



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO
DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA
NATUREZA**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –
ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE**

**ESTRUTURAÇÃO DA COLEÇÃO DE CULTURA DE FUNGOS FILAMENTOSOS
DA UNILA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS**

GESSYCA FERNANDA DA SILVA

**Foz do Iguaçu
2017**

**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**ESTRUTURAÇÃO DA COLEÇÃO DE CULTURA DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA
UNILA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS**

GESSYCA FERNANDA DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Rafaella Costa Bonugli Santos
Coorientador: Prof. Dr. Michel R. Z. Passarini

Foz do Iguaçu
2017

GESSYCA FERNANDA DA SILVA

**ESTRUTURAÇÃO DA COLEÇÃO DE CULTURA DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA
UNILA E AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr^a Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Coorientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA

Prof. Dr^a Júlia Ronzella Ottoni
UDC

Prof. Msc. Caroline Henn
ITAIPU Binacional

Foz do Iguaçu, _____ de _____ de _____.

Dedico a minha mãe, a mulher mais forte,
batalhadora e amorosa que eu conheço.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a minha mãe, porque ela sempre acreditou no meu potencial, sempre me apoiou e fez de tudo para que eu conseguisse chegar aonde eu cheguei. Mãe você e meus irmãos (Jonathan e Jennifer) são as pessoas mais importantes pra mim. Obrigada por toda ajuda e força sempre.

Também gostaria de agradecer aos professores Rafaella e Michel pelas orientações, sem vocês esse trabalho não teria sido concretizado com a qualidade que ele se encontra.

Aos professores que compõe o curso de Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade, pelo o aprendizado e paciência, é acho que agora me formo.

A Caroline Henn, minha supervisora de estágio, que sempre deixou trabalhar no meu TCC e estudar pras provas. Muito obrigada!

Ao pessoal do DELABEN não tenho nem o que falar pessoas boníssimas, sempre dispostas a ajudar. Gilson sempre tão prestativo me ajudou muito no início onde eu estava mais perdido que cego em tiroteio. Fernando obrigado por aguentar meus desabafos e tirar as fotos pra mim no Transiluminador, e sempre vir com suas frases filosóficas, e as brincadeiras e o café da tarde de todo dia.

Ao Alejandro por ter feito a base de dados. Queridinho foi de muita ajuda para a organização do meu trabalho, vou ser eternamente grata por você, e prometo que algum dia eu aprendo todos esses trem tecnológicos.

Jannie mesmo estando longe me dando apoio e me ajudando em algumas correções do TCC. Sabe né ainda temos que juntar pra tomar aquela cerveja, com *jukebox* tocando Juliana e a gente filosofando sobre a vida.

Flávia (elfo doméstico) por me ajudar no laboratório, lavando as placas, muitas placas, e nos dias de sofrimento nós íamos tomar alguma coisa com teor alcoólico, pra minimizar o estresse. Não deu pra fazer a faixa, mas acho que isso aqui já vale!

Aos amigos de longa data (Glenda, Gionei, Ademir, Beatriz, Gustavo, Malu) por sempre juntarmos para fazer gordisses e beber também, porque ninguém é de ferro. Samu, também nem tenho o que falar!! Obrigada por sempre me chamar por rolé, pelas conversas, as zueiras e as cervejas.

Enfim obrigada a todos!

Géssyca Fernanda da Silva.

*Se você está atravessando o inferno, não pare de
atravessar.*

Winston Churchill

SILVA, Géssyca Fernanda. **Estruturação Da Coleção De Cultura De Fungos Filamentosos Da Unila E Avaliação Da Produção De Antimicrobianos**. 2017. 41. Trabalho de Conclusão de Curso Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.

RESUMO

O processo de preservação de seres vivos ou de suas partes, conhecido como coleção de cultura tem como intuito promover a conservação do material biológico *ex situ* e na microbiologia permite a utilização para diversas pesquisas, como a busca por substâncias bioativas. Os fungos filamentosos apresentam um grande potencial para a produção de metabólitos secundários e são de grande interesse biotecnológico industrial e farmacológico. Atualmente, como há um aumento na resistência de algumas espécies patogênicas à antibióticos, e como alguns dos metabólitos secundário mais importantes produzidos por fungos são os antimicrobianos, estudos aprofundados sobre novas alternativas de origem natural fazem necessários. O presente trabalho teve como objetivo a estruturação da Coleção de Fungos da Universidade Federal da Integração Latino – Americana e sua organização através de um banco de dados criado a partir do *software* MICROSOFT OFFICE ACCESS (2007). Também foram realizados ensaios para detecção de possível atividade antimicrobiana pelo método de difusão de disco em ágar. A coleção de fungos atualmente conta com 371 fungos isolados do Parque Nacional do Iguaçu e, a fim de manter a integridade genética e as características fisiológicas e morfológicas os fungos foram preservados por dois métodos, *Castellani* e Criopreservação (-20°C e -80°C). Para os testes antimicrobianos, 12 isolados foram avaliados em relação às bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Os isolados 3IG3.5 e 3IG3.7 apresentaram halo de inibição contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e futuramente em estudos mais aprofundados serão avaliados quanto ao potencial apresentado neste trabalho. Levando em consideração que apenas 12 fungos foram avaliados, o estudo mostra o grande potencial biotecnológico da microbiota do Parque Nacional do Iguaçu. Em adição, o trabalho foi de extrema importância para montagem e organização do acervo evitando perdas de isolados ou informações importantes para os estudos futuros.

Palavras-chave: Preservação. Fungos. Metabólitos secundários. Antimicrobianos. Biotecnologia.

SILVA, Géssyca Fernanda. **Structuring Of UNILA Fungi Culture Collection And Antimicrobials Evaluation of Antimicrobials Production** 2017. 41. Trabalho de Conclusão de Curso Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2017.

ABSTRACT

The preservation of organisms in culture collection promotes the conservation of biological material *ex situ* and in microbiology allows the use in several researches such as those ones looking for bioactive substances. Filamentous fungi show great potential for production of secondary metabolites with a large biotechnological application. Nowadays, there is an increase in antibiotic resistance in some pathogenic species, and once some of the most important secondary metabolites produced by fungi are compounds with antimicrobial activity, the search for new compounds is strains. The aim of this work was to structure the Culture Collection of Fungi of the Federal University of Latin American Integration by fungi preservation and its organization in a database created from the software MICROSOFT OFFICE ACCESS (2007). To evaluate the biotechnological potential for antimicrobial production in disk-diffusion method was employed. The culture collection of fungi has 371, isolated from the Iguaçu National Park, and in order to maintain the genetic integrity and the physiological and morphological traits, the fungi were preserved in two different methods, *Castellani* and Cryopreservation (-20 °C and -80 °C). To antimicrobial activity tests, 12 isolates were evaluated regarding their growth inhibition capacity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively. Isolates 3IG3.5 and 3IG3.7 showed inhibition halo to *Staphylococcus aureus* and will be evaluated in the future, providing knowledge of the potential presented in this work. Considering that only 12 fungi were evaluated, this study indicates the great biotechnological potential of Iguaçu National Park microbiota. In addition, the work was important to culture the collection organization, preventing loss of isolates, genetic alterations or sample collection information.

Keywords: Preservation. Fungi. Secondary metabolites. Antimicrobials. Biotechnology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 FUNGOS FILAMENTOSOS	14
2.2 COLEÇÕES DE CULTURA MICROBIANA E CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS (BRCS).....	15
2.3 PRESERVAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	18
2.3.1 Preservação de Curto Prazo.....	18
2.3.2 Preservação de Médio Prazo	18
2.3.2.1 Método de <i>Castellani</i>	18
2.3.2.2 Método do óleo mineral	19
2.3.2.3 Método de congelamento	19
2.3.3 Preservação de Longo Prazo	19
2.3.3.1 Método de criopreservação	19
2.3.3.2 Método de liofilização.....	20
2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	20
2.5 ANTIBIÓTICOS E COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	23
3 OJETIVOS	26
4 METODOLOGIA	27
4.1. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	27
4.2. ORGANIZAÇÃO DO ACERVO	27
4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 COLEÇÃO DE FUNGOS E ORGANIZAÇÃO DO ARCEVO.....	30
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Materiais biológicos como plantas, insetos e micro-organismos têm sido preservados e armazenados em coleções biológicas como coleções de culturas microbianas, bancos de sementes e repositórios de tecidos e células humanas e animais (VAZOLLER & CANHOS, 2005). Coleção biológica é a preservação de um conjunto de organismos ou de suas partes fora de seu ambiente natural em Centros de Recursos Biológicos (BRCs) que servem como repositórios para pesquisa e podem auxiliar em diversas atividades de ensino (ARANDA, 2014).

