos (NEWMAN; CRAGG, 2007). As substâncias químicas ativas encontradas no tecido vegetal são responsáveis pela atividade farmacológica de uma planta (VERPOORTE et al., 2000).

Alguns fatores como a constante ameaça à biodiversidade, o baixo número de novas moléculas bioativas químicas desenvolvidas pelas indústrias farmacêuticas, assim como a descoberta de fármacos tendo como fonte os produtos naturais, evidenciam o indiscutível argumento em favor da exploração da natureza de modo cauteloso para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes bioativos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Neste aspecto, a diversidade biológica imensamente rica do Brasil oferece um potencial único e incomparável.

A busca por compostos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. A descoberta da penicilina por Fleming (1929), revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. Esta descoberta levou pesquisadores acadêmicos e indústrias farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de micro-organismos, e esta busca produtiva resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (GALLO et al., 2009).

Os micro-organismos apresentam uma grande importância na terapêutica no que diz respeito às substâncias biologicamente ativas, assim como compreendem uma enorme diversidade de espécies. Apesar disso, do ponto de vista do metabolismo secundário, os fungos e bactérias constituem um dos grupos menos estudados (STROBEL et al., 1996).

Historicamente, entre todos os micro-organismos estudados, os fungos têm sido reconhecidos como um dos produtores de metabólitos secundários mais promissores. Tem sido sugerida a essencialidade dos fungos para a saúde e prosperidade de todos ecossistemas terrestres, devido a eficácia dos mesmos para sustentabilidade e biodiversidade destes ecossistemas (GUNATILAKA, 2006).

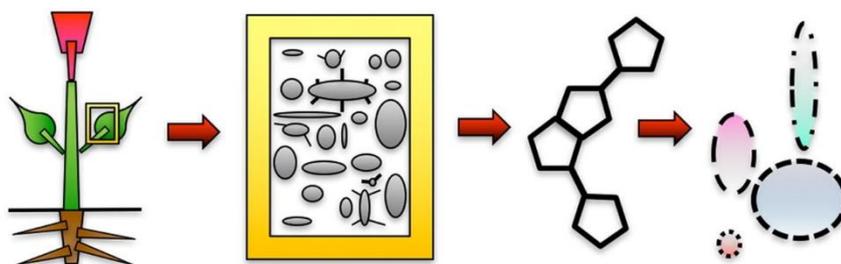
3.9. Relevância biotecnológica de fungos endofíticos

Uma das vantagens em se trabalhar com micro-organismos é a possibilidade de controle sobre os processos operacionais de maneira relativamente simples, e em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em menor tempo e espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura, aeração) podem ser modificadas a fim de aumentar ou de direcionar a produção de metabólitos de interesse (PEARCE, 1997).

Os micro-organismos endofíticos apresentam uma fonte rica e não totalmente estudada de novos compostos naturais biologicamente ativos, de grande interesse em todo o mundo (MACHAVARIANI et al., 2014). Os metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos endofíticos podem ser implementados nas indústrias farmacêutica e agrícola (GOLINSKA et al., 2015), uma vez que os produtos naturais dos endofíticos tem atividades como antimicrobianos, antifúngicos, anticancerígenos, imunossuppressores ou antioxidantes (ZHANG, 2006).

Os metabólitos produzidos pelos endófitos tem atividade antibiótica contra outras bactérias, fungos ou protozoários (MARTINEZ-KLIKOVA, 2017), sendo considerados, deste modo, um importante meio para a obtenção de novas moléculas ativas, conforme ilustra a Figura 4.

Figura 5 - Micro-organismos endofíticos isolados de plantas como fontes de moléculas bioativas.



Fonte: Martinez-Klimova, 2017.

Exemplos mais recentes do isolamento de metabólitos secundários associados aos endofíticos envolvem a camptotecina, obtida de um fungo endofítico de *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005a); podofilotoxina, produzida pelo endofítico *Trametes hirsuta*, isolado de *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2005b); vincristina, isolada a partir do fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004) e hipericina de um fungo associado a *Hypericum perforatum* (KUSARI et al., 2008). Deste modo, novas atenções vem

sendo dadas para a química e bioatividade dos metabólitos dos endofíticos, e também para sua biodiversidade e funções ecológicas (TAN; ZOU, 2001).

Estudo realizado por Gonçalves et al. (2017) com a finalidade de mapear as patentes, nas bases de patentes do *European Patent Office* (EPO), Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil e *World Intellectual Property Organization* (WIPO), verificou a frequência de depósitos e as perspectivas sobre o uso de fungos endofíticos e suas aplicações na indústria farmacêutica, entre os anos de 2000 e 2015. Os resultados deste estudo revelaram que no Brasil foram identificadas apenas cinco (05) patentes depositadas no INPI. É pertinente mencionar que o Brasil, apesar de possuir uma das maiores biodiversidades do mundo (GANEN, 2010), apresentou um número reduzido de depósito de patentes, quando comparado com os dados da China que é a maior detentora de patentes envolvendo fungos endofíticos aplicados na área farmacêutica e cosmética, possuindo 31 patentes depositadas (GONÇALVES, 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Tipo de estudo

Trata-se de pesquisa básica do tipo experimental *in vitro* com abordagem quantitativa, no qual foram testados extratos em acetato de etila do caldo de fermentação de fungos endofíticos isolados das espécies vegetais *A. aculeata*, *P. pyramidalis* e *M. tenuiflora*, visando seu potencial farmacológico. A pesquisa foi constituída de ensaios para identificar a taxonomia dos fungos isolados, bem como para avaliar a atividade citotóxica pelo método colorimétrico Metiltetrazolium (MTT), a atividade antibacteriana para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do Método de Microdiluição em Caldo e a atividade cicatrizante *in vitro* por meio do *Scratch Assay*.

4.2. Locais de realização do estudo

A pesquisa foi realizada em laboratórios pertencentes à Universidade Federal de Alagoas: Laboratório de Microbiologia Clínica (isolamento e identificação dos fungos); Laboratório de pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) (ensaio *in vitro* antimicrobiano); Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) (ensaio *in vitro* MTT), e Laboratório de Biologia Celular (ensaio *in vitro* MTT e *Scratch Assay*).

4.3. Delineamento do estudo

4.3.1. Coleta do material vegetal

As amostras das folhas de *M. tenuiflora* e *P. pyramidalis* foi obtida em triplicata, no município de Delmiro Gouveia/AL em setembro de 2016. A identificação das plantas ocorreu no Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA/AL), onde as exsiccatas encontram-se depositadas em seu Herbário, com a identificação MAC nº 63741 e 63736, respectivamente (Anexo I). As folhas da *A. aculeata* foram cedidas pelo Laboratório de Processos da Macaúba da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.3.2. Isolamento dos fungos

Após a coleta, as amostras foram lavadas suavemente em água corrente para remover os pós e detritos. As amostras foram desinfectadas na superfície pelo método de Dobranic et al. (1995). As amostras foram imersas em etanol a 70% por 5 s, seguidas por imersão em

hipoclorito de sódio (NaOCl) a 4% por 90 s e depois lavadas em água destilada estéril por 10 s. Em seguida, com o auxílio de uma tesoura autoclavada, foram cortados quatro segmentos de 01 cm das folhas e transferidos para placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA).

O material biológico foi incubado em temperatura ambiente (28 ± 1 °C) e observado diariamente. Conforme ocorria a formação dos micélios ao redor dos segmentos das folhas, estes, eram transferidos para outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Para o isolamento total dos fungos, foram feitos vários repiques em meio BDA ou Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) até a obtenção de cultura pura.

4.3.3. Obtenção dos extratos

4.3.3.1 Preparação dos extratos etanólicos das plantas

O material vegetal das folhas de *M. tenuiflora* e *P. pyramidalis*, após secagem à temperatura ambiente e trituração, foram extraídos, por meio de maceração, com o solvente etanol a P. A. Após concentração das soluções em evaporador rotativo na temperatura máxima de 40 °C com 120 rotações por minuto e secagem a temperatura ambiente, foi obtido o extrato etanólico bruto.

As folhas de macaúba foram secas a temperatura ambiente por duas semanas, trituradas e mantidas ao abrigo da luz, em seguida, foram submetidas à extração com etanol P.A. A solução resultante após a filtração foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C 120 rotações por minuto e secagem a temperatura ambiente, foi obtido o extrato etanólico bruto (SANTOS, 2015). Os três extratos provenientes das plantas foram utilizados posteriormente no ensaio de citotoxicidade do MTT, para fins de comparação com os extratos dos fungos isolados das referidas plantas.

4.3.3.2 Preparação dos extratos dos fungos isolados das plantas

Os fungos endofíticos isolados de *A. aculeata*, *P. pyramidalis* e *M. tenuiflora* foram retirados de armazenamento em placas de Petri com meio BDA e cultivados em erlenmeyers

contendo 100 mL de meio líquido de Batata e Dextrose (BD), incubados a 28°C em repouso, e o cultivo foi conduzido por um período de até 30 dias (Figura 6).

Figura 6 - Cultivo dos fungos endofíticos em erlenmeyers com meio líquido Batata Dextrose.



Fonte: autora, 2018.

Em seguida, a massa micelial dos fungos foi separada por filtração, passando-se duas vezes consecutivas em papel de filtro estéril. A fase líquida da cultura (Figura 7), agora denominada caldo de cultivo fermentado, foi submetida ao processo de extração líquido-líquido com acetato de etila (2:1).

Após esse período, o caldo de cultivo fermentado foi concentrado em evaporador rotativo a 40 °C, até eliminação do solvente. Esta técnica está baseada na separação das fases aquosas e orgânicas, pois os componentes presentes no caldo de cultivo fermentado apresentarão diferentes solubilidades nestas duas fases.

Figura 7 - Partição líquido-líquido do caldo de cultivo fermentado com acetato de etila.



Fonte: autora, 2018.

4.3.4. Identificação dos Fungos Endofíticos

O procedimento de identificação foi realizado em duas etapas, na primeira foram observadas características macroscópicas em meio BDA, como coloração, diâmetro das colônias, textura e comparadas com a literatura (DOMSCH et al. 1980).

Na etapa seguinte foi realizado o microcultivo em lâminas (RIDDEL, 1950), onde foram transferidos três segmentos do fungo a ser identificado e cobertos com lamínulas (Figura 8), sendo retiradas após o tempo de crescimento satisfatório de cada fungo, e com leitura realizada no período de 3, 7 e 10 dias, seguido de posterior análise em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200). Aspectos micromorfológicos foram buscados para auxiliar na classificação do gênero, com auxílio de chaves taxonômicas padrão (DE HOOG et al., 2000), e avaliando a presença ou ausência, bem como o tipo de estruturas reprodutivas.

Figura 8 - Microcultivo de *Poincianella pyramidalis* Tul., de acordo com a técnica de Ridell.



4.4. Ensaio de Microdiluição em caldo

4.4.1. Linhagens bacterianas utilizadas

As linhagens bacterianas utilizadas neste estudo foram padronizadas pela *American Type Culture Collection* – ATCC/Manassas - VA/USA. Os extratos foram testados frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) e *Escherichia coli* (ATCC 14942). Estas cepas foram escolhidas pelo fato de serem as bactérias mais frequentes em infecções de feridas infectadas (ROMLING; BALSALOBRE, 2012).

4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima pela Microdiluição em caldo

O protocolo seguido para realização do Método de Microdiluição em Caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima foi baseado no *Clinical Laboratory Standards*

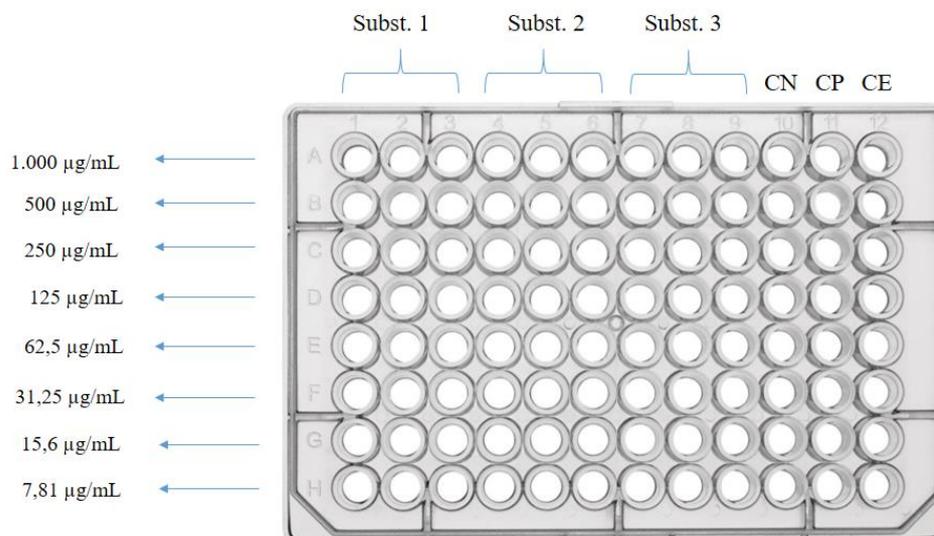
Institute - CLSI (2012), visto que este é um protocolo completo que avalia a atividade antimicrobiana de substâncias, tanto pela difusão em disco, quanto pela microdiluição/macrodiluição em caldo.

A solubilização das amostras se deu através da mistura de 20 mg do extrato em questão, adicionado a 200 μL de solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 % e diluído em 9,80 mL solução fisiológica a 9 %, obtendo uma concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$.

Para realização do teste, foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços com fundo em U, formadas por 12 colunas (1 - 12) e 8 linhas (A - H). Nas colunas de 1 a 9 da linha A, foram colocados os extratos solubilizados, com um volume de 100 μL , obtendo em ambos a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as colunas 10, 11 e 12 foram destinadas respectivamente, para o Controle Negativo (CN): DMSO a 1 % diluído em caldo Mueller Hinton e o inóculo bacteriano; Controle positivo (CP), onde foram utilizados Caldo Mueller Hinton, ciprofloxacina e o inóculo microbiano; e Controle de Esterilidade da placa (CE), onde foi utilizado apenas o Caldo Mueller Hinton, conforme ilustra a figura 9.

Após esse processo, 100 μL do conteúdo do meio MH de cada orifício da linha A foi transferido para a linha B e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo assim o processo até a linha H no qual foi desprezado o excesso, obtendo-se assim as seguintes concentrações: 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 15,62 $\mu\text{g/mL}$, 7,81 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 9 - Microplaca (contendo 96 poços) para técnica da Microdiluição em Caldo



Os inóculos microbianos foram preparados baseado no protocolo proposto pelo CLSI (2012), utilizando a escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias/mL). As bactérias foram diluídas em 3 mL de solução salina tamponada (SST) e 1 mL dessa solução foi rediluído na proporção de 1:10 de SST e desta 5 μ L (10^4 UFC/mL) foram depositados nos poços das colunas de 1 a 11.

As microplacas foram embaladas em papel filme e incubadas em uma estufa bacteriológica a 35 °C de 16 a 20 horas. Após esse período, foi acrescido em cada orifício, 20 μ L de uma solução aquosa de Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC) à 5 % (v/v) e as placas foram reincubadas a 35 °C por mais 3 horas. Após a última incubação, a presença de coloração avermelhada nos poços, indicou que não houve inibição do crescimento microbiano, enquanto que a diminuição da coloração avermelhada ou a inexistência da mesma indicou que o extrato possuiu uma ação inibitória frente ao micro-organismo testado.

4.5. Ensaio colorimétrico do Metiltetrazolium

4.5.1. Linhagem celular

Macrófagos da linhagem J774 foram utilizados para os ensaios *in vitro* de determinação da viabilidade celular. Estes foram mantidos em garrafas de cultura em 10 mL de meio Rosswel Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% em estufa de dióxido de carbono (CO₂). No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB.

4.5.2. Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da citotoxicidade dos extratos das plantas e dos fungos foi realizado o método colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT), fundamentado na atividade mitocondrial das células pela redução do MTT, por meio da clivagem do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, em cristais de formazan, de coloração azul escuro, pela enzima succinato desidrogenase que está presente nas mitocôndrias ativas. Quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os macrófagos foram colocados em placas de 96 poços com uma densidade de 2×10^5 células por poço cultivados em meio Dulbecco Mem (DMEM) suplementado com 10% de SFB, de modo que cada poço foi preenchido com 200 μ L do meio com as células.

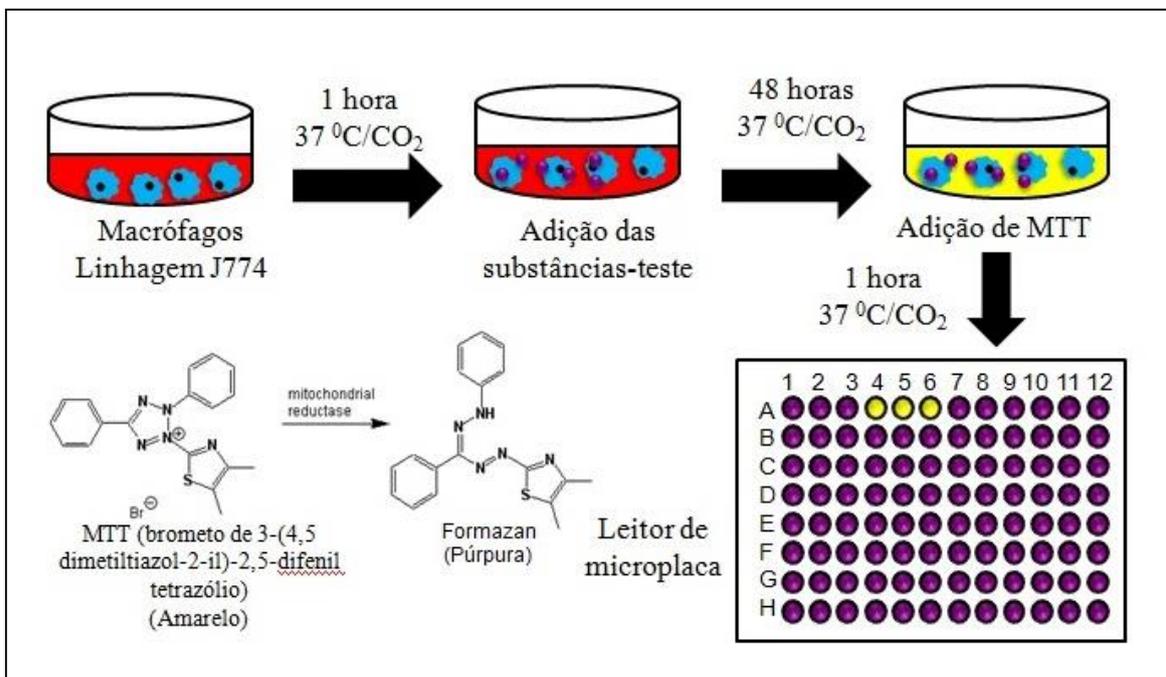
As células foram tratadas com os extratos do caldo de cultivo fermentado dos fungos isolados de *M. tenuiflora*, *A. aculeata* e *P. pyramidalis* submetidos aos testes antibacterianos *in*

in vitro, nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL por 48 horas e mantidas em estufa a 5 % de CO₂. Uma hora antes de adicionar o MTT, as células de três poços foram lisadas com 2 µL de Triton 100X para comparação de morte celular.

Como controle positivo foram utilizadas células mortas e como controle negativo células cultivadas acrescidas do diluente DMSO, em cada respectivo poço. Após o período de incubação total (48 h), o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade foi adicionado 100 µL de uma solução de MTT (500 µg/mL) e reincubadas por 1 hora em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensionado com 100 µL de DMSO.

Para a quantificação do sal tetrazólio reduzido a cristais de formazan, as placas foram lidas com o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm. Para obtenção dos resultados, a média das absorbâncias e diferenças estatísticas entre os grupos tratados e os de controle foram avaliados pelo teste Dunnett e ANOVA e identificados por um, dois ou três asteriscos (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001) os níveis de significância em comparação com os grupos controle. O esquema geral do ensaio de viabilidade celular do metiltetrazolium está ilustrado na figura 10.

Figura 10 - Esquema geral do ensaio de viabilidade celular do metiltetrazolium (MTT)



Fonte: Elaborado pela autora baseado em MOSMANN et al., 1983.

4.6. Ensaio cicatrizante *in vitro* utilizando Scratch Assay

4.6.1. Linhagem celular

Para a realização do presente ensaio, foram utilizados fibroblastos da linhagem 3T3 de tecido de embrião de camundongo Fibroblastos 3T3 cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), L-glutamina (2 mM) e gentamicina (40 µg / mL) em incubadora umidificada em atmosfera com 5% CO₂ a 37 ° C.

4.6.2 Ensaio de Viabilidade Celular com MTT

O efeito dos extratos de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp. isolado de *P. pyramidalis*, *Rhizoctonia* sp. isolado de *M. tenuiflora* e do fungo endofítico não identificado isolado de *A. aculeata* na viabilidade dos fibroblastos 3T3 foi realizado pelo ensaio MTT (MOSMANN, 1983).

Para realização do ensaio, as células foram semeadas em uma placa de 96 poços (7 x 10³ células / poço) durante a noite e tratados com diferentes concentrações dos extratos de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. e do endofítico isolado de *A. aculeata* (1, 10, 50 ou 100 µg / mL) por 24 horas. Após a incubação com o tratamento, 22,5 µL de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo) (Sigma-Aldrich - EUA) (5 mg / mL em PBS) foi adicionado a cada poço por 4 horas.

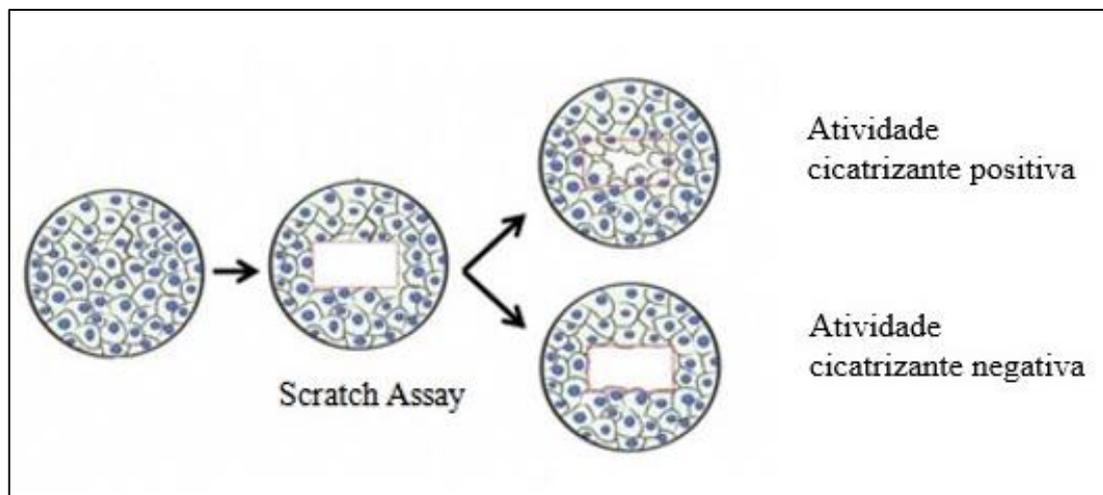
Então, o sobrenadante foi descartado e 150 µL de DMSO foram adicionados a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. A absorbância de cada poço foi registrada usando um espectrofotômetro de microplacas e a densidade óptica (DO) foi medida a 540 nm. A porcentagem de célula de viabilidade foi calculada através desta fórmula: (células tratadas com DO / células não tratadas com DO) X 100.

4.6.3. Determinação da migração celular pelo *Scratch Wound Assay*

O *Scratch Assay* é um método direto e econômico para estudar a migração celular *in vitro* (TODARO, 1965). Este método baseia-se na observação de que, após a criação de um risco, chamada "scratch", em uma monocamada celular confluenta, as células na borda do espaço recém-criado mover-se-ão para a abertura para fechar o "arranhão" até que novos contatos de célula-célula sejam estabelecidos novamente. As etapas básicas envolvem a criação de um "arranhão" em células monocamadas, a captura de imagens no início e

intervalos regulares durante a migração celular para fechar o arranhão e a comparação das imagens para determinar a taxa de migração celular (LIANG et al., 2007).

Figura 11 - Esquema do ensaio in vitro de cicatrização *Scratch Assay*.



Fonte: Figura adaptada do site VALA SCIENCES INC, 2018.

O efeito dos extratos de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp. isolado de *P. pyramidalis*, *Rhizoctonia* sp. isolado de *M. tenuiflora* e do fungo endofítico não identificado isolado de *A. aculeata*, na migração dos fibroblastos 3T3 foi avaliada pelo ensaio de cicatrização de ferida *in vitro* ou Scratch wound assay (MOSMANN, 1983).

Os fibroblastos 3T3 foram cultivados em uma placa de 24 poços (7×10^4) em meio DMEM contendo 10% de SBF durante 12 horas. Assim, a monocamada celular confluenta foi arranhada por uma ponta ponteira estéril de 200 μ L. Para observar o efeito das amostras testadas na migração de fibroblastos, as células foram tratadas com meio DMEM a 2 % ou com extratos de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp. isolado de *P. pyramidalis*, *Rhizoctonia* sp. isolado de *M. tenuiflora* e do fungo endofítico não identificado isolado de *A. aculeata* imediatamente antes da confecção do arranhão. A concentração utilizada no Scratch assay foi de 10 μ g / mL que foi definida após a realização do MTT com fibroblastos.

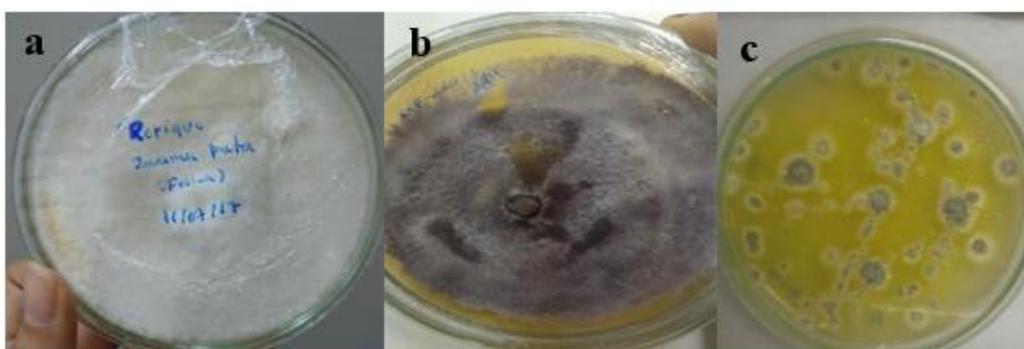
A avaliação da atividade cicatrizante se deu através da observação do crescimento e migração de células em direção ao centro, sendo monitorada por mensuração (CORY, 2011). As imagens foram tiradas às 0 e 24 horas após o arranhão, e a mensuração foi verificada por um microscópio invertido (Olympus IX70) usando uma câmera digital. A migração celular foi medida com o software ImageJ.