Na microbiologia a correta preservação das culturas, com suas características inalteradas, possibilita o acesso à informação biológica para diversos estudos, uma vez que permite a disponibilidade da cepa, em condições viáveis, a qualquer momento. Para a biotecnologia, essa característica representa uma das grandes vantagens da microbiologia clássica. Na coleção de cultura, além da preservação do micro-organismo, as informações e os dados do material são organizados para fornecer a procedência, a identificação taxonômica dos espécimes e o maior número de detalhes possíveis que serão importantes na pesquisa científica (OECD, 2001).

A partir de uma coleção de cultura novas linhagens podem ser avaliadas quanto à taxonomia, atividade biológica e biotecnológica, tornando-se uma grande fonte de recursos biológicos. Fungos e bactérias são conhecidos recursos para a biotecnologia e os fungos em especial, são muito investigados principalmente pela grande versatilidade metabólica, com grande produção de compostos bioativos como ácidos orgânicos, antioxidantes, ácidos graxos, polissacarídeos, enzimas, reguladores de crescimento de plantas, alcalóides, pigmentos, micotoxinas e antibióticos (EL-ENSHASY, 2007).

Na década de 70, houve a grande descoberta de inúmeras substâncias com ação antimicrobiana, e de novas classes de antibióticos como os β -lactâmicos, cefalosporinas, macrolídeos, tetraciclina e amino-glicosídeos, expandindo, assim o uso destes compostos. O êxito foi tão grande que na década de 80 acreditava-se existir medicamentos para controle de todas as doenças infecciosas, diminuindo o interesse em pesquisas de novos antimicrobianos (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Contudo, para muitos antibióticos, incluindo a penicilina, (o primeiro antibiótico conhecido produzido por fungos, ainda hoje utilizado para tratamento e prevenção de doenças infecciosas devido a sua eficiência e baixo custo) devido o seu uso indiscriminado, já existem cepas bacterianas cada vez mais resistentes. Há também o aparecimento de efeitos colaterais, um problema que deve ser levado em consideração para o aprimoramento de métodos para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (GRUMACH *et al.*, 2007; FERREIA *et al.*, 2008).

Neste sentido o presente trabalho teve como objetivo a estruturação da coleção de fungos filamentosos da Universidade Federal da Integração Americana (UNILA) através da preservação de linhagens fúngicas já isoladas em outros projetos do grupo de pesquisa da Prof.^a Dr.^a Rafaella C. B. Santos, bem como a organização do material já preservado em um banco de dados contendo imagens e informações da coleta e caracterização taxonômica. Para a avaliação do potencial biotecnológico da coleção, foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana das linhagens fúngicas isoladas do Parque Nacional do Iguaçu, um ambiente praticamente inexplorado do ponto de vista microbiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são altamente diversificados e abundantes. Existem aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos na Terra, sendo que 70 mil a 100 mil espécies já foram descritas, destes 14 mil são basidiomicetos, 5 mil são comestíveis e em torno de 1800 espécies possuem propriedades medicinais (SMITH, 2014). Os fungos são organismos eucarióticos, podendo ser unicelulares ou multicelulares. Suas células se agrupam em filamentos que podem ser septados ou não. Esses filamentos são chamados de hifas e, quando há condições favoráveis, as hifas formam o micélio (TORTORA *et al.*, 2012). São amplamente distribuídos pelo globo, podendo ser encontrados praticamente em todos os locais, como no solo, no ar, matéria orgânica e água, havendo as condições necessárias de umidade, temperatura e nutrientes, eles irão se desenvolver (FAIA, 2011).

Os fungos são heterotróficos e utilizam substâncias orgânicas como fonte de energia, carbono e nutrientes, através do fluxo citoplasmático, ocorrendo difusão de nutrientes solúveis para manter seu metabolismo e crescimento. A reprodução pode ser sexuada e/ou assexuada, podendo apresentar estruturas de reprodução diferentes, que são utilizadas em sua classificação. O fenômeno conhecido como parassexualidade, que é a recombinação genética na mitose, é um evento que pode ocorrer nestes organismos (SILVA & COELHO, 2006).

Fungos podem ser saprófitas, simbiontes ou parasitas, e desempenham papéis importantes nos processos ecossistêmicos terrestres e aquáticos. Os fungos saprófitos são decompositores de matéria orgânica, atuando principalmente na ciclagem de nutrientes, fazendo com que elementos como carbono e nitrogênio retornem para o meio abiótico. Algumas espécies de fungos também têm associações simbióticas com outros organismos, no caso dos líquens e fungos endofíticos. Os líquens são a associação de um fungo com uma alga, e essa associação mutualística é benéfica para ambos, onde o fungo disponibiliza nutriente e as algas a proteção. São bons indicadores biológicos devido ao fato dos líquens serem sensíveis ao dióxido de enxofre e outras toxinas (BINI, *et al.*, 2016).

Os fungos pertencentes ao grupo dos endofíticos colonizam tecidos vivos internos de plantas pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, desempenhando uma importante interação com seu hospedeiro, promovendo resistência à herbivoria, patógenos, estresses abióticos e a melhora da capacidade competitiva, e os fungos recebem proteção e nutrientes de seu hospedeiro (FERRARA, 2006). Outro exemplo de fungos simbiontes são as micorrizas, esta associação é obrigatória, pois os fungos necessitam dessa junção para sua multiplicação. Tal relação é

mutuamente benéfica, onde as plantas disponibilizam compostos de carbono, enquanto o fungo disponibiliza nutrientes para a planta. Esta associação favorece o crescimento da planta devido ao aumento da absorção de fósforo, zinco, cobre e nitrogênio, o que auxilia nos procedimentos de recuperação de áreas degradadas através do reestabelecimento de interações com os componentes bióticos, ocasionando resistência a condições ambientais diversas, além do aumento da tolerância a metais pesados (BERBARA, *et al.*, 2006; BERUDE, *et al.*, 2015).

Os fungos parasitas podem causar doenças em humanos, animais e plantas. Esses fungos são de grande interesse na saúde, devido às infecções de mucosas e outros tecidos. A espécie *Candida albicans*, um colonizador natural dos seres humanos, devido a mudança no perfil do crescimento do fungo em resposta da alteração do pH, que ocorre quando as bactérias lácticas são menos abundantes o pH se eleva, e a *Candida albicans* passa da forma leveduriforme para micelial devido à alteração na microbiota vaginal, aumentando a sua proliferação e causando os sintomas. Outras espécies que podem causar micoses são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Malassezia*, *Piedraia*, entre outros (MURRAY, *et al.*, 2014). Algumas espécies são conhecidas por causar perdas econômicas significativas na agricultura, como *Claviceps purpurea* (esporão-do-centeio) que ataca o centeio e outros cereais com produção de alcaloides tóxicos que levam a morte da planta (AZUL, 2010). As espécies *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*, podem causar a podridão da semente, base do colmo e da espiga de milho e manchas foliar (CASA, *et al.*, 2006).

Os fungos apresentam a capacidade de produzir moléculas, como metabólitos secundários, os quais são sintetizados como estratégias de defesa do próprio organismo (ZJAWIONY, 2003). Há aproximadamente 126 funções terapêuticas associadas a fungos que são de grande importância na produção de fármacos como antibacterianos, antivirais, antioxidantes, antifúngicos, anti-inflamatórios, antitumorais e imunomoduladores e por isso o grande interesse biotecnológico neste grupo de organismos (WASSER, 2011).

2.2 COLEÇÕES DE CULTURA MICROBIANA E CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS (BRCS)

São considerados recursos biológicos os organismos vivos e suas partes (OECD, 2001). Esses recursos são matéria-prima para produção de vários produtos biotecnológicos, sendo eles, fármacos, alimentos, bebidas alcoólicas e ácidos orgânicos, compostos utilizados no saneamento ambiental e nas práticas avançadas de biorremediação e de resíduos tóxicos. Na agricultura são importantes para a fixação do nitrogênio e controle de biológico de pragas. As culturas puras que são obtidas de coleções de referência são utilizadas para o ensino, estudos

taxonômicos e identificação de patógenos (VAZOLLER & CANHOS, 2005). Para o acesso a esses recursos são necessário centros repositórios, responsáveis pela preservação e distribuição de materiais e informações, que serão utilizadas em aplicações biotecnológicas, agrícolas, ambientais e médicas, chamados de Centros de Recursos Biológicos (BRCs) (OECD, 2001). De acordo com Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD (2001, p.12-13) as funções BRCs são:

“Preservação e provisão de recursos biológicos para pesquisa e desenvolvimento científico, industrial, agrícola, ambiental e médico; desempenho de pesquisa e desenvolvimento sobre esses recursos; Conservação da biodiversidade; repositórios de recursos biológicos para proteção de propriedade intelectual; e recursos para informação pública e formulação e políticas”.