5. RESULTADOS

5.1. Fungos endofíticos isolados

Após o crescimento micelial em meio sólido, procedeu-se o isolamento do material microbiológico por vários repiques até o isolamento de um único micro-organismo fúngico. Como resultado, foram obtidas dois micro-organismos endofíticos, um fungo isolado de cada uma das plantas estudadas: *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir e *Poincianella pyramidalis* Tui., e 6 (seis) micro-organismos endofíticos isolados de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart (SANTOS, 2015), entretanto, no presente estudo trabalhou-se com apenas um endofítico da referida espécie vegetal, totalizando 3 micro-organismos, sendo um fungo isolado de cada espécie vegetal, conforme ilustra a figura 9. Foram realizados sucessivos repiques a fim de eliminar qualquer micro-organismo contaminante e obter os fungos objetos deste estudo purificados nas placas para seguir com o preparo dos extratos.

Figura 12 - Fungos endofíticos isolados de a) *Mimosa tenuiflora*, b) *Acrocomia aculeata* e c) *Poincianella pyramidalis*.



Fonte: autora, 2018.

5.2. Identificação macroscópica e microscópica dos fungos endofíticos

O fungo endofítico isolado de *P. pyramidalis* macroscopicamente apresentou colônias filamentosas pulverulentas de coloração verde acinzentado em sua região central e bordas de coloração verde escura (Figura 13).

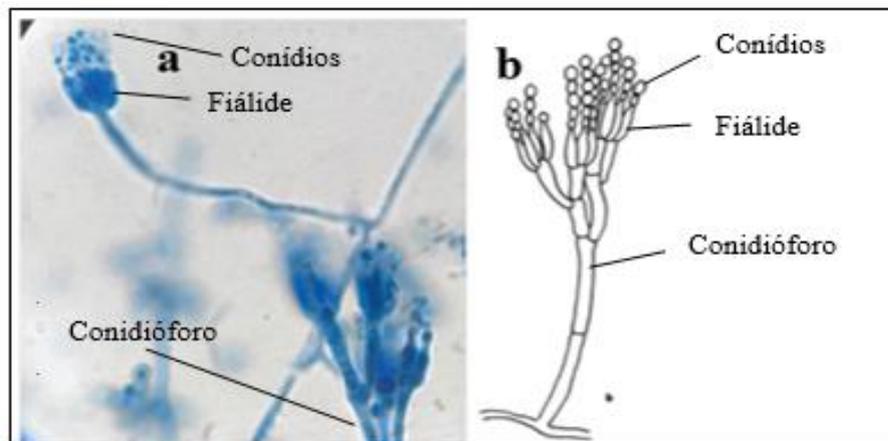
Figura 13 - Fungo endofítico isolado de *Poincianella pyramidalis*.



Fonte: autora, 2018.

À microscopia, o mesmo fungo apresentou conidióforos ramificados e conídios distribuídos sobre as fiálide em forma de cadeias (Figura 14), possibilitando desta forma a identificação do gênero do fungo endofítico *Penicillium* sp. (ONIONS; BRADY, 1987), quando comparado com a literatura especializada. Pequenos fragmentos contendo hifas foram depositados em lâminas, coradas com azul de lactofenol algodão e examinados ao microscópio óptico (160x).

Figura 14 - Microscopia óptica do fungo endofítico *Penicillium* sp. (160 x) corado com azul de lactofenol algodão, isolado de *Poincianella pyramidalis* em comparação com literatura especializada.

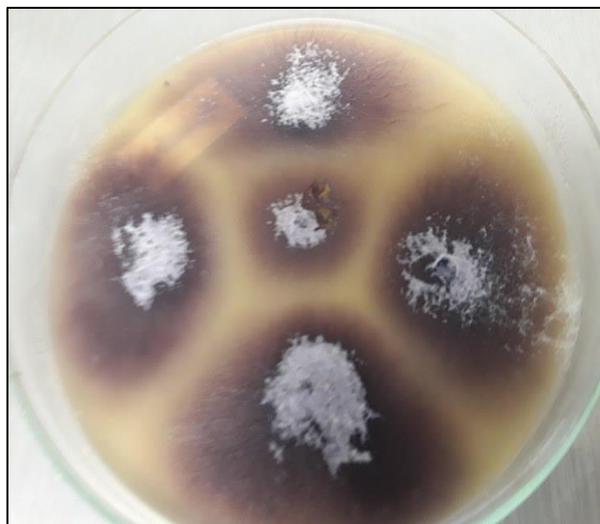


Fonte: a) Autora, 2018; b) Adaptado de Onions; Brady, 1987.

Dentre os 6 fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *A. aculeata* (SANTOS, 2015), optou-se por trabalhar com um dos fungos no presente estudo. O mesmo apresentou

como características macroscópicas: colônias filamentosas pulverulentas de coloração roxa com áreas de coloração branca no centro da colônia (Figura 15).

Figura 15 - Fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata*.



Fonte: autora, 2018.

Microscopicamente o fungo endofítico isolado de *A. aculeata* (Figura 16) pela técnica do microcultivo não apresentou estruturas reprodutivas, o que inviabilizou a identificação do gênero do mesmo, por meio das chaves taxonômicas da literatura especializada.

Figura 16 - Microscopia óptica do fungo endofítico (160 x) corado com azul de lactofenol algodão isolado de *Acrocomia aculeata*.



Fonte: autora, 2018.

Da espécie vegetal *M. tenuiflora* foi isolado um fungo endofítico que macroscopicamente apresentou-se como colônias filamentosas algodonosas de coloração branca (Figura 17).

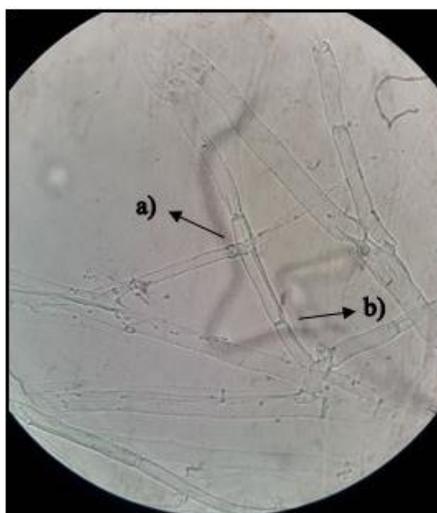
Figura 17 - Fungo endofítico isolado de *Mimosa tenuiflora*



Fonte: autora, 2018.

O fungo endofítico isolado de *M. tenuiflora* apresentou como característica morfológica à microscopia, ser um fungo hialino e septado, com ramificações em ângulo reto. A partir dessas características e por meio das chaves taxonômicas da literatura especializada (DE HOOG et al, 2000), foi realizada a identificação do fungo endofítico *Rhizoctonia* sp.

Figura 18 - Microscopia óptica do fungo endofítico *Rhizoctonia* sp. (100 x) clarificado com hidróxido de potássio (KOH), isolado de *Mimosa tenuiflora*.



Legenda: a) ramificações em ângulo reto; b) micélio septado.

5.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

No presente estudo, os resultados quanto a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos do caldo de cultivo fermentado dos fungos isolados de *M. tenuiflora*, *A. aculeata* e *P. pyramidalis*, contra as cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 14990), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *E. coli* (ATCC 14942) estão na tabela 2.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos oriundos dos fungos isolados.

Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
Estirpes bacterianas	Fungo isolado da <i>Mimosa tenuiflora</i>	Fungo isolado da <i>Poincianella pyramidalis</i>	Fungo isolado da <i>Acrocomia aculeata</i>
<i>S. aureus</i>	NI	NI	31,25 $\mu\text{g/mL}$
<i>S. epidermidis</i>	NI	NI	62,5 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. aeruginosa</i>	NI	NI	NI
<i>E. coli</i>	NI	NI	NI

Legenda: NI: não inibiu; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *E. coli*: *Escherichia coli*.

Os extratos dos fungos isolados de *M. tenuiflora* e de *P. pyramidalis* não demonstraram ação inibitória frente às cepas testadas de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Já o extrato do fungo isolado de *A. aculeata* não apresentou ação inibitória frente às cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli*, no entanto, o extrato apresentou CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* e CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *S. epidermidis*.

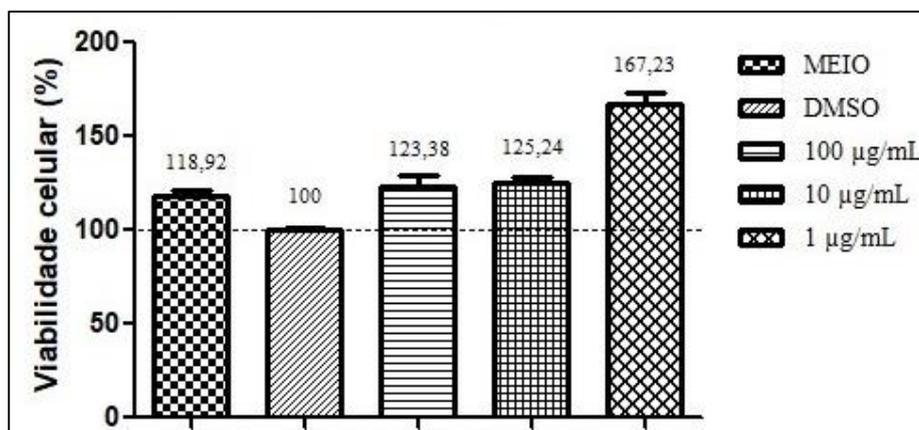
5.5. Citotoxicidade pelo Método Colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo Método Colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT) frente aos macrófagos J774, nas seguintes concentrações: 100 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$, e para fins de comparação o presente teste foi realizado com os extratos das plantas bem como com os extratos dos fungos endofíticos isolados das referidas plantas.

Ao analisar o gráfico da citotoxicidade quando comparadas às células tratadas com DMSO (grupo controle), o extrato do fungo endofítico isolado da *M. tenuiflora* não apresentou efeito letal significativo para os macrófagos J774 em todas as concentrações testadas, apresentando-se atóxico, com viabilidade celular de 123,38 %, 125,24 % e 167,23 % na

concentração de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente, conforme ilustra a figura 19.

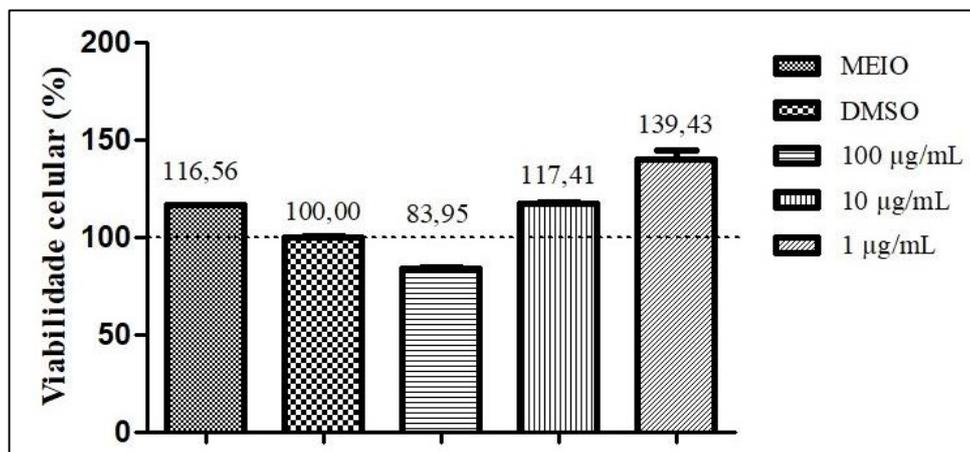
Figura 19 - Viabilidade celular do extrato em acetato de etila do fungo *Rhizoctonia* sp. isolado de *Mimosa tenuiflora* frente aos macrófagos J774.



Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (DMSO).

O extrato da planta *M. tenuiflora*, diferente do que foi apresentado pelo fungo *Rhizoctonia* sp. isolado da referida espécie vegetal, na concentração de 100 µg/mL apresentou considerável citotoxicidade com 83,95 % de viabilidade celular, entretanto nas concentrações de 10 e 1 µg/mL, assim como o extrato do fungo *Rhizoctonia* sp., o extrato da planta não apresentou citotoxicidade com viabilidade celular de 117,41 % e 139,93 %, respectivamente (Figura 20).

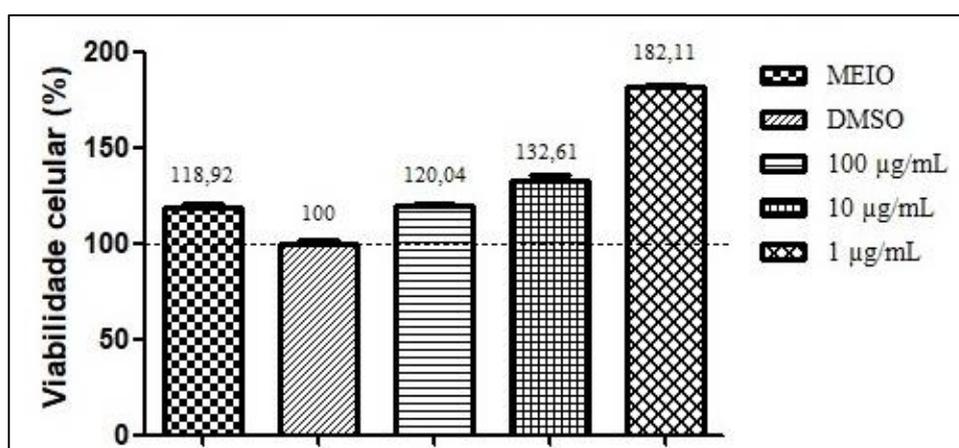
Figura 20 - Viabilidade celular do extrato etanólico de *Mimosa tenuiflora* frente aos macrófagos J774.



Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (DMSO).

Do mesmo modo, ao analisar o gráfico da citotoxicidade quando comparadas às células tratadas com DMSO (grupo controle), o extrato do caldo de cultivo fermentado do fungo endofítico isolado da espécie vegetal *A. aculeata* não apresentou efeito letal significativo para os macrófagos J774 em todas as concentrações testadas, sendo, portanto atóxico, com viabilidade celular de 120,04 %, 132,61 % e 182,11 % na concentração de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Como foi possível perceber, o presente extrato exibiu acentuada proliferação celular, conforme ilustra a figura 21.

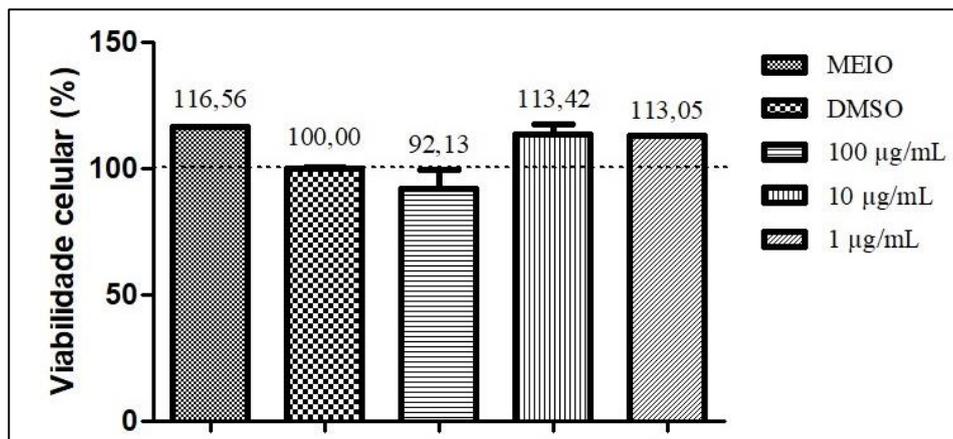
Figura 21 - Viabilidade celular do extrato em acetato de etila do fungo isolado de *Acrocomia aculeata* frente aos macrófagos J774.



Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (DMSO).

O extrato da planta *A. aculeata*, diferente do que foi apresentado pelo fungo endofítico isolado da referida espécie vegetal, na concentração de 100 µg/mL apresentou certa citotoxicidade com 92,13 % de viabilidade celular, entretanto nas concentrações de 10 e 1 µg/mL, semelhante ao extrato do fungo, o extrato da planta não apresentou citotoxicidade com viabilidade celular de 113,42 % e 113,05 %, respectivamente.

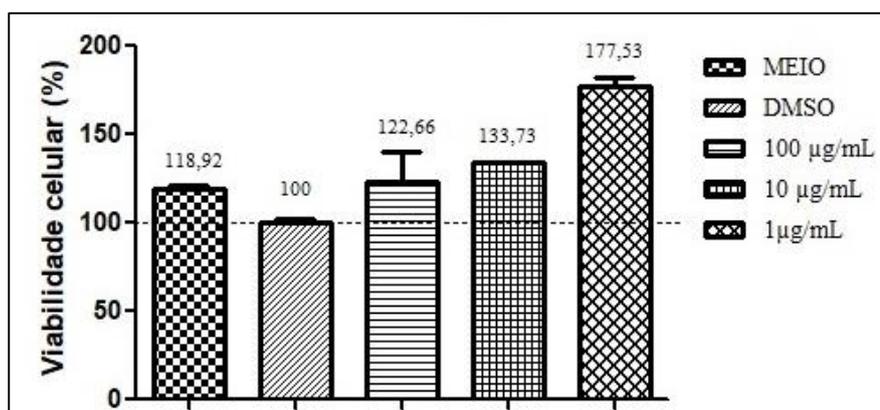
Figura 22 - Viabilidade celular do extrato etanólico de *Acrocomia aculeata* frente aos macrófagos J774.



Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (DMSO).

O extrato do fungo endofítico isolado da *P. pyramidalis*, apresentou-se atóxico, comparando-se com o grupo controle (gráfico 3). Não se observou efeitos deletérios nas células tratadas, nas três concentrações testadas, com viabilidade celular de 122,66 %, 133,73 % e 177,53 % nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Frente a estes resultados considera-se que este extrato exibiu acentuada proliferação celular.

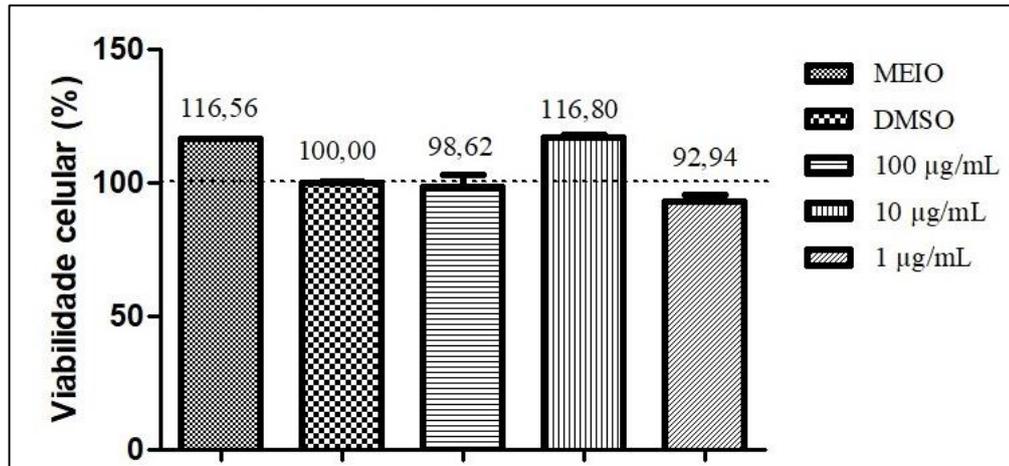
Figura 23 - Viabilidade celular do extrato em acetato de etila de *Penicillium* sp. isolado de *Poincianella pyramidalis* frente aos macrófagos J774.



Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (DMSO).

O extrato da planta *P. pyramidalis* não apresentou citotoxicidade significativa quando testado frente aos macrófagos J774, de modo que na concentração de 100 µg/mL apresentou viabilidade celular de 98,62 %, e nas concentrações de 10 e 1 µg/mL apresentou viabilidade celular de 116,80 % e 92,94 %, respectivamente (Figura 24).

Figura 24 - Viabilidade celular do extrato etanólico de *Poincianella pyramidalis* frente aos macrófagos J774.



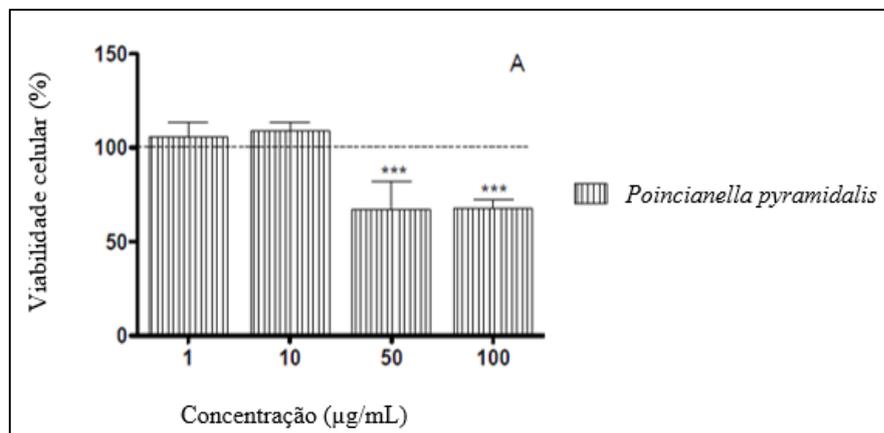
Legenda: Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle (DMSO).

5.6 Ensaio de migração celular

5.6.1. Viabilidade celular com fibroblastos 3T3

O efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp. isolado de *P. pyramidalis* na viabilidade dos fibroblastos 3T3 foi realizado pelo ensaio MTT, de modo que nas concentrações de 100 e 50 µg/mL o extrato se mostrou tóxico, com viabilidade celular de 67.72 ± 2.13 e 67.23 ± 6.53 %, respectivamente. Já nas concentrações de 10 e 1 µg/mL o extrato não foi tóxico, com viabilidade de 108.8 ± 2.12 e 105.7 ± 3.58 %, respectivamente.

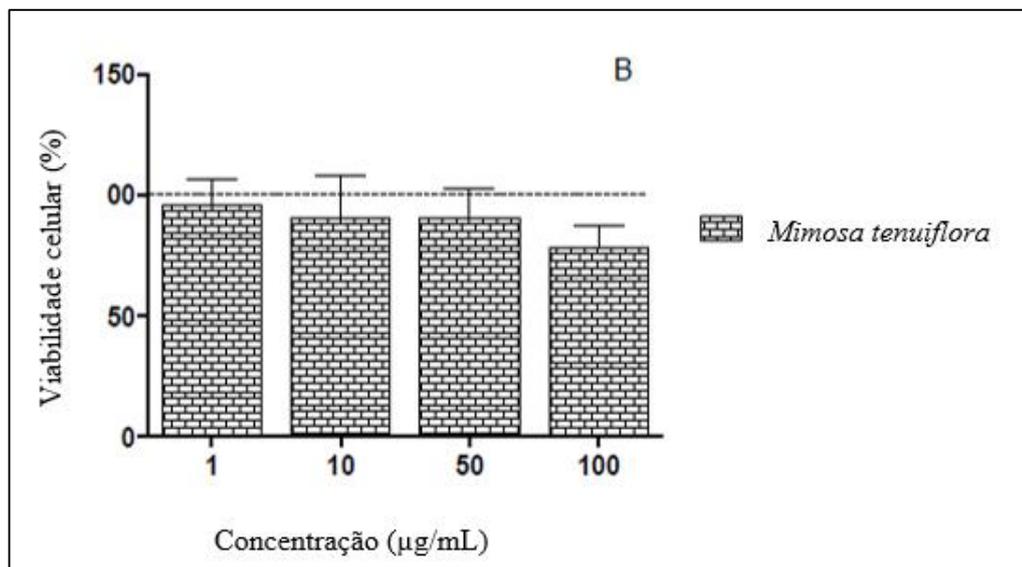
Figura 25 - Efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp. isolado de *Poincianella pyramidalis*.



Legenda: As barras representam a média \pm SEM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com DMEM). Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação ao grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ (controle vs. tratamento).

O efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de *Rhizoctonia* sp. isolado de *M. tenuiflora* na viabilidade dos fibroblastos 3T3 está representado na figura 26. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ o extrato se mostrou tóxico, com viabilidade celular de 78.45 ± 3.93 %, entretanto nas concentrações de 50, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$ o extrato não apresentou citotoxicidade.

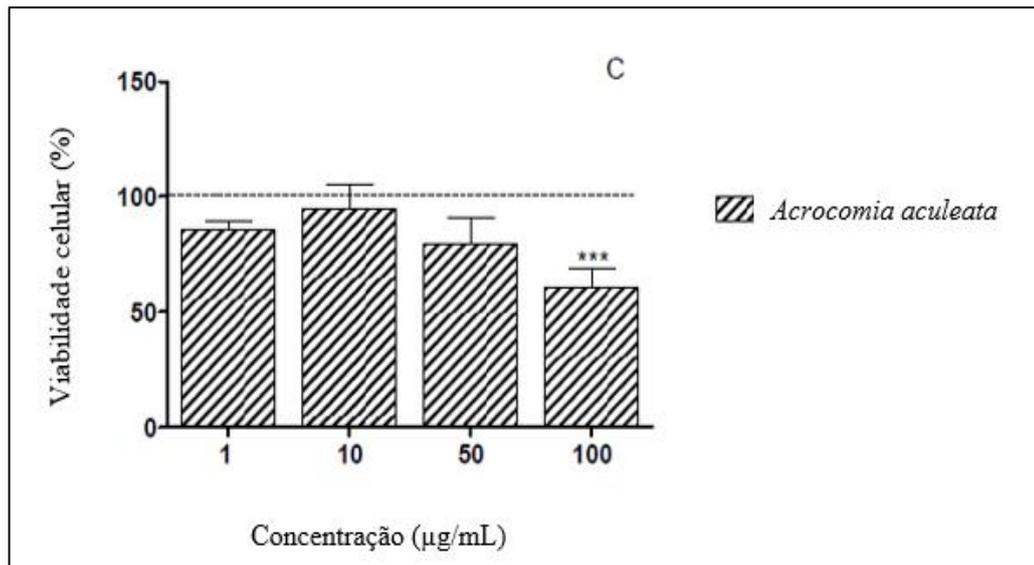
Figura 26 - Efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado de *Rhizoctonia* sp. isolado de *Mimosa tenuiflora*.



Legenda: As barras representam a média \pm SEM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com DMEM). Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ (controle vs. tratamento).

O extrato de acetato de etila do caldo fermentado do fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata* apresentou efeito tóxico na viabilidade dos fibroblastos 3T3 nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$, com $79,50 \pm 4,92$ e $60,69 \pm 3,55$ % de células viáveis. Nas concentrações de 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$, o extrato não apresentou citotoxicidade significativa.