Quando devidamente preservados, os recursos biológicos em coleções de culturas têm uma vasta aplicação nas áreas da saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente. Para a conservação das características genótípicas e fenotípicas, a preservação das culturas deve ser realizada a fim de manter sua viabilidade e pureza por um longo período de tempo (VAZOLLER & CANHOS, 2005). Conforme as diretrizes da OCDE, por medida de segurança, o ideal é que cada cultura seja preservada por pelo menos dois métodos distintos. Para preservação de culturas microbianas por um longo período de tempo é recomendando o congelamento em nitrogênio líquido, o ultracongelamento a -80°C , a liofilização e desidratação, assim garantindo menos riscos de alterações genéticas, além de um alto índice de viabilidade celular (OECD, 2007).

Na Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) se destaca os benefícios da conservação destes recursos, e por isso a necessidade de BRCs como conservadores *ex situ* da biodiversidade (OECD, 2001). Dentre os principais centros de recursos destacam-se:

- *The Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ): instituição científica sem fins lucrativos de importância internacional, localizada na Alemanha. É o centro de recursos mais abrangente de micro-organismos, linhas celulares e vírus de plantas na Europa, composto por mais de 8.700 cepas de bactérias e arqueias de quase todas as espécies descritas, 100 bacteriófagos, 2.300 fungos filamentosos, 500 leveduras, 740 culturas de células vegetais, 700 vírus vegetais e 400 linhas celulares humanas e animais, acessíveis à comunidade científica.
- *The Consortium of United Kingdom National Culture Collections* (UKNCC), localizado no Reino Unido, contém mais 70.000 micro-organismos e linhas celulares preservados, que contribuem em programas de pesquisas e materiais básicos para o desenvolvimento biotecnológico.

- *The World Federation of Culture Collections* (WFCC) contém coleções de culturas de mais de 60 países, foi o primeiro centro a desenvolver base de dados internacional sobre recursos culturais em todo o mundo. O Centro Mundial de Dados para Micro-organismos da WFCC-MIRCEN (WDCM) desenvolve diretrizes científicas destinadas a melhorar a qualidade e as funções das coleções.

Dois anos após a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) em 1992, o governo brasileiro instituiu a Comissão Nacional de Biodiversidade (Conabio) no Ministério do Meio Ambiente (MMA), que foi responsável por coordenar e elaborar a Política Nacional da Biodiversidade, além de efetuar os compromissos assumidos pelo Brasil junto a CDB. Depois da promulgação da CDB as coleções zoológicas, microbiológicas e herbários localizados em museus, universidade e jardins botânicos, ficaram evidentes para a sociedade e governo, como responsáveis por guardar e documentar espécimes da biodiversidade (MARINONI & PEIXOTO, 2010).

O Brasil apresenta uma grande diversidade biológica e embora seja um país em desenvolvimento de destaque pela capacidade institucional, possui centros de coleções de serviço ainda rudimentar, devido à falta de políticas adequadas (CANHOS & VAZOLLER, 2004; OLIVEIRA, *et al.*, 2006). Como exemplos de centros de serviços é a Fiocruz, que possui 31 coleções biológicas que são divididas em quatro categorias: coleções microbiológicas, coleções zoológicas, coleção histopatológica e coleção botânica (FIOCRUZ). Outro centro de coleções brasileiro é a Embrapa, que faz conservação de micro-organismos a mais de 40 anos (EMBRAPA, 2014). Também são conhecidos o Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCCenter), a Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e o Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo.

Além destes institutos de pesquisas, há várias universidades que mantêm as suas coleções biológicas como Coleções de Culturas DPUA (Universidade do Amazonas), Coleção e Culturas de Fungos Ectomicorrízicos do Departamento de Microbiologia (Universidade Federal de Santa Catarina), Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco e Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT). Devido à fraca infraestrutura e pouco *know-how* taxonômico de coleções especializadas de micro-organismos no Brasil, a maioria do material coletado e linhagens de referência acabam sendo depositadas em coleções de cultura no exterior (MANFIO, 2005).

2.3 PRESERVAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O principal objetivo das coleções de cultura é manter e distribuir micro-organismos sem variações genéticas (cepas de referência). Logo, a preservação evita a ocorrência de mutações que mudam as características do micro-organismo, como também mantendo a vitalidade e o bom número de células viáveis. As coleções microbianas podem ser comparadas com uma biblioteca, mas que contêm material vivo. Na escolha do método de preservação é necessário levar em consideração alguns requisitos, como custos de preservação e manutenção, capacitação técnica, o tamanho estimado do acervo, disponibilidade de equipamentos, recursos humano e financeiro, e acurácia em relação às práticas de controle de qualidade e a autenticação da coleção (OLIVEIRA, *et al.*, 2006; COSTA, *et al.*, 2009).

2.3.1 Preservação de Curto Prazo

A repicagem periódica ou repique contínuo é um dos processos mais antigos de preservação. É um método simples e de baixo custo, sem exigência de equipamentos sofisticados, utilizado para manter a viabilidade de micro-organismos. Para esse processo é necessário utilizar o meio de cultivo adequado e estocar as culturas desenvolvidas em baixas temperaturas (5°C a 8°C), a fim de reduzir o metabolismo do micro-organismo (COSTA & FERREIRA, 1991). O processo deve ser repetido de acordo com o intervalo de tempo adequado a cada micro-organismo e antes que todo o meio de cultivo seja consumido ou desidrate. Por ser um método de muita manipulação corre-se o risco de contaminação, perda de características genéticas devido a mutações e é necessário grande espaço para armazenamento das culturas (ROMEIRO, 2006).

2.3.2 Preservação de Médio Prazo

2.3.2.1 Método de *Castellani*

No método de *Castellani* a preservação é feita utilizando água destilada estéril em pequenos frascos, onde são armazenados pequenos quadrados de ágar contendo o micro-organismo. Esse procedimento deve ser utilizado em cultivos jovens, em torno de 10 a 15 dias, que é o período

de baixo metabolismo (estado latente). É uma técnica de baixo custo e mantém as características originais do micro-organismo por um longo período de tempo, pode ser utilizada para variedades de gêneros e espécies de fungos e apresenta baixo risco de contaminação por ácaros, necessitando de pequeno espaço para manter os frascos (ABREU & TUTUNJI, 2003).

2.3.2.2 Método do óleo mineral

Neste método é colocada uma camada de óleo mineral esterilizado sobre a cultura de micro-organismo, assim restringindo a disponibilidade de oxigênio e ocasionando a redução do metabolismo e a multiplicação do micro-organismo. O procedimento consiste em fazer o repique do fungo em um tubo de ensaio contendo meio de cultivo e esperar seu crescimento; após esse prazo, adicionar o óleo mineral esterilizado. As culturas preparadas podem ser mantidas em temperatura ambiente ou em resfriamento (COSTA & FERREIRA, 1991). Esta técnica mantém a longevidade dos micro-organismos e diminui a desidratação do meio de cultura, porém há grande possibilidade de contaminação, modificação genética e problemas para a retirada do óleo, e se for utilizada uma camada superior a 1 cm pode se perder o preservado por exaurir o oxigênio (ROMEIRO, 2006).

2.3.2.3 Método de congelamento

No método de congelamento os micro-organismos são mantidos em temperaturas baixas (-4°C a -20°C); é um procedimento de manutenção simples e de baixo custo por períodos de até dois anos. Porém pode ocorrer a redução da viabilidade de alguns micro-organismos devido à formação de cristais de gelo, ocasionando o rompimento das células. Neste método é necessária a adição de uma solução preservante, como o glicerol, impedindo a formação de cristais de gelo (ROMEIRO, 2006; TORTORA *et al.*, 2011).

2.3.3 Preservação de Longo Prazo

2.3.3.1 Método de criopreservação

A criopreservação é um dos métodos mais utilizados, permitindo que a maioria

das culturas fique estável por um longo período de tempo sob baixas temperaturas (-20°C a -80°C) em freezers, ou em ultrabaixas temperaturas (-150 °C a -196 °C) em nitrogênio líquido. Neste método se utiliza uma solução aquosa de glicerol a 20%, onde os quadrados de ágar contendo o micro-organismo fiquem submersos em tubos de plásticos autoclavados. O procedimento é muito eficiente, porém pode danificar as amostras devido à variação de temperatura em freezers. O mesmo não ocorre no armazenamento em nitrogênio, já que a temperatura permanece constante por um longo período de tempo (WOLFE & BRYANT, 2001). A criopreservação tem se mostrado eficiente, com taxas elevadas de sobrevivência dos micro-organismos e baixa alteração na composição genética. A desvantagem da criopreservação é a formação de cristais de gelo, que causam danos mecânicos e bioquímicos a célula (ABREU & TUTUNJI, 2003).

2.3.3.2 Método de liofilização

É uma técnica considerada mais eficiente e que pode ser aplicada para a maioria de micro-organismos além de manter sua viabilidade por um longo período de tempo. O procedimento consiste em três etapas: a) o congelamento do material; b) a desidratação primária e c) a desidratação secundária (CARVALHO, 2007). A retirada da água intracelular de material biológico congelado é por sublimação, assim evitando a formação de cristais de gelo, que podem romper as estruturas celulares. A liofilização é um procedimento muito eficiente por diminuir a variação genética das linhagens preservadas, e por evitar contaminações por ácaros. Exige pouco espaço de armazenamento e garante a viabilidade do micro-organismo de 17 a 20 anos. A desvantagem desse método é o custo dos equipamentos de desidratação e o preparo das culturas (MORGAN *et al.*, 2006).

2.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Biотecnologia é a área da ciência que se utiliza de seres vivos, parte deles (células e moléculas) ou dos conhecimentos sobre os processos biológicos com o fim de resolver problemas e/ou criar bens e serviços úteis às áreas da saúde, meio ambiente, agricultura e aos processos industriais (MAUTONE, 2008). Os fungos são de principal interesse biotecnológico, pois além de ser uma fonte alimentícia, podem ser utilizados na produção de alimentos fermentados, e em processos industriais, como produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos e pigmentos

(KELLER *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2008).

Na microbiologia, para a produção de vários compostos de interesse biotecnológico, deve-se levar em consideração o metabolismo, que pode ser dividido como primário e secundário. O metabolismo primário é o essencial para o crescimento, como a produção de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios, e está associado ao crescimento rápido e inicial do fungo (MURPPHY *et al.*, 2005).

Os metabólitos secundários não participam das reações básicas de sobrevivência, e sua produção qualitativa e quantitativa vai depender da capacidade biossintética do microorganismo, mas acredita-se que sua produção possa exercer funções no meio ambiente, como proteção e comunicação, assim garantindo a sobrevivência a estresse ambiental (OVERBYE & BARRET, 2005). A produção do metabólito secundário pode ocorrer na fase de crescimento, mas é na fase estacionária da fermentação que ocorre a maior produção. Nesta fase o número de novas células microbianas é igual ao número de células que morrem devido ao esgotamento de nutrientes ou oxigênio e ao acúmulo de metabólitos tóxicos (TAKAHASHI & LUCAS, 2008). Os metabólitos secundários estão associados à diferenciação, a esporulação, e nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir o mesmo metabólito (OLIVEIRA, 2013; MURPPHY *et al.*, 2005).

Os metabólitos secundários de fungos são explorados biotecnologicamente em diversas atividades e serviços. Os produtos bioativos, que apresentam atividade contra diversas doenças, são amplamente conhecidos e de grande importância, os compostos obtidos pela fermentação fúngica, variam desde simples analgésicos a tratamentos complexos (SMITH, 2014), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Produtos Bioativos Produzidos Por Fungos.

Atividade	Produto	Fungo
Analgésico	paxisterol	<i>Penicillium</i> sp
Antibacteriano	crisospermina	<i>Apiocrea chrysosperma</i>
	cefalosporina*	<i>Cephalosporium</i>
	penicilina*	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>
	sorrentanona	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Antiparasitário	apicidina	<i>Fusarium</i> sp
Antifúngico	equinocandina*	<i>Aspergillus nidulans</i>
	griseofulvina*	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Antitumoral	taxol	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
	calfofina C	<i>Cladosporium cladosporioides</i>

	ácido clavárico	<i>Hypholoma sublateritium</i>
	rizoxina	<i>Rhizopus chinensis</i>
Controlador da síntese de colesterol	compactina	<i>Penicillium brevicompactum</i>
	mevilonina*	<i>Penicillium citrinum</i>
	dihidromevilonina	<i>Aspergillus terreus</i>
	ácido zaragózico	<i>Leptodontidium elatius, Sporormiella intermedi, Phoma sp</i>
Estimulador da contração uterina	alcalóides ergot*	<i>Claviceps purpurea</i>
Imunomodulador	FR-901235	<i>Paecilomyces carneus</i>
Tratamento de problemas cardiovasculares	estachibocinas	<i>Stachybotrys sp</i>
	RES 1214-1/2	<i>Pestalotiopsis sp</i>
Profilático em odontologia	mutasteína*	<i>Aspergillus terreus</i>
Tratamento de diabetes	salfredinas	<i>Crucibilum sp</i>

Fonte: FERRARA 2006. * fármacos já encontrados no mercado.

As enzimas, catalizadores biológicos que participam de várias reações bioquímicas, são produtos do metabolismo fúngico de grande importância comercial. Sua utilização na indústria de alimentos é vantajosa devido à especificidade e rapidez de ação, o que minimiza o gasto de energia e é utilizado em baixas concentrações (COELHO *et al.*, 2008). Na panificação, por exemplo, são utilizadas pentosanases (xilanas/arabionosidases) que são enzimas que degradam os polissacarídeos de D-xilose e L-arabinose, que na sua forma insolúvel impedem o desenvolvimento do glúten, reduzindo o volume que prejudica a textura do pão. Para a extração de óleo de palmeira, azeite-de-dendê e oliva são utilizadas a celulases e pectinase para reduzir a perda no processo de prensagem da fibra e durante a clarificação (DA-SILVA, *et al.*, 1997).

Os fungos também podem ser utilizados na recuperação da qualidade ambiental através da biorremediação. Este processo utiliza organismos vivos como plantas e microorganismos para remover ou reduzir poluentes do meio ambiente através de processos metabólicos, facilitando a decomposição de resíduos tóxicos (AZUL, 2010). Na biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, estão sendo utilizadas as enzimas lipases, que podem ser tanto de origem animal, vegetal e microbiana. Os fungos são de principal interesse para a produção das lipases, devido ao fato dessas enzimas serem produtos extracelulares de fácil extração (MARTINS, *et al.* 2008). Os indivíduos do filo Basidiomiceto podem degradar a lignina, celulose e hemiceluloses em moléculas menores como CO₂ e água, e esta característica vem sendo explorada para degradação de

substâncias químicas recalcitrantes, como pesticidas clorados (DDT), dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), hidrocarbonetos aromáticos (benzo- α -pireno), além de bifenilas policloradas, pentaclorofenol e hexaclorobenzeno, graças a similaridade estrutural entre a lignina e os poluentes aromáticos (PEREIRA & FREITAS, 2012).

2.5 ANTIBIÓTICOS E COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O primeiro antibiótico foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming, através da contaminação de uma placa por *Penicillium notatum* que produziu uma substância capaz de matar bactéria Gram-positiva. Essa descoberta gerou interesse em estudos aprofundados por Howard Florey e Ernest Chain, e em 1940 houve a produção em larga escala da penicilina, que teve um papel fundamental no tratamento de feridos na Segunda Guerra Mundial (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os antibióticos podem ser naturais, obtidos através de metabólitos secundários ou sintéticos. A princípio os antibióticos eram obtidos apenas de micro-organismos ou de alguns vegetais superiores. A partir do conhecimento das estruturas químicas, iniciou-se a produção sintética em laboratório, porém atualmente a maioria dos antibióticos utilizados ainda é obtida de micro-organismos (FONTES & TAVARES, 2011).

Os compostos com atividade antimicrobiana possuem diferentes estruturas e mecanismos de ação, podendo inibir o crescimento (bacteriostático) ou causar a morte de micro-organismos (bactericida), atuando no DNA, interferindo na replicação de cromossomos, na síntese de proteína, causando alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, no transporte de elétrons e interferindo em processos metabólicos (Tabela 2) (MURPHY *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Tabela 2. Mecanismo de Ação de Antibióticos.

Local	Antibióticos	Mecanismo de Ação
Parede Celular	Penicilinas	Inibe a síntese da parede celular
	Cefalosporinas	Lise osmótica
	Monobactâmicos	
	Bacitracina	
	Glicopeptídeos	
	Ciclosserina	
	Fosfomicina	

Membrana Citoplasmática	Polimixinas Tiroticina Anfotericina B Nistatina	Rompimento da impermeabilidade seletiva
Réplicação do cromossomo	Novobiocina Griseofulvina Fluorquinolonas	Induz a degradação do cromossomo
Síntese proteica	Tetraciclina Clorafenicol Macrolídeos Lincosamidas Aminoglicosídeos Rifamicinas	Interferência na síntese do RNA

Fonte: Adaptado de Tavares (2014).