Figura 27 - Efeito do extrato de acetato de etila do caldo fermentado do fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata*.



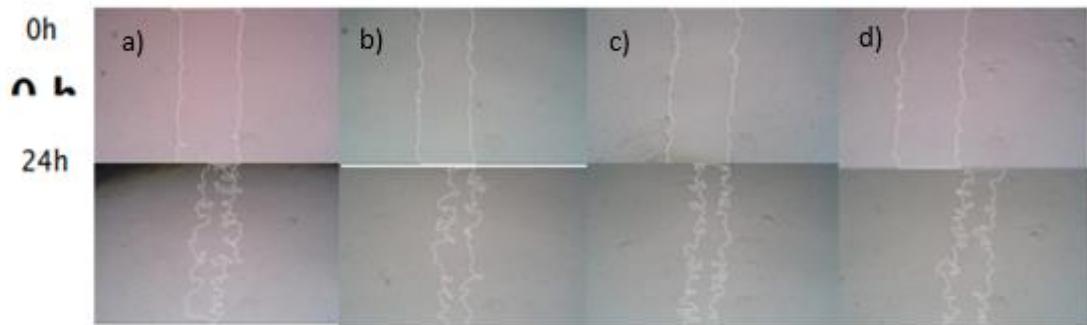
Legenda: As barras representam a média \pm SEM. A linha tracejada representa o grupo controle (tratado com DMEM). Os dados foram expressos em porcentagem de células viáveis em comparação grupo controle. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ (controle vs. tratamento).

Os valores da média e erro padrão da média das amostras dos extratos de acetato de etila do caldo fermentado de *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp. e do fungo endofítico isolado de *A. aculeata* na viabilidade dos fibroblastos 3T3 estão representados na tabela 3. A partir do presente resultado do ensaio do MTT, foi determinada a concentração de 10 µg/mL para a realização do Scratch Assay com a mesma linhagem celular de fibroblastos, devido a não toxicidade dos extratos na referida concentração.

5.6.2 Ensaio cicatrizante *in vitro* (Scratch Assay)

No ensaio cicatrizante *in vitro*, fibroblastos da linhagem 3T3 foram semeados em placas de 24 poços durante a noite, depois as células foram arranhadas e tratadas com os extratos em acetato de etila do caldo de cultivo fermentado de *Rhizoctonia* sp., *Penicillium* sp. e do fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata* (10 µg / mL) ou meio de cultura (DMEM).

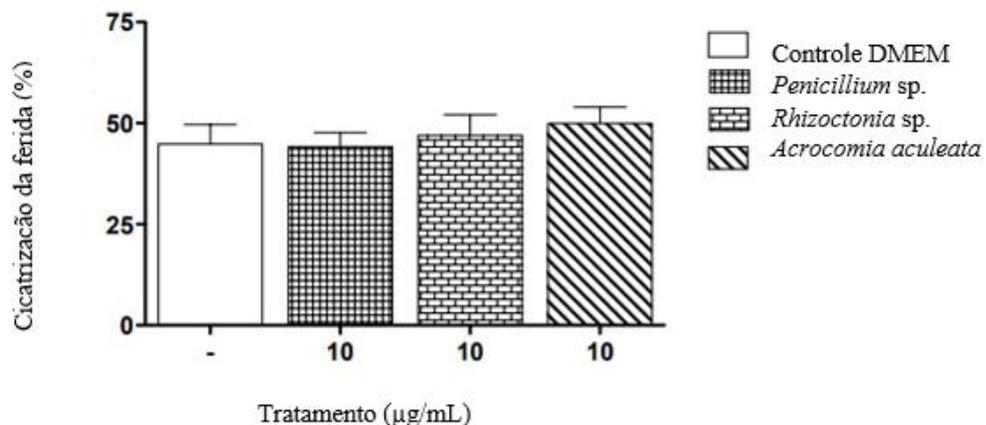
Figura 28 - Fotomicrografias representativas das células feridas às 0 e 24 h após o arranhão.



Legenda: a) Controle com DMEM; b) Extrato de *Penicillium* sp.; c) Extrato de *Rhizoctonia* sp.; d) Extrato de fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata*.

A avaliação da taxa de migração dos fibroblastos 3T3 para cicatrização da ferida foi realizada na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, esta concentração foi estabelecida na realização do ensaio de citotoxicidade com fibroblastos da mesma linhagem, de modo que em 10 $\mu\text{g/mL}$ as substâncias não foram tóxicas. Os resultados demonstraram que os extratos em acetato de etila do caldo de fermentação de *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia* sp. se comportaram de modo semelhante quando comparados ao controle (44.81 ± 4.89 %) com taxa de migração de 44.18 ± 3.47 % e 46.98 ± 5.05 %, respectivamente. Já o extrato do fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata* apresentou uma taxa de migração de 49.94 ± 4.03 %, que foi superior ao controle, deste modo, os três extratos apresentaram atividade cicatrizante *in vitro* positiva.

Figura 29 - Análise da taxa de migração celular dos fibroblastos 3T3.



Legenda: A análise da taxa de migração foi avaliada pelo software ImageJ.

6. DISCUSSÃO

Produtos naturais desempenham um importante papel no tratamento e prevenção de doenças humanas a milhares de anos (MUSSI-DIAS et al., 2012). Aproximadamente, estima-se que mais de um milhão de estirpes fúngicas endofíticas diferentes habitam cerca de 300 mil espécies de plantas diversas, e a hiperdiversidade dos fungos endofíticos deriva de que cada espécie de planta individual pode ser colonizada com uma ou mais cepas de fungos (HUANG et al., 2007). No presente estudo, foram isolados dois fungos endofíticos das plantas medicinais *Mimosa tenuiflora* e *Poincianella pyramidalis*, sendo um fungo de cada espécie vegetal. Da espécie vegetal *Acrocomia aculeata* foram isolados seis fungos endofíticos (SANTOS, 2015), no entanto, nesta pesquisa trabalhou-se com apenas um dos fungos endofíticos isolados da referida espécie.

O fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado a partir de *P. pyramidalis*, macroscopicamente apresentou-se como colônias filamentosas pulverulentas de coloração verde acinzentado e à microscopia óptica apresentou conidióforos ramificados e conídios distribuídos sobre as fiáides em forma de cadeias, características pertencentes a esse gênero de fungos, de acordo com os manuais de identificação para *Penicillium* descritos por Pitt (2000) e Pitt e Hocking (1997). No entanto, não foi possível realizar a identificação da espécie do presente endofítico somente com base nas características morfológicas e chaves de identificação.

O gênero *Penicillium* abrange inúmeras espécies distintas, com características semelhantes, fato este que muitas vezes dificulta a identificação da espécie com precisão baseado apenas na caracterização morfológica e chaves de identificação. Visagie e colaboradores (2014) listaram as espécies descritas corretamente de *Penicillium* e até a data da publicação do estudo, o gênero *Penicillium* apresentava 354 espécies. Pereira (2016) isolou 68 espécies do gênero *Penicillium*, dentre essas, 43 morfotipos de *Penicillium* não foram identificados com base nas características morfológicas, pois possuíam características muito distintas das encontradas nas chaves de identificação e artigos pesquisados. A exemplo disto, o complexo *P. sclerotiorum* apresenta 29 espécies bastante semelhantes que podem aduzir possíveis erros na identificação (RIVERA e SEIFERT, 2011).

A dificuldade encontrada na identificação das espécies de *Penicillium* com base na morfologia torna necessária a busca de novas ferramentas que venham complementar a taxonomia clássica. Neste contexto, cada vez mais tem-se utilizado técnicas modernas tais como a microscopia eletrônica de varredura, que visualiza detalhes da estrutura reprodutora do fungo

e a biologia molecular, considerada o “padrão de ouro” da taxonomia (SAMSON; FRISVAD, 2004). Na realidade, isto significa que é recomendável combinar a análise tradicional fenotípica com abordagens fisiológicas modernas e biologia molecular, a chamada taxonomia polifásica, para a identificação precisa das espécies (RODRIGUES et al., 2011).

Espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. têm sido utilizadas como modelo em estudos básicos, e pesquisas aplicadas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico, a exemplo disto, algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole (DE STEFANO et al., 1999; GUIJARRO et al., 2008; MA et al., 2008; MMBAGA; SAUVÉ E MREMA, 2008), micoparasitismo (LARENA et al. 2003; SABUQUILLO et al. 2006) e seus metabólitos secundários são de interesse para diversas indústrias, especialmente como fontes de novos fármacos para a indústria farmacêutica (ZENG et al. 2005; NICOLETTI, 2008).

O fungo endofítico *Rhizoctonia* sp. foi isolado a partir de *M. tenuiflora*, e macroscopicamente possui colônia filamentosa algodonosa de coloração branca e após clarificação microscópica com KOH foi classificado o gênero. Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia* sp. não descritos quanto a espécie são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação especialmente devido às limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, como a ausência de esporos assexuais e heterogeneidade de características na morfologia dos fungos pertencentes ao gênero (PARMETER; WHITNEY, 1970). No estudo de Fenille (2001), isolados de *Rhizoctonia* sp. binucleados apresentaram colônias de coloração branca em meio BDA, sem presença de áreas zonadas circulares, com poucos escleródios formados. Segundo Sneh et al. (1991), tais características são comuns a isolados de *Rhizoctonia* spp. binucleados.

Pedras et al. (2005) isolaram e identificaram quatro metabólitos secundários, pela primeira vez, do filtrado da cultura de *Rhizoctonia solani*: Nb-acetilriptamina e três dioxopiperazinas, ciclo (S-Pro-S-Leu), ciclo (S-Pro-S-Ile) e ciclo (S-Pro-S-Val), que são substâncias que possuem ação antifúngica, apesar disso, o mesmo autor (PEDRAS et al., 2005) considera o fungo supracitado um fitopatogênico. Em contrapartida, Barros et al. (2011) consideram o fungo *Rhizoctonia solani* como um endofítico, o qual foi extraído da planta *Schinus terebinthifolius*, popularmente conhecida como aroeira, de modo que do extrato metanólico do micélio foi detectada atividade antinociceptiva em ratos.

O endofítico isolado de *A. aculeata* (colônia filamentosa pulverulenta de coloração roxa) não foi identificado, uma vez que a classificação convencional de fungos necessita da observação de suas estruturas reprodutivas e a ausência de estruturas reprodutivas e de esporulação impossibilitou a identificação do mesmo. Este é um problema comum relacionado com a identificação de fungos endofíticos (GAMBOA; BAYMAN, 2001; PROMPUTTHA et

al., 2005). A alta ocorrência de formas vegetativas (assexuais) durante o isolamento de microorganismos endofíticos, dificulta a identificação morfológica dos isolados, e tem sido relatada na literatura por outros estudos (PROMPUTTHA et al., 2005; PIMENTEL et al., 2010; PAUL, 2014; SILVA, 2017).

No teste antimicrobiano, o extrato do caldo de cultivo fermentado de *A. aculeata* apresentou significativa atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas testadas, com CIM de 62,5 µg/mL para *S. aureus* e CIM de 31,25 µg/mL para *S. epidermidis*, no entanto, o mesmo extrato não demonstrou ação inibitória quando testado frente às bactérias Gram negativas. As bactérias Gram negativas contêm uma membrana citoplasmática e externa; além dos fosfolipídios, a membrana externa contém lipopolissacarídeos (LPS), enquanto que as bactérias Gram positivas não possuem uma membrana externa ou LPS (AUER; WEIBEL, 2017).

Bactérias Gram negativas são tipicamente mais resistentes aos antimicrobianos do que as Gram positivas, e este fato tem sido explicado pela presença da barreira de permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram negativas, que limita o acesso dos antimicrobianos aos seus alvos na célula bacteriana (POOLE, 2001). Sugere-se que as diferenças estruturais apresentadas nas paredes celulares das bactérias testadas provavelmente afetaram o desempenho do extrato, e assim, o extrato em acetato de etila do caldo fermentado do fungo isolado da *A. aculeata* não inibiu as bactérias Gram negativas alvos desta pesquisa.

Em estudo realizado por Campos et al. (2015), foram isolados 82 fungos endofíticos da planta *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae) e produzidos extratos de acetato de etila dos mesmos, para testes como antimicrobianos, os extratos de *Talaromyces* sp., *Aspergillus* sp. e *Epicoccum sorghi* mostraram atividade antibacteriana contra espécies bacterianas Gram positivas e Gram negativas (*S. aureus* e *E. coli*) com valores de CIM variando de 32-64 µg / mL. O isolamento de endofíticos com atividade antimicrobiana desta espécie vegetal revela o potencial do gênero *Caesalpinia* em abrigar endofíticos que podem ser utilizados como agentes antimicrobianos. Neste contexto, o gênero *Penicillium* é intensamente estudado quanto aos seus metabólitos secundários e produção de compostos de interesse econômico, como os antimicrobianos (PETIT et al., 2009). No entanto, no presente estudo, o fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado de *P. pyramidalis* (sín. *Caesalpinia pyramidalis*) não demonstrou atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas.

Em estudo realizado por Machado (2009) foram isolados *Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp. como fungos endofíticos das folhas e caules de *C. echinata*. Embora nenhum desses isolados tenha sido ativo contra *Enterococcus faecalis*, *P.*

aeruginosa ou *S. aureus* no ensaio de difusão em ágar (100 µg e 1.000 µg), eles foram capazes de inibir o crescimento dos fungos fitopatógenos *Pythium debaryanum* e *Phytophthora palmivora*. Ainda são escassos os estudos disponíveis sobre as atividades biológicas de fungos endofíticos isolados de espécies do gênero *Caesalpinia* (sín. *Poincianella*).