A produção de antimicrobianos por fungos é específica da linhagem, ou seja, cada linhagem pode apresentar um composto biativo com atividade contra um determinado micro-organismo. Sua produção está associada à cinética de crescimento fúngico e ao meio de cultura específico, e o aumento da produção pode ser conseguido com pequenas alterações do meio de cultivo, porém pode ocorrer diminuição da produção com repiques contínuos (TAKAHASHI & LUCAS, 2008), intensificando a necessidade da correta preservação desses organismos.

Atualmente, as principais classes de antibióticos de uso clínico são: β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos) e estreptoGraminas. Vários gêneros de fungos são capazes de produzir antibióticos, mas apenas dois são comercialmente viáveis: *Aspergillus* e *Penicillium* (MURPHY *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2010; SMITH, 2014).

Para identificar a sensibilidade do micro-organismo ao antimicrobiano é realizada a técnica de antibiograma *in vitro*. No antibiograma o micro-organismo alvo cresce na presença da substância a ser avaliada, observando se ocorre ou não o seu desenvolvimento. O procedimento mais utilizado é o antibiograma qualitativo pelo método de difusão de disco ou de papel filtro impregnado com a substância que se quer avaliar o potencial antimicrobiano. O resultado é avaliado pelo diâmetro do halo de inibição, medido em milímetros (TAVARES, 2014).

Cada vez mais, muitas bactérias têm se tornado resistentes aos antibióticos, e por esta razão tem aumentado o interesse em busca de novas alternativas de antimicrobianos naturais (GRUMACH *et al.*, 2007). WISBECK *et al.* (2002) realizaram testes com fungos do gênero

Pleurotus gênero conhecido por outras propriedades terapêuticas, como produção de lectina que apresenta fator de coagulação sanguínea, D-glucano que possui ação antitumoral, ação preventiva contra doenças cardíacas e na arteriosclerose. Foram realizados testes para buscar novos antimicrobianos no caldo fermentado por diferentes espécies do gênero *Pleurotus* e apenas a linhagem *Pleurotus* sp apresentou atividade antimicrobiana contra a espécie *Bacillus subtilis*. As demais linhagens supostamente não produziram uma quantidade suficiente de antimicrobiano para detecção, segundo os autores.

Muitos trabalhos também têm utilizado fungos endofíticos em testes antimicrobianos, como no trabalho de WENZEL *et al.* (2013) que analisaram tanto a atividade antimicrobiana quanto a produção de enzimas extracelulares de fungos endofíticos isolados da soja. O teste utilizado foi a difusão em discos contra bactérias patogênicas humanas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* e *Micrococcus luteus*, para identificar a formação de halo de inibição. Nove isolados apresentaram potencial antimicrobiano para pelo menos uma das cinco bactérias que foram testadas.

SOUZA *et al.*, (2004) avaliou a atividade antimicrobiana de 571 fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia. Dos fungos isolados foram identificados as seguintes espécies *Colletotrichum* sp e seu teleomorfo *Glomerella* sp, *Guignardia* sp, *Aspergillus niger*, *Phomopsis* sp e *Xylaria* sp, e 19 espécies apresentaram atividade antimicrobiana contra um ou mais micro-organismos teste utilizado

3 OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente trabalho foram à estruturação da coleção de micro-organismos da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) e a avaliação biotecnológica da coleção através de ensaios da produção de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano. Para esse fim se estabeleceram os seguintes objetivos específicos:

- i. Preservação de linhagens fúngicas já isoladas em outros projetos do grupo de pesquisa;
- ii. Criação de um banco de dados para organização das informações dos materiais preservados;
- iii. Organização do material preservado em um banco de dados contendo imagens e informações da coleta e caracterização taxonômica;
- iv. Realização de ensaios para a avaliação da produção de compostos antimicrobianos.

4 METODOLOGIA

4.1. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Em diversos projetos realizados sob orientação da Profa. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli Santos foram isolados 371 fungos do Parque Nacional do Iguaçu, no trabalho intitulado “Efecto de borde en hongos de un bosque atlántico semideciduo”, da aluna Diana Carolina Duque Castaño. Desses fungos, 158 já haviam sido preservados, e os 259 restantes foram mantidos no meio de cultivo Extrato de Malte a 2% acrescido de 15% de ágar a 4°C aguardando preservação. Inicialmente os isolados foram reativados no meio de cultura de Extrato de Malte a 2% acrescido de 15% de ágar, e mantidos na estufa por um período de 7 dias a 28°C. Para a preservação foram utilizados dois métodos de redução de metabolismo dos fungos: *a) Castellani* (CASTELLANI, 1939), utilizando água deionizada, armazenado em 4°C; *b) criopreservação* com glicerol a 20%, armazenado a – 80°C. Com auxílio do bisturi foram cortados aproximadamente seis cubos de ágar, em torno de 0,5 cm, da cultura crescida por sete dias da região mais próxima do centro da colônia e da região mais distante, para que cada criotubo contivesse a porção mais antiga e a mais jovem do micélio. Os cubos foram transferidos para criotubos devidamente identificados contendo 2 mL de água deionizada esterilizada e de glicerol 20%, para o método Castellani e criopreservação respectivamente. Para cada isolado, um tubo foi preservado no método de Castellani e dois na criopreservação para armazenamento a -20°C e -80°C.

4.2. ORGANIZAÇÃO DO ACERVO

Os criotubos de 158 fungos isolados já preservados em projetos anteriores e os novos 213 isolados preservados neste projeto foram organizados em caixas de fibra de papelão contendo divisórias para 96 tubos. A posição de cada tubo na caixa foi planilhada em linhas e colunas.

Para a organização do acervo foi desenvolvido um banco de dados com uma interface gráfica no proGrama MICROSOFT OFFICE ACCESS (2007), devido às facilidades de acesso e compartilhamento da informação apresentadas pelo *software*. Num primeiro momento foi feito o levantamento dos requerimentos da base dados, resultando no desenho de três tabelas relacionadas entre si. A tabela principal contém a informação da classificação taxonômica e código

de identificação do fungo que vai atrelado às duas tabelas restantes, uma contendo os dados morfológicos e a outra referente ao tipo de preservação utilizada (Figura 1).

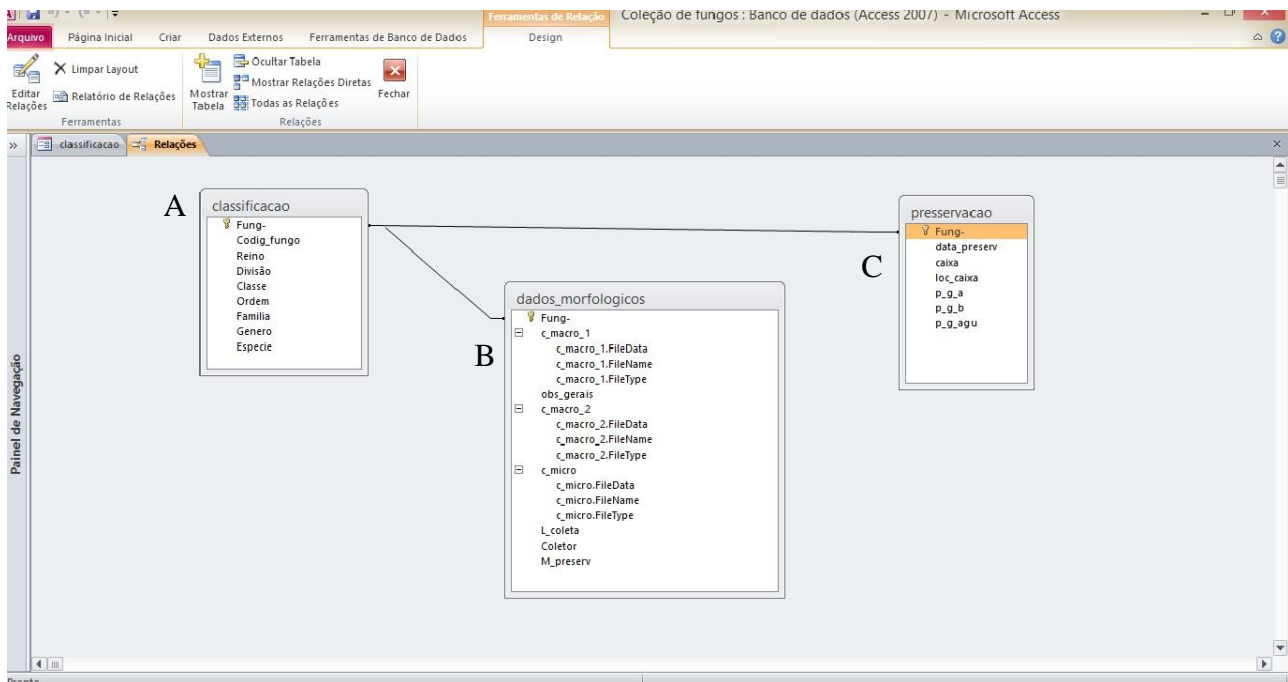


Figura 1. Relação das tabelas formadas para a compilação dos dados. A) Tabela principal onde computa informações de classificação e código do fungo; B) Tabela secundária, onde são cadastrados os dados morfológicos; e C) Tabela que contém informações sobre o tipo de preservação.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os fungos filamentosos foram submetidos ao teste de atividade para a produção de antimicrobianos utilizando o método de placas de Petri, adaptado de Passarini (2008). Primeiramente, foi realizado um extrato enzimático: dois cubos de aproximadamente 0,5 cm do meio sólido com os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml do meio de cultivo Extrato de Malte a 2%. Para cada isolado foram realizados três réplicas. Os tubos foram incubados por sete dias a 28 °C em 150 rpm, após esse período os inóculos foram centrifugados à 4.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos de ensaio esterilizados. Para cada réplica do sobrenadante foram adicionados dois discos de papel filtro de 7 mm autoclavados. Os tubos com os sobrenadantes e os discos foram mantidos a temperatura ambiente por uma hora para absorção dos metabólitos do caldo fermentativo.

Para o teste antimicrobiano foram utilizadas duas bactérias, uma Gram positiva e uma Gram negativa, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. As bactérias foram inoculadas no meio de cultivo líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 37° C e após 24 horas transferidas para uma placa de petri contendo o meio sólido BHI, espalhando as culturas em toda a

placa com o auxílio de um *swab*. Após 10 minutos, os discos embebidos no extrato de cada réplica dos fungos foram colocados sobre as placas com as culturas bacterianas. Como controles foram utilizados discos embebidos apenas no meio de cultivo extrato de malte. As placas foram incubadas a 37 °C por três dias para verificar a formação do halo de inibição. Todas as fotos dos testes antimicrobianos das placas de colônias foram fotodocumentadas pelo equipamento Transiluminador L.Pix, do fabricante Loccus.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COLEÇÃO DE FUNGOS E ORGANIZAÇÃO DO ARCEVO

A Coleção de Fungos da Universidade Federal da Integração Latino-Americana conta atualmente com 371 fungos, que foram preservados em dois métodos, Castellani e criopreservação (-20 °C e -80 °C), totalizando 1113 amostras armazenados em 6 caixas para cada método de preservação. Cada criotubo contém o nome, método de preservação e a data (Figura 2). Um total de 46 fungos foram descartados devido ao não crescimento no processo de reativação e em alguns casos a inviabilidade das amostras, como contaminação cruzada.



Figura 2. A) Organização dos fungos em caixas de fibra de papelão. B) Criotubos com identificação, método de preservação e data.

No trabalho “Efecto de borde en hongos de un bosque atlántico semideciduo” foi possível fazer a identificação morfológica em nível de gênero dos isolados que apresentaram esporos, conídios ou estruturas de reprodução observadas na técnica de microscopia e esta informação foi adicionada ao banco de dados. Àqueles que não foram identificados receberam uma nomenclatura alfanumérica, que representa morfotipos distintos, levando em consideração a sua localização de coleta. A nomenclatura foi classificada da seguinte maneira, os fungos coletados

aproximadamente 50 metros no interior da borda do Parque Nacional do Iguaçu (I), fungos da borda do Parque (B), e se apresentavam alguma reação ao reagente guaiacol (G), um exemplo, fungo AB (morfotípo), código 1BG1.4.

A correta preservação é indispensável na microbiologia. O uso de técnicas como repique contínuo pode favorecer a mutação dos micro-organismos e até mesmo sua morte. Na biotecnologia, esses eventos podem representar perdas potenciais de recursos microbianos. Como observado, um número razoável de isolados (46) não foram reativados devido ao armazenamento prévio incorreto, ressaltando a importância da preservação realizada no presente trabalho. Em adição, o uso de material biológico não conforme (por exemplo, micro-organismos mal identificados e/ou culturas contaminadas) pode causar sérios problemas tanto na pesquisa quanto nos processos industriais.

O trabalho de Dos Santos (2015) teve como um dos objetivos reorganizar o acervo de fungos marinhos da costa brasileira, marinhos e terrestres da Antártica. Para tanto, cerca de 696 fungos marinhos oriundos da costa brasileira e 185 fungos isolados de ambientes antárticos foram avaliados quanto à viabilidade e pureza, fotografados e preservados por dois métodos distintos: criopreservação e *Castellani*, como no presente trabalho. Destes, 71% dos isolados foram considerados puros e viáveis.

A formação do banco de dados para os materiais preservados é de grande importância para a organização do acervo porque ele dispõe das seguintes informações: o nome do fungo, foto da colônia, o processo de preservação, a localização na caixa, a caracterização macroscópica e microscópica, a data de preservação, local de coleta, meio de cultivo utilizado e coletor (Figura 3). Sendo assim, mais fácil a sua localização nas caixas de preservação contendo informações básicas para cada fungo. A foto dos isolados cadastrada no banco de dados também serve de apoio para comparação no cultivo dos fungos, ajudando a identificar se ocorreu alguma variação morfológica, e inferir sobre uma possível modificação genética do isolado. A Figura 3 exemplifica o depósito de um isolado, contendo as imagens e os dados acima descritos.

Figura 3. Interface do banco de dados no Microsoft Access (2007) da coleção, onde se podem observar os campos disponíveis para preenchimento.

Segundo Sette *et al.* (2013) é importante destacar que, para cada estirpe preservada na coleção, os dados associados devem ser mantidos com segurança. Esses dados são relevantes, uma vez que eles relatam o local e o substrato de onde as cepas foram encontradas, o coletor (e as instituições); identificação e/ou prospecção taxonômica; métodos de cultivo e manutenção; características fenotípicas e análise genômica. O Conjunto Mínimo de Dados (MDS) e o Conjunto de Dados Recomendados (RDS) foram determinados para cada grupo de microorganismos e estão disponíveis nas Diretrizes de Melhores Práticas da OCDE para o BRC (OCDE, 2007). Para a manutenção e segura das informações associada à coleção devem ser implementados sistemas computadorizados e executar *backups* periódicos.

O estabelecimento de uma coleção de cultura na região é de extrema importância para as universidades, centros de pesquisas e indústrias. Neste sentido, a distribuição das coleções de cultura de fungos brasileiros revela que 61% das coleções de cultura estão concentradas na região Sudeste, a maioria delas localizadas no estado de São Paulo, seguido pelos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. A segunda região que concentra coleções de culturas de fungos é o Nordeste seguido pelas regiões Norte, Sul e Centro-Oeste, ou seja, existe atualmente uma carência na região Sul de coleções microbiológicas, especialmente no oeste do estado do Paraná. A presença de uma grande empresa farmacêutica na região, Prati-Donaduzzi, reforça a necessidade de implementação (Sette *et al.* 2013),.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para o teste antimicrobiano foram reativados 23 fungos que já haviam sido preservados anteriormente. Esses fungos foram escolhidos por apresentarem reação positiva ao guaiacol (Tabela 3). Esse reagente foi utilizado no trabalho “Efecto de borde en hongos de un bosque atlántico semideciduo” como um indicador da atividade de enzimas ligninolíticas as quais apresentam atividade de degradação da lignina presente na parede vegetal de algumas plantas superiores e que tem sido avaliada nos últimos anos na degradação de compostos recalcitrantes, como diversos poluentes ambientais. O guaiacol é um composto orgânico aromático incolor oleoso, é derivado do guaco ou creosoto da madeira, e quando degrada a estrutura da lignina presente na sua composição, produz uma coloração escura. Uma vez que o trabalho continha um número grande de isolados promissores biotecnologicamente, optou-se em selecionar estes isolados produtores de compostos ligninolíticos para iniciar a avaliação do potencial produtor de compostos antimicrobianos. Dos fungos reativados, apenas 12 cresceram, limitando o teste antimicrobiano. Este resultado mostra a necessidade de manutenção da coleção, incluindo principalmente a avaliação da viabilidade dos isolados.