Do fungo endofítico *Penicillium* sp. abrigado nas folhas da planta medicinal camaronesa *Garcinia nobilis*, foram isolados três novos policetídeos denominados de peniadilinas A-C (JOURDA et al., 2014). Os novos compostos apresentaram excelentes atividades antimicrobianas frente às bactérias *E. coli* (DSM 1116), *E. coli* (DSM 682) e *Bacillus subtilis* (DSM 1088) e *Acinetobacter* sp. BD4 (DSM 586). Dado que revela a importância de além de identificar os fungos, investigar qual a substância que está conferindo atividade àquele extrato, visto que há a grande possibilidade de descoberta de novas substâncias.

Foram testados extratos de diclorometano feitos a partir de 37 fungos filamentosos endofíticos isolados de plantas de café (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*) quanto à atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas humanas, como *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e quatro cepas diferentes de *E. coli* pelo método da microdiluição em caldo para determinação da CIM. Dos extratos testados, 17 inibiram pelo menos uma das bactérias estudadas (SETTE et al., 2006). O que revela o potencial antimicrobiano destes microorganismos endofíticos, bem como apresentou o extrato de *A. aculeata* testado no presente estudo.

Os extratos brutos em n-butanol de 5 dos 63 fungos endofíticos isolados dos rizomas de *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, mostraram atividade antibacteriana contra 4 bactérias Gram negativas (*E. coli*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Agrobacterium tumefaciens* e *P. lachrymans*) e duas bactérias Gram positivas (*B. subtilis*, *S. haemolyticus*) (ZHAO et al., 2008). No estudo da planta medicinal *Camptotheca acuminata*, Lin et al. (2007) isolaram 174 fungos endofíticos, destacando-se o gênero *Alternaria* sp. Dos extratos preparados numa mistura de acetato (80 %), metanol (15 %) e ácido fórmico (5 %) de 22 extratos de *Alternaria* sp. e 2 extratos de *Rhizoctonia* sp. os mesmos foram testados contra *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. niger*, destes, 3 extratos de *Alternaria* sp. e 2 extratos de *Rhizoctonia* sp. mostraram atividade antimicrobiana.

O fungo endofítico codificado como AFKR18, pertencente à classe dos fungos *Coelomycetes*, de *Arcangelisia flava* (L.) Merr, produziu a pachibasina que mostrou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com valores de CIM de 64,0 µg/mL; 64,0 µg/mL e 32,0 µg/mL, respectivamente (WULANSARI et al., 2014). Apesar de não apresentar atividade antibacteriana frente a bactéria

E. coli, a CIM frente a *S. aureus* do extrato do fungo isolado de *A. aculeata* foi semelhante ao resultado apresentado no estudo supracitado. O que sugere a investigação do metabólito secundário que pode estar envolvido nessa atividade biológica do presente fungo.

Os metabólitos produzidos pelos endófitos estão sendo reconhecidos como um arsenal versátil de agentes antimicrobianos, e alguns endófitos possuem capacidades biossintéticas superiores, devido à sua presumível recombinação de genes com o hospedeiro, enquanto residem e se reproduzem dentro dos tecidos vegetais saudáveis (LI et al., 2005). Dentre os fungos endofíticos estudados, o isolado de *A. aculeata* se mostra como um potencial agente antimicrobiano frente às bactérias Gram positivas.

No que diz respeito à atividade citotóxica dos extratos etanólicos das plantas *P. pyramidalis*, *M. tenuiflora* e *A. aculeata* testados, o único extrato que se mostrou tóxico foi o de *M. tenuiflora* apenas na concentração de 100 µg/mL, já os extratos de acetato de etila dos fungos endofíticos isolados das respectivas espécies vegetais não apresentaram efeitos deletérios frente aos macrófagos J774 nas três concentrações testadas (100, 10 e 1 µg/mL), visualizando-se que quanto menor a concentração da amostra, maior o índice de proliferação celular.

Os macrófagos têm cerca de 10 a 30 µm de diâmetro. Possui núcleo ovoide ou com forma de rim e excêntrico, seu citoplasma apresenta retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, assim como abundância de lisossomos (GARTNER; HIATT, 2007). Dentre as funções desempenhadas pelos macrófagos no processo de cicatrização de feridas, destaca-se a fagocitose, a produção de citocinas, bem como sua atuação estimulando a formação de fibroblastos, a síntese de colágeno e a neoformação vascular (EMING et al, 2007).

Alvin, Miller e Neilan (2014) apontaram que as moléculas produzidas por endófitos são menos propensas a serem tóxicas para os eucariontes, pois não prejudicam o seu hospedeiro (a planta que o abriga), fato este que corrobora com o resultado que foi encontrado no presente estudo. É importante destacar que o extrato fúngico de *A. aculeata* que se mostrou um importante agente antimicrobiano, não apresentou toxicidade, resultado relevante quando se considera uma possível utilização terapêutica.

Entretanto, também é possível que os compostos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos não prejudiquem a planta que os abriga pelo fato de a própria planta produzir esses mesmos compostos bioativos ou compostos similares, e, portanto, tais compostos são bem tolerados pelas mesmas (ALVIN et al., 2014). Pinto et al. (2002) ressalta que as substâncias produzidas por fungos endofíticos podem ser altamente tóxicas, como as micotoxinas, ou ainda, bastante úteis para serem utilizadas como fármacos no tratamento de várias patologias. Esta

dicotomia de funções é consequência da grande diversidade de compostos químicos que os fungos produzem (PINTO et al., 2002).

Penicillium spp. também são relatados como patógenos oportunistas de plantas, e as espécies deste gênero encontram-se amplamente distribuídas, apresentando impactos negativos e positivos. Muitas espécies de *Penicillium* são reconhecidas por produzirem micotoxinas, sendo que as mais importantes encontradas em alimentos são ocratoxina A, pantulina, critinina e citreoviridina (PITT, 2002).

O fungo endofítico *P. implicatum* já foi isolado das plantas *Diphylleia sinensis* (ZENG, 2004) e da planta *Dysosma veitchii*, apresentando atividade antitumoral (YANG, 2003). Outro fungo endofítico do gênero *Penicillium* isolado da planta *Sinopodophyllum hexandrum* também apresentou atividade antitumoral (LI et al., 2007), o que revela a importância desse gênero na inibição de tumores.

No ensaio do MTT com fibroblastos 3T3, os extratos em acetato de etila dos caldos de cultivo fermentado de *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp e do fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata* apresentaram citotoxicidade nas maiores concentrações testadas (100 e 50 µg/mL), e foram atóxicos nas concentrações de 10 e 1 µg/mL, desse modo, a concentração selecionada para realização do Scratch Assay foi de 10 µg/mL, devido a viabilidade celular apresentada pelos extratos nesta concentração.

Os fibroblastos são alongados ou estrelados, possuem longos prolongamentos, núcleo eucromático e um ou dois nucléolos proeminentes, além de serem as células mais comuns no tecido conjuntivo (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). O retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi são bem desenvolvidos, pois sintetizam os componentes da matriz extracelular, como as fibras colágenas, as fibras reticulares, as fibras elásticas e a substância fundamental, bem como produzem fatores de crescimento que controlam a proliferação e a diferenciação celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os testes de citotoxicidade são comumente utilizados (DE AZEVEDO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2006) objetivando simular *in vitro* os processos que ocorrem *in vivo*. Apesar de as células cultivadas não sofrerem as mesmas influências fisiológicas que sofreriam no tecido tegumentar, por exemplo, este método de avaliação preliminar de toxicidade é recomendado. A resposta de diferentes tipos celulares a determinados produtos pode ser investigada neste tipo de abordagem experimental (SCHMALZ, 1994). Sugere-se que as diferenças de toxicidade apresentadas pelas mesmas substâncias quando testadas nos diferentes tipos celulares (macrófagos e fibroblastos) podem ser explicadas pelas diferenças funcionais e estruturais que estas células possuem entre si.

Na atividade cicatrizante *in vitro* foi avaliada a taxa de migração de fibroblastos 3T3 para cicatrização da ferida, o resultado demonstrou que os três extratos testados se comportaram de modo semelhante quando comparados ao controle, apresentando uma atividade cicatrizante positiva. Neste sentido, o extrato do fungo endofítico isolado de *Acrocomia aculeata* foi o único extrato que apresentou uma taxa de migração superior ao controle, sendo este um resultado promissor.

A seleção de fibroblastos no ensaio cicatrizante *in vitro* deve-se ao fato dessas células desempenharem papel essencial no processo de cicatrização de feridas, sendo as principais células envolvidas na cicatrização que tem por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo e a síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Tais células são estimuladas a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (AMADEU et al, 2003).

No campo da indústria farmacêutica, ainda há muito a ser explorado com relação à utilização de micro-organismos endofíticos, pois o fato de serem grandes produtores de substâncias bioativas os torna organismos de grande interesse, principalmente pela possibilidade da descoberta de novos fármacos. Aliado a isso, apresentam como vantagem o baixo custo de produção e a facilidade de manipulação das variáveis de cultivo, a fim de otimizar e viabilizar a produção dos metabólitos secundários em escala industrial (SPECIANA, 2014).

Os próximos anos na busca de micro-organismos endofíticos como fonte de novas moléculas com interesse farmacêutico parecem ser brilhantes. Com o uso de tecnologias mais recentes, equipamentos sofisticados e colaborações entre diferentes áreas de pesquisa, sem dúvida isso será possível, o que eleva exponencialmente as possibilidades de encontrar novos antibióticos e outros metabólitos secundários com potencial biotecnológico.

7. CONCLUSÃO

A partir do presente estudo foi possível concluir:

1. As plantas medicinais *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart, *Poincianella pyramidalis* Tui e *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir abrigam fungos endofíticos com potencial farmacológico;
2. A técnica do microcultivo permitiu a identificação dos fungos endofíticos *Penicillium* sp. isolado de *P. pyramidalis* e *Rhizoctonia* sp. isolado de *Mimosa tenuiflora*. No entanto, não foi possível realizar a identificação taxonômica do fungo endofítico isolados de *A. aculeata*;
3. O extrato de acetato de etila da *A. aculeata* foi o único que apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de referência de *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*, mas nenhum extrato apresentou atividade contra bactérias Gram negativas testadas;
4. No que diz respeito à atividade citotóxica, conclui-se que os extratos de acetato de etila do caldo de fermentação dos fungos endofíticos isolados não apresentaram efeitos deletérios aos macrófagos J774, apresentando-se atóxicos, e as células tratadas com os extratos ainda apresentaram significativa proliferação celular.
5. Os extratos etanólicos das plantas *P. pyramidalis* e *A. aculeata* não apresentaram citotoxicidade significativa frente aos macrófagos J774, entretanto, o extrato etanólico de *M. tenuiflora* apresentou toxicidade frente aos mesmos em uma das concentrações testadas.
6. Os extratos de acetato de etila do caldo de fermentação dos fungos endofíticos isolados apresentaram efeitos deletérios aos fibroblastos 3T3 nas duas mais altas concentrações testadas, e mostraram-se atóxicos nas concentrações mais baixas testadas.
7. Os extratos testados apresentaram atividade cicatrizante *in vitro* positiva;
8. É necessário aplicar técnicas moleculares para a definitiva identificação dos fungos endofíticos isolados, uma vez que o fungo isolado de *A. aculeata* demonstrou importante atividade antibacteriana, mas não foi identificado por técnicas fenotípicas clássicas.

REFERÊNCIAS

- AMADEU, T.P.; COULOMB, B.B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A.M.A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **Int J Low Extrem Wounds**. v. 2, p. 60-68. 2003.
- ALBUQUERQUE U.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **J Ethnopharmacol**. v.114, p. 325–354. 2007.
- ALVES LMM, NOGUEIRA MS, GODOY S, CÁRNIO EC. Pesquisa básica na enfermagem. **Rev Latino-am Enfermagem**. v.12, n.1, p.122-7, 2004.
- ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**. v. 169, n. 7–8, p. 483-495. 2014.
- APNE; CNIP. Planta inteira da Jurema. Disponível em <http://www.cnip.org.br/banco_img/Jurema%20Preta/mimosatenuiflorawilldpoir8.html> Acesso em 14 de fev de 2018.
- ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biol. Rev**. v. 21, p. 51–66. 2007.
- AVERSI-FERREIRA T. A., RIBEIRO P. P., SILVA N. C., et al. Confrontation between ethnopharmacology and scientific results of the herbal medicaments from Brazil to be applied in primary health care. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 7, n. 14, p. 845–856. 2013.
- AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants**. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. Fungi: Multifacetated Microbes. New Dehli: Anamaya Publication. p.189-207. 2006.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. **Micro-organismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais**. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria. Caxias do Sul: Educs, p.269-294. 2002.
- BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**. v.15, n.1, p. 132-139, Mar. 2011.
- BARNEBY, C.R. The genus *Mimosa* (Mimosoideae) in Bahia, Brazil: new taxa and nomenclatural adjustments. **Brittonia**. v. 37, p. 125-153. 1985.
- BARNEBY, C.R. *Sensitivae Censitae*. A description of the genus *Mimosa* L. (Mimosaceae) in the New World. **Mem. New York Bot. Gard**. v. 65, p. 821-835. 1991.
- BARROS, B. S.; SILVA, J. S.; FERRO, J. N. de S.; AGRA, I. K. R.; BRITO, F. A.; ALBUQUERQUE, E. D.; CAETANO, L. C.; BARRETO, E. Methanol extract from

mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **J. Nat. Med.** v.65, p. 526–531, 2011.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-22, 2003.