Tabela 3. Fungos utilizados para o teste antimicrobiano

Linhagens	Crescimento
AD (2BG2.3)	Não
AE (2BG3.8)	Não
AI (2IG2.17)	Sim
AP (2IG6.6)	Não
AR (2IG1.10)	Não
BF (2IG2.2)	Sim
BO (3BG2.1)	Sim
BP (3BG2.7)	Sim
BQ (2IG6.2)	Não
BW (1IG1.7)	Não
CC (2IG2.7)	Não
CX (3BG3.11)	Sim
DA (1IG3.20)	Sim
DE (2IG3.4)	Não
DF (1BG6.1)	Sim
EE (2IG2.18)	Não
EK (2I3.7)	Não
EL (1IG2.2)	Sim
EN (2BG2.1)	Sim
EW (1IG3.3)	Não
JL (3IG3.5)	Sim
JM (3IG3.7)	Sim
JP (2IG3.22)	Sim

Os ensaios de antimicrobianos foram realizados em triplicata para cada fungo. Para a bactéria *E. coli* não foi identificando nenhum halo de inibição (Figura 4), e para *S. aureus* duas cepas de fungos apresentaram halo de inibição: morfotipo JL, código 3IG3.5 aproximadamente 2 mm, e morfotipo JM, código 3IG3.7, de aproximadamente 3 mm (Figura 5).

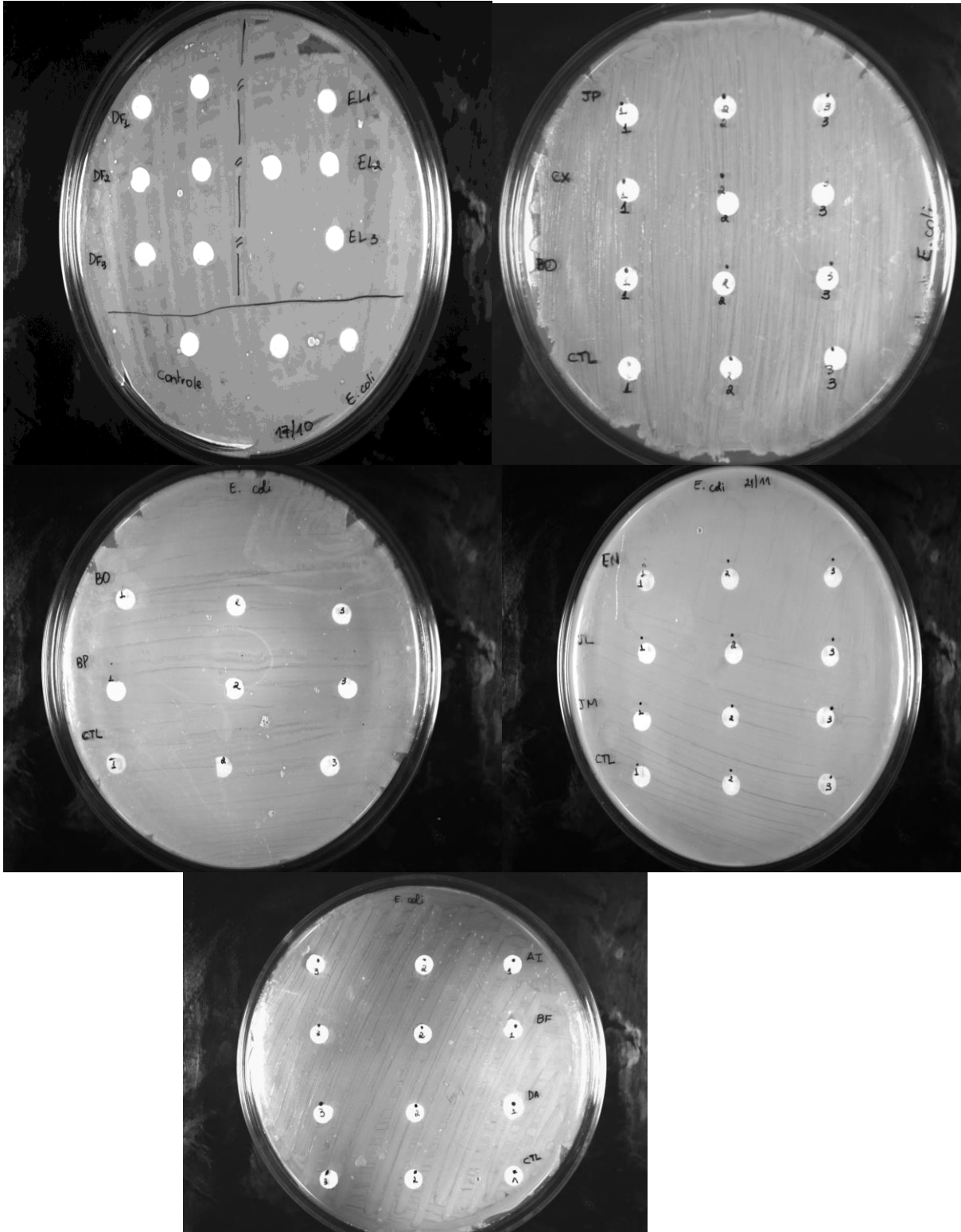


Figura 4. Ensaio de atividade antimicrobiana de fungos isolados do solo para *E. coli* pelo método de difusão de disco em ágar. As placas de colônias foram fotodocumentadas pelo equipamento Transiluminador L.Pix..

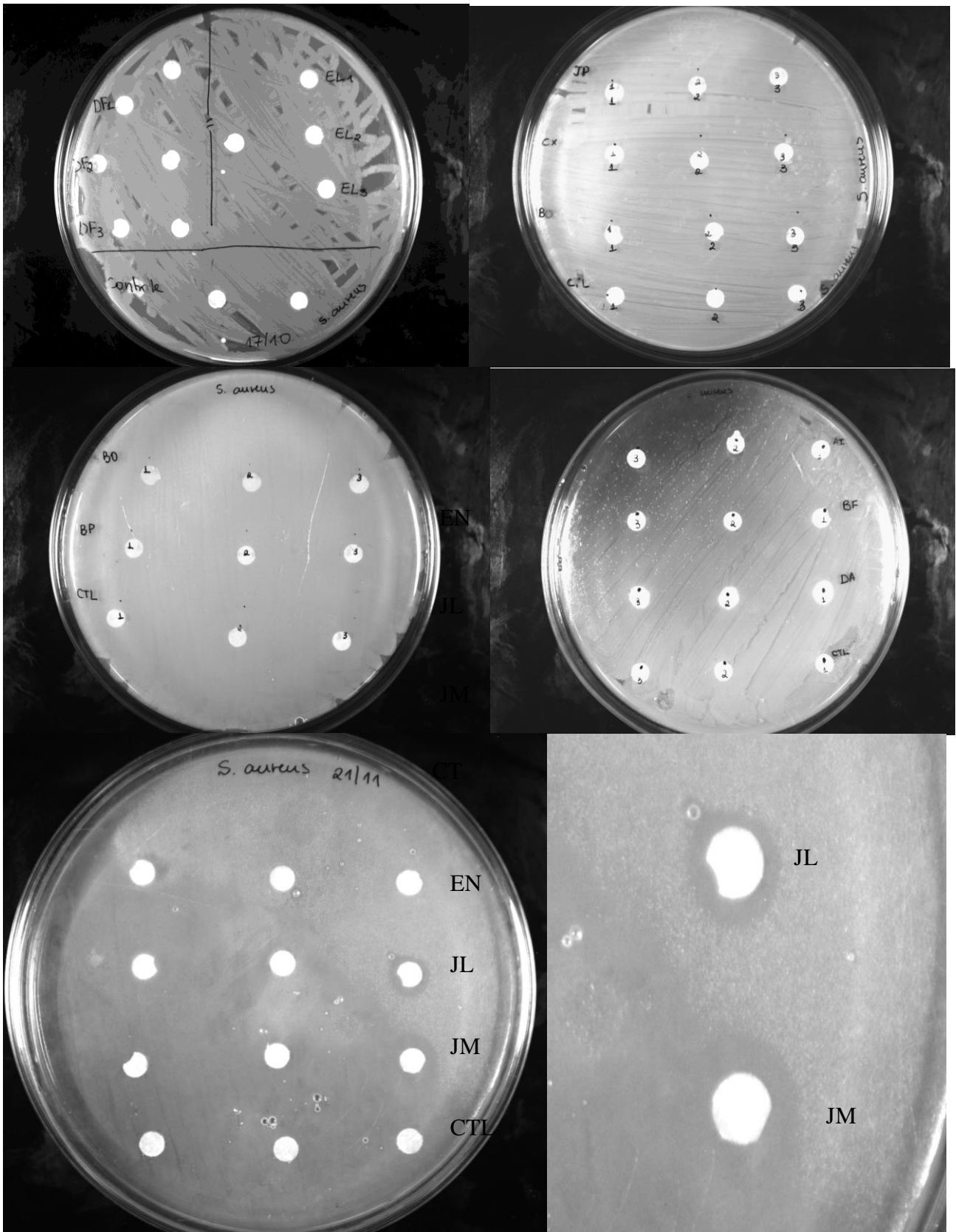


Figura 5. Ensaio de atividade antimicrobiana de fungos isolados do solo para *S. aureus* pelo método de difusão de disco em ágar. No canto direito inferior a imagem ampliada dos halos de inibição formados pelos fungos morfotipo JL, código 3IG3.5 e morfotipo JM, código 3IG3.7. As placas de colônias foram fotodocumentadas pelo equipamento Transiluminador L.Pix.