BENBOW, M. Wound swabs and chronic wounds. **Practice Nurse**. v. 39, n. 9, p. 27–30. 2010.

BENTHAM, G. Notes on Mimoseae, with a short synopsis of species. **J. Bot.** v..4, p. 243-392. 1841.

BENTHAM, G. Revision of the suborder Mimoseae. **Trans. Linn. Society** London 30:335-664. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-3642.1875.tb00005.x>. 1875.

BENTHAM, G. **Leguminosae-Mimosoideae**. In Flora Brasiliensis (C.F.P. Martius, A.W. Eichler & I. Urban, eds.). Munchen, Wein, Leipzig, v.2, p.456-458. 1876.

BEZERRA, D. A. C. et al . Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa , v. 19, n. 4, p. 814-817, 2009.

BEZERRA, W. K. T et al. O uso de fitoterapia com ação anti-inflamatória que atuam no sistema gênito-urinário. **INTESA**, Pombal, v.8, n.1, p.24-36, jan./dez.2014. Disponível em:<<http://gvaa.org.br/revista/index.php/INTESA/article/view/3027/2525>>. Acesso em: 02. fev. 2018.

BIASI-GARBIN, Renata Perugini et al . Antifungal potential of plant species from Brazilian Caatinga against dermatophytes. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 58, 18, 2016.

BORGES-DOS-SANTOS RR, Biological effect of leaf aqueous extract of *Caesalpinia pyramidalis* in goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Evid Based Complement Alternat Med**. Article ID 510391, 6 pages, 2012.

BOWLER, P.G.; DUERDEN, I.; ARMSTRONG, D.G. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. **Clin Microbiol Rev**. v. 14, n. 2, p. 244–269. 2001.

BRATZLER DW, HUNT DR. The surgical infection prevention and surgical care improvement projects: national initiatives to improve outcomes for patients having surgery. **Clin Infect Dis**. v. 43; p. 322- 330. 2006.

BURKART, A. Las especies de Mimosa de la flora Argentina. **Darwiniana**. v. 8, p. 9-231. 1948.

CALDAS PINTO, M.S.; BORGES CAVALCANTE, M. A.; MEIRA DE ANDRADE, M.V. Potencial forrageiro da caatinga, fenologia, métodos de avaliação da área foliar e o efeito do déficit hídrico sobre o crescimento de plantas. **Rev Electr Vet** v. 7, p. 1-10. 2006.

CAMPOS, F.F.; JUNIOR, P.A.S.; ROMANHA, A.J. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 110, n. 1, p. 65–74. 2015.

CARNEIRO, M.I.S., RIBAS FILHO J.M., MALAFAIA O., et al. Estudo comparativo do uso de extrato de *Pfaffia glomerata* e do laser de baixa potência (hélio-neônio) na cicatrização de feridas em ratos. **ABCD - Arq Bras Cir Dig**; v.23, n.3, p.163-167, 2010.

CARTAXO SL, Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol**. v.131, p. 326–342. 2010.

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Médica**, v.48, n.2, p.219-237, 2010.

CARVALHO, E. S. S. **Como cuidar de pessoas com feridas: Desafios para a prática multiprofissional**. Salvador: Atualiza Editora, 2012.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem Toxicol**. v. 44, n. 3, p. 388-392. 2006.

CHRISTOPHER E. **Kinetic aspects of epidermal healing**. In: Maibach H, Rovee D. eds. *Epidermal wound healing*. St Louis: Mosby., 1972.

CLSI, **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement**. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COLTRO, Pedro Soler et al . Atuação da cirurgia plástica no tratamento de feridas complexas. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro , v. 38, n. 6, Dec. 2011.

CORY, G. **Scratch-wound assay. Cell migration: developmental Methods and Protocols**. Springer Science and Business Media. v.769, p. 25-30, 2011.

COSTA, K.S.; RODRIGUES, A.P.B.; SILVA, A.G.; FEITOSA, M.S.L. Atuação do enfermeiro na assistência aos pacientes portadores de feridas. **Revista Interdisciplinar UNINOVAFAPI**, Teresina. v.5, n.3, p.9-14. 2012.

COSTELLOE, C.; METCALFE, C.; LOVERING, A., MANT, D.; D HAY, A. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **BMJ**. 2010.

CRUZ, M.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **J Ethnopharmacol**. v.111, p. 409–412. 2007.

CUTTING, K.F. Addressing the challenge of wound cleansing in the modern era. **Br J Nurs (Tissue Viability Supplement)**. v. 19, n. 11, p. S24–S29. 2010.

DEALEY, C. **Tratamento de feridas: um guia para os enfermeiros**. Clipsepsi, 266p Lisboa, 2006.

DE AZEVEDO, C.L.; MARQUES, M.M.; BOMBANA, A.C. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an in vitro analysis. **Pesqui Odontol Bras.** v. 17, n. 2, p. 113-118. 2003.

DE BARY, A. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten**. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany, Volume II (Leipzig, Germany: Engelmann). 1866.

DECLAIR V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoleico. **J Bras Med.** v.82, n.6. p. 3-7, jun. 2002.

DE HOOG, G.S. et al. **Atlas of clinical fungi**. Utrech: Centraalbureau voor schimmelcultures, 2000. 1126p.

DE STEFANO, S.; NICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 52, p. 1399-1401, 1999.

DOBRANIC, J. K.; JOHNSON, J. A. & ALIKHAN, Q. R. Isolation of endophytic fungi from eastern larch (*Larix laricina*) leaves fom New Brunswick, Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 194-198, 1995.

DOMSCH, K. H; GAMS, W. & TRAUTE-HEIDI, A. **Compendium of Soil Fungi**. APS Press, New York. v. 1, 859p. 1980.

DONATI, Irene. Enzimi, acidi organici ed altri metaboliti coinvolti nella patogenesi di *Penicillium* spp. Università di Bologna. 2008.

DOURADO, D. A. O.; CONCEICAO, A. S.; SANTOS-SILVA, J. O gênero *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 225-240, 2013.

EMING SA, KRIEG T, DAVIDSON JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol.** v. 127, p. 514–521. 2007.

FENILLE, R.C. **Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado à soja no Brasil**. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Botucatu. 152 p. 2001.

FERREIRA E, LUCAS R, ROSSI LA, ANDRADE D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Rev Esc Enferm USP.** v.37, n.1, p.44-51. 2003.

- FORZZA, R.C. et al. **Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128482>>. Acesso em: 02 Fev. 2018.
- FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.2, p. 201-8, 2008.
- FREEMAN, E.M. The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel. **Phil. Trans. R. Soc. B.** v. 196, p. 1–27. 1904.
- GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**. v. 49, p. 142 – 151. 2009.
- GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P.; Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*:Meliaceae). **Biotropica**, v. 33, p. 352-360. 2001.
- GANEN, S. R (org.) **Conservação da biodiversidade: legislação e políticas públicas**. Brasília: Câmara dos Deputados, Edições Câmara, (Série memória e análise de leis; n. 2). 437 p. 2010.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 128, 2007.
- GIULIETTI AM, et al. **Espécies endêmicas da caatinga**. In: SAMPAIO EVSB, GIULIETTI AM, VIRGÍNIO J, GAMARRA-ROJAS CFL, editores. *Vegetação e flora da caatinga*. Recife: Associação de Plantas do Nordeste; 2002.
- GOLINSKA, P.; WYPIJ, M.; AGARKAR, G.; RATHOD, D.; DAHM, H.; RAI, M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Anton Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 2, p. 267-289. 2015.
- GOMES, E. C. de S. et al. Plantas da Caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 2, 2008.
- GONÇALVES, B.; BASTOS, E.; HANNA, S. Prospecção tecnológica de fungos endófitos e aplicações na indústria farmacêutica. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 56-67, 2017.
- GONÇALVES, F. J. T., FREIRE, F. D. C. O., LIMA, J. S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essential**, v.15, n.1, p.71-92, 2013.
- GONZÁLEZ, A.C.O. et al. Wound healing – a literature review. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 5, p. 614-620. 2016.
- GOSAIN, A, DIPIETRO LA. Aging and wound healing. **World J Surg**. v. 28, p. 321-326, 2004.

GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA. **Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia**, 1^a. ed., p. 334, 1979.

GUERIN, P. Sur la presence d'un champignon dans l'ivraie. **J. Botanique**. v. 12, p. 230–238. 1898.

GUIJARRO, B.; MELGAREJO, R.; TORRES, P.; LAMARCA, N.; USALL, J.; DE CAL, A. *Penicillium frequentans* population dynamics on peach fruits after its applications against brown rot in orchards. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 659–671, 2008.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, S; DIPIETRO, LA. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**. v. 89, n.3, p. 219-229, 2010.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORK, H.; SUN, M. Endophytic fungi from *Nerium oleander* (Apocynaceae): main constituents and antioxidante activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23. p. 1253-1263. 2007.

INTERNATIONAL LEGUME DATABASE & INFORMATION SERVICE. 2018. Disponível em: <<http://www.ildis.org/>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

ISERHARD, A.R.M.; BUDÓ, M.L.D.; NEVES, E.T., BADKE, M.R. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Esc Anna Nery**. v.13, n.1, p.116-22, Jan-Mar, 2009.

JIANG, Y. L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C.; TEULON, J. M.; GUECHOT, C.; HAAG-BERRURIER, M. AND ANTON, R. Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2357-2360. 1991.

JIANG, Y. L.; WENIGER, B.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R.; BECK, J. P. AND ITALIANO, L. Effects of Saponins from *Mimosa tenuiflora* on Lymphoma Cells and Lymphocytes. **Phytoter Res**, v. 6, p. 310-313. 1992.

JOUDA, J.B., KUSARI, S., LAMSHÖFT, M., TALONTSI, F.M., MELI, C.D., WANDJI, J. and SPITELLER, M. Penialidins A-C with strong antibacterial activities from *Penicillium* sp., an endophytic fungus harboring leaves of *Garcinia nobilis*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 209-214. 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 90. 2013.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. ROBBINS E COTRAN – **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7a ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

KUSARI, S.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. **J. Nat. Prod.** v. 74, p. 764–775. 2011.

KUSARI, S.; VERMA, V.C.; LAMSHOEFT, M.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p. 1287-1294. 2012a.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chem. Biol.**, v. 19, p. 792-798. 2012b.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 159-162, 2008.

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug Discovery. **Trends in Microbiology**. v. 15. n. 6. p. 279-289. 2007.

LANES, É.C.M.; MOTOIKE, S.Y.; KUKI, K.N.; NICK, C., FREITAS, R.D. Molecular characterization and population structure of the macaw palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), ex situ germplasm collection using microsatellites markers. **J Hered.** v. 106 p. 102–112. 2015.

LARENA, P.; SABUQUILLO, P.; MELGAREJO, A.; DE CAL, J. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* Wilt of Tomato by *Penicillium oxalicum* under Greenhouse and Field Conditions. **Phytopathology**, Lancaster v. 151, p. 507-512, 2003.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.; BARROS, M.L.B. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife : Ed. Universitária da UFPE, 2003. 822 p.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A. & LOCK, J. M. 2005. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, 592p.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin. Dermatol.**, v.25, p 9-18, 2007.

LI, Y.; SONG, Y. C.; LIU, J. Y.; MA, Y. M.; TAN, R. X. Anti-helicobacter pylori substances from endophytic fungal cultures. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, p.553-558, 2005.

LIANG, C-C; ANN Y PARK, A.Y.; JUN-LIN GUAN, J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**. V. 2, p. 329–333. 2007.

LIN, X.; LU, C.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.23, p.1037-1040, 2007.

LINNAEUS, C. 1753. **Mimosa**. In *Species plantarum* (C. Linnaeus, org). Imprensus Laurentii Salvii, Paris, p.516-523.

LOIOLA, M. I. B.; PATERNO, G. B. de C.; DINIZ, J. A.; CALADO, J. F.; OLIVEIRA, A. C. P. de. Leguminosas e seu potencial de uso em comunidades rurais de São Miguel do Gostoso – RN. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, 2010.

LORENZI, G.M.A.C. **Acrocomia Aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: Bases para o Extrativismo Sustentável**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas**. Nova Odessa: Editora Plantarum, p. 1-20. 1996.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 352 p. 1992.

MACHADO, M.A.B.L. **Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae)**, Tese (Doutorado), Universidade Federal de Alagoas, 126 p. 2009.

MACHAVARIANI, N.G.; TEREKHOVA, L.P. Biologically active compounds produced by microbial endophytes. **Antibiot Khimioter.** v. 59, n. 5-6, p. 26-33. 2014.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – **Parte 1. An Bras de Dermatol.** Rio de Janeiro, RJ. v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MACHAVARIANI, N.G.; IVANKOVA, T.D.; SINEVA, O.N.; TEREKHOVA, L.P. Isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants of the Moscow region, Russia. **World Appl Sci J.** v. 30, n. 11, p. 1599–1604. 2014.

MAIA G.N. **Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo D&Z Computação Gráfica e Editora. p.237-246. 2004.

MANI, V.M.; SOUNDARI, A.P.; KARTHIYAINI, D.; PREETH, K. Bioprospecting endophytic fungi and their metabolites from medicinal tree *Aegle marmelos* in Western Ghats, **India Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 303-310. 2015.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology.** v. 134. p. 1–17. 2017.

- MATHIEU D, LINKE J-C, WATTEL F. **Non-healing wounds**. In: Handbook on hyperbaric medicine, Mathieu DE, editor. Netherlands: Springer, p. 401-427, 2006.
- MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. AND MARTINEZ, M. (1990c), Efecto producido por la fracción de alcaloides de Mimosa tenuiflora (tepescohuite) sobre el reflejo peristáltico del ileón del cobayo. **Archivos de Investigación Médica**, v. 21, p. 171-174. 1990.
- MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; MARLES, R.J.; SOUCY BREAU. C.; SEM, A.; ARNASON, J.T. N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in Mimosa tenuiflora Bark (Tepescohuite). **Arch Inv Med**. v. 2, p. 175-177. 1990b.
- MING, L. C.; FERREIRA, M. I.; GONÇALVES, G. G. Pesquisas agronômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, Brasil, v.14, n. Esp., p.131-137, 2012.
- MMBAGA, M.T.; SAUVE, R.J.; MREMA, F.A. Identification of microorganisms for biological control of powdery mildew in Cornus florida. **Biological Control**, Orlando, v. 44, p. 67-72, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v.65, p. 55-63, 1983.
- MOTOYKE, S. Y.; NACIF, A. P.; PAES, J. M. V. Macaúba: história do nascimento de uma cultura. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, p. 6, 2011.
- MOTOYKE, S.Y.; CARVALHO, M.; PIMENTEL, L. D.; KUKI, K. N.; PAES, J. M. V.; DIAS, H. C. T.; SATO, A. Y. **A cultura da macaúba**. Viçosa, MG: Editora da UFV, 2013.
- MUSSI-DIAS, V et al. Endophytic fungi associated with medicinal plants. **Rev. bras. plantas med. [online]**. vol.14, n.2, p.261-266. 2012.
- NETO J.C.L. **Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos em 2003**. Online. Disponível em: <<http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf>> Acesso em 19 de jan de 2018.
- NEUTZLING, I. et al. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro... E o mais frágil. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**. n. 389, 2012.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J. Nat. Prod**. v. 70, n. 3, p. 461-477. 2007.
- NICOLETTI, R.; BUOMMINO, E.; DE FILIPPIS, A.; LOPEZ-GRESA, M.P.; MANZO, E; CARELLA, A.; PETRAZZUOLO, M.; TUFANO, M.A. Bioprospecting for antagonistic Penicillium strains as a resource of new antitumor compounds. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 189-195, 2008.

NICOLETTI, R.; FIORENTINO, A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatophyta. **Agriculture**, Canada, v. 5, p. 918-970, 2015.

NIELSEN, I.C. **Mimosaceae (Leguminosae - Mimosoideae)**. Flora Malesiana. Vol. 11, Part 1. Rijksherbarium, Leiden. 1992.

OLIVEIRA, A. F. **Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, 2008.

OLIVEIRA, S.H.S., SOARES, M.J.G.O., ROCHA, P.S. Uso de cobertura com colágeno e Aloe vera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Rev esc enferm. USP**. v.44, n.2, p. 346-351, 2010.

OLIVEIRA RC, List of Angiosperm species of the riparian vegetation of the Apodi-Mossoró river, Rio Grande do Norte, Brazil. **Check List**. v. 9, p. 740–751. 2013.

ONIONS, A. H. S.; BRADY, B. L. **Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium***. p. 1-36. In: J. F. Pederdy (ed.), *Penicillium and Acremonium*. University of Nottingham. Nottingham, England. 1987.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 55-56. 2008.

PAGANELA J.C., RIBAS L.M., SANTOS C.A., FEIJÓ L.S., NOGUEIRA C.E.W. & FERNANDES C.G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **RPCV**. v.104, n.569-572, p.13-18, 2009.

PALERMO, E.; KADUNC, B.; ADDOR, F.; METSAVAHT, L.; RABELLO, L.; MATTOS, R.; MARTINS, S. **Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiaatria e laser**. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Rio de Janeiro. Elsevier. 2012.

PAMPFILE, J. A.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351. 2014.

PARMETER, J.R.; WHITNEY, H.S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMENTER, J.R. (Ed.) **Rhizoctonia solani: biology and pathology**. London: University of California. 1970.

PASSOS M. A. B., MENDONÇA M. S. Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em três fases de desenvolvimento. **Acta Amazonica**. v. 36, n. 4, p. 431–436. 2006.

PAUL, N. C. et al. Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 15, n. 9, p. 15272-15286, 2014.

- PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1-68. 1997.
- PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J.; TANDRON-MOYA, Y. A. Metabolites Produced by the Phytopathogenic Fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, Chemical Structure Determination, Syntheses and Bioactivity. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60c, p. 717-722, 2005.
- PEREIRA, A. V. et al., Análise da atividade antimicrobiana de taninos totais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro. **Agropecuária Técnica**. v. 36, n. 1, p. 109-114. 2015.
- PEREIRA, V. M. **Diversidade, riqueza e composição dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* de solos do quadrilátero ferrífero**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras. Lavras: UFLA, 222 p. 2016.
- PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa phytopathology**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 45-61. 2002.
- PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISC, 197 p. 2000.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 540 p. 1997.
- PROMPUTTHA, R.; JEEWON, S.; LUMYONG, E.H.C.; MCKENZIE, K.D.; HYDE. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). **Fungal Divers.**, v. 20., p. 167-186. 2005.
- PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T. QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1717-1719, 2005a.
- PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2005b.
- QUEIROZ et al. **Leguminosae**. In: GIULIETTI et al. (Orgs.). *Plantas raras do Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. p. 212-237.
- QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

- RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M.; HIANE, P.A.; NETO, J.A.B. Qualidade nutricional da polpa da bociúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Sci. Technol. Alim.** v. 28, p. 90-94. 2008.
- REIS, S.D.S; OLIVEIRA, R.S.; MARCELINO, S.A.C.; MACÊDO, J.T.S.; RIET-CORREIA, F.; PIMENTEL, L.A.; PEDROSO, P.M.O. Congenital malformations and other reproductive losses in goats due to poisoning by *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz (= *Caesalpinia pyramidalis* Tul.). **Toxicon**, v. 118, p. 91-94. 2016.
- REYES-GARCÍA, V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: Theoretical and methodological contributions. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** v. 6, n. 32. 2010.
- RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 1, n. 42, p. 265-270, 1950.
- RIVERA-ARCE, E.; GATTUSO, M.; ALVARADO, R.; ZÁRATE, E.; AGÜERO, J.; FERIA, I.; LOZOYA, X. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **J Ethnopharmacol** v.113, p. 400-408. 2007.
- RIVERA, K. G.; SEIFERT, K. A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 139-158, 2011.
- RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**. v. 111, p. 877-892, 2011.
- RODRIGUEZ, R.J; WHITE JR., J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytol.**, v.182, p. 314-330. 2009.
- ROMLING, U; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**. p. 541-561, 2012.
- RYAN RP, GERMAINE K, FRANKS A, RYAN DJ, DOWLING DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**. v. 278, p. 1–9. 2008.
- SAAED, M. A.; SABIR, A. W. ; Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia**, v. 72, p. 807. 2001.
- SABUQUILLO, P.; DE CAL, P.; ELGAREJO, M.A. Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 37, p. 256-265, 2006.
- SAMSON, R. A; FRISVAD, J. C. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-174, 2004.

SANTANA DG, Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **J Ethnopharmacol.** v. 142, p. 445–455. 2012.

SANTOS, A. S. **Estudo químico e da atividade antimicrobiana da macaúba [(*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. 1763)] e dos seus endofíticos.** Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas. 74 p. 2015.

SARAIVA AM, Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. **Braz J Pharmac Sci.** v. 48, p. 147–154. 2012.

SARANDY M.M. **Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) em ratos wistar.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 49p, 2007.

SCHMALZ G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. **J Dent.** v. 22, n 2, p. 6-11. 1994.

SEN CK, GORDILLO GM, ROY S, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair Regen.** v. 17. p.763-771. 2009.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World J. Microbiol. Biotechnol.,** v.22, p.1185-1195, 2006.

SILVA, M.H.S. **Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 110 p. 2017.

SILVA, R.C.L., FIGUEIREDO, I.B.M., MEIRELES, I.B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem.** São Caetano do Sul: Yendis; 2007.

SILVA, P.V.B.S. **Caracterização Química e avaliação do Potencial antidiabético e Citotóxico de Óleo Extraído de *Acrocomia aculeata* (macaúba).** Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados. 2012.

SNEH, B., BURPEE, L., OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species.** Saint Paul: American Phytopathological Society, 133p. 1991.

SPECIANA, V.; ORLANDELLIA, R.C.; FELBERA, A.C.; AZEVEDOA, J.L.; PAMPHILEA, J.A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** 2014;16(4):345-51.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, 260, 214-216, 1993.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxolproducing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*, **J. Nat. Prod.** v. 58, p. 1315-1324. 1995.

STROBEL G. A.; HESS W. M.; FORD E.; SIDHU R. S.; YANG X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

STROBEL, G. A.; DAISY, Y. B. Bioprospecting for microbial Endophytes and their Natural Products. **American Society of Microbiology News**, United States, v. 67, p. 491-502, 2003.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TEJESVI, M.V.; NALINI, M.S.; MAHESH, B. et al. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**. v. 1, n. 1, p. 19-26. 2007.

THEORET, C. L. The pathophysiology of wound repair. **Veterinary Clinical North Equine Practice**, v.21, p.1-13, 2005.

TODARO, G.J. et al. The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. **J. Cell Physiol.** v. 66, p. 325–333. 1965.

UZMA, F; KONAPPA, N.M.; CHOWDAPPA, S. Diversity and extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from medicinal plants of Western Ghats, Karnataka. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 3, n. 4, p. 335-342. 2016.

VALA SCIENCE INC. Disponível em <<http://www.valasciences.com/services/migration-wound-healing>>. Acesso em 21 de dezembro de 2017.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R.N.; GANGE, A.C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microb. Ecol.**, v. 57, n. 4, p. 749-756. 2009.

VERPOORTE R, VAN DER HEIJDEN R, MEMELINK J. Review Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Res.** v. 9, n. 4-5, p. 323-343. 2000.

VISAGIE, C.M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

YANG, X., GUO, S., ZHANG, L., AND SHAO, H. Select of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. **Nat. Prod. Res. Dev.** v. 5, p. 419–422. 2003.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v. 35, p. 79-81, 2004.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.

WANG, L.W.; ZHANG, Y.L.; LIN, F.C.; HU, Y.Z.; ZHANG, C.L. Natural Products with Antitumor Activity from Endophytic Fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1056-1074. 2011.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, p. 274-276. 1995.

WULANSARI, D.; JAMAL, Y. ANDRIA AGUSTA, P. Pachybasin, a Major Metabolite from Culture Broth of Endophytic Coelomyceteous AFKR-18 Fungus isolated from a Yellow Moonshed Plant, *Arcangelisia flava* (L.) Merr. **HAYATI Journal of Biosciences**. v. 21, n. 2, p. 95-100. 2014.

WYSOCKI, AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. **AACN Clin Issue**, v. 13, n. 3, p. 382-397, 2002.

ZENG, S., SHAO, H., AND ZHANG, L. An endophytic fungus producing a substance analogous to podophyllotoxin isolated from *Diphylleia sinensis*. **J. Microbiol.** v. 24, p. 1–2. 2004.

ZENG, S.R.; XU, Q.W.; YE, B.T.; KE, Y.; FANG, B.Y.; HUANG, X.M. Isolating of Endophytic Fungi from Five Medicinal Plants and Screening of Their Antibacterial Activities. **Journal of Fungal Research**, Hong Kong, v. 3, p. 24-26, 2005.

ZHAO, J.L.; CAI, X.Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; ZHOU, L.G. Endophytic fungi from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and their antibacterial activity. **Journal of Biotechnology**. v. 136S, p. 607–619. 2008.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Prod. Rep.**, v. 23, n. 5, p. 753-771. 2006.

ANEXO I



**INSTITUTO DO
MEIO AMBIENTE**
ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE
E DOS RECURSOS HÍDRICOS

Herbário MAC

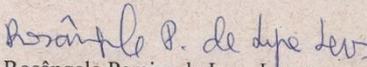
DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que as amostras das plantas utilizadas na pesquisa de **Joice Fragoso da Silva Oliveira**, aluna do Mestrado em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, foram depositadas no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, e trata-se de:

Reg. MAC	Nº Col.	Família	Espécie	Det.
63736	05	Fabaceae	<i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz	R.P. Lyra-Lemos
63740	11	Fabaceae	<i>Acacia bahiensis</i> Benth.	R.P. Lyra-Lemos
63737	14	Fabaceae	<i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz	R.P. Lyra-Lemos
63738	16	Fabaceae	<i>Anadenanthera</i> sp.	R.P. Lyra-Lemos
63741	17	Fabaceae	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	R.P. Lyra-Lemos
63742	18	Anacardiaceae	<i>Myracrodruo nurundeuva</i> Allemão	R.P. Lyra-Lemos
63739	27	Fabaceae	<i>Senna siamea</i> (Lam.) H.S. Irwin & Barneby	R.P. Lyra-Lemos

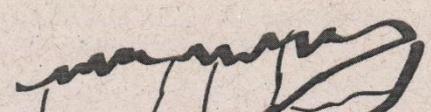
OBS: Recomenda-se a citação, no corpo do trabalho, que a identificação do material estudado foi efetuada pelos pesquisadores do Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente.

Maceió, 24 de Maio de 2017.



Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do Herbário MAC

Rosângela P. Lyra Lemos
Curadora do Herbario Mac
IMA-AL



www.ima.al.gov.br
82 3315-1737 / 1738 - FAX 82 3315-1734
Av. Major Olímpio de Sá, 100 - Maceió, AL - 57072-900