Atualmente, a saúde pública vivencia a resistência a antibióticos e as pesquisas para desenvolvimento de novos antimicrobianos são insuficientes (SHLAES, *et al.*, 2013). Nos últimos 40 anos foram lançados apenas quatro novas classes de antibióticos (COOPER & SHLAES, 2011). Por isso, há necessidade de buscar alternativas naturais para a produção de novas moléculas com propriedades antimicrobianas.

A pesquisa por compostos antimicrobianos produzidos por fungos atualmente trabalha em sua grande maioria com fungos endofíticos. No trabalho de SILVA (2006) 49 fungos endofíticos foram avaliados e 28 apresentaram atividade antimicrobiana, um resultado relativamente promissor. Segundo o autor, a possibilidade de produção de compostos antimicrobianos por endofíticos é alta devido à presença de substâncias bioativas produzidas pelos fungos durante a associação com as plantas. Avaliando fungos do solo, RODRIGUES *et al.* (2017) selecionou seis isolados que manifestaram notável atividade inibitória, particularmente sobre bactérias Gram-negativas. LIMA *et al* (2014) mostrou que os fungos do solo da Serra de Carajás-PA apresentam grande variedade de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Assim, o recurso micológico do solo não pode ser desprezado e novos estudos devem ser realizados neste princípio.

Por mais que tenha sido encontrados apenas dois fungos com potencial antimicrobiano, o presente trabalho demonstra o potencial das amostras, visto que apenas 12 isolados foram avaliados e utilizando apenas duas linhagens bacterianas. Em adição, os isolados mostraram atividade inibitória contra *S. aureus*, considerada um dos principais patógenos causadores de infecções no ambiente hospitalar. As manifestações clínicas vão desde infecções traumáticas até septicemias. Em 1960, ocorreu um aumento constante de isolados denominados *methicillin-resistant - MRSA Staphylococcus aureus* (SOUZA *et al.* 2005).

Os isolados com atividade antimicrobiana (figura 6), não foram caracterizados morfológicamente, devido à ausência de esporos e estruturas reprodutivas. A reprodução assexuada possivelmente ocorre por fragmentação da hifa, impedindo sua classificação. Novos estudos serão realizados visando à avaliação completa da atividade antimicrobiana por estes isolados e incluindo suas identificações taxonômicas.

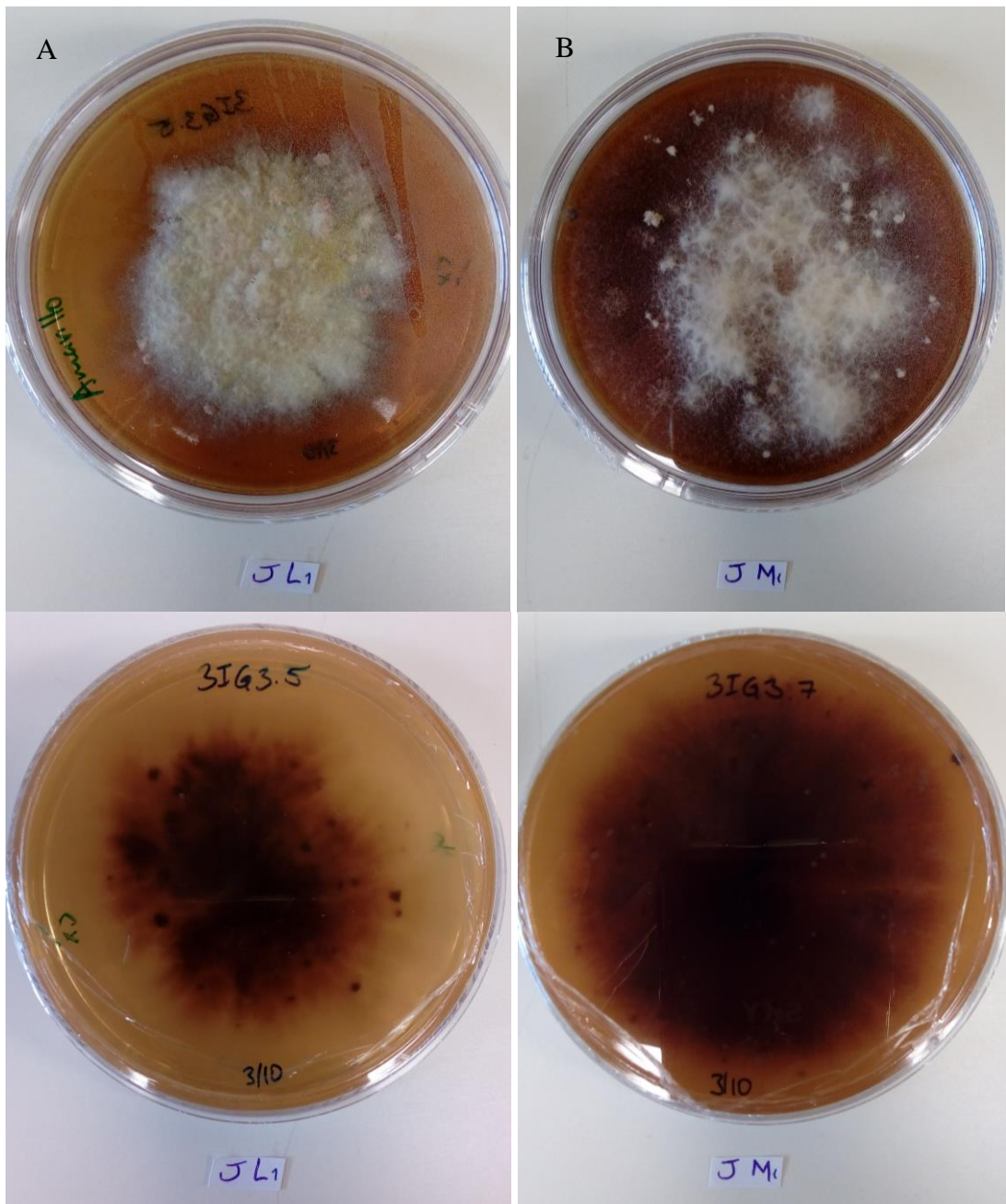


Figura 6. Fotos dos isolados que apresentaram halo de inibição contra *Staphylococcus aureus*, em: A) morfotipo JL, código 3IG3.5; B) morfotipo JM, código 3IG3.7. Foto superior aspecto da colônia e a foto inferior o verso da planca

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho objetivou a preservação de linhagens fúngicas isoladas em outros projetos do grupo de pesquisa, podendo ser considerado como satisfatório já que 82% (210) dos isolados foram preservados pelos métodos de *Castellani* e Criopreservação.

A criação do banco de dados para preservação dos materiais conta com uma nova ferramenta criada no proGrama MICROSOFT OFFICE ACCESS (2007), que facilita o acesso à informação dos fungos preservados com informações importantes para consulta ao material. A criação do banco de dados também possibilitou a organização das amostras, a fim de manter um único método de organização dos dados obtidos ao longo de toda a pesquisa, assim evitando divergências de informação e permitindo que todos os fungos preservados contenham o maior número de informações possíveis, como por exemplo, imagens, informações da coleta e da caracterização taxonômica.

Nos ensaios para a avaliação de compostos antimicrobianos foram identificados dois fungos (JL (3IG3.5) e JM (3IG3.7)) com capacidade de inibir o crescimento bacteriano, sendo uma motivação para continuar em busca de novos fungos com propriedades antimicrobianas, visto que a coleção conta com um número expressivo de recursos genéticos e fisiológicos. O presente trabalho pode ser considerado de suma importância para futuras pesquisas científicas, já que o acervo preservado e organizado contém micro-organismos que podem ter finalidades biotecnológicas industriais e farmacêuticas úteis para a área científica e para a sociedade. Em adição, este representa um dos primeiros trabalhos que mostram o potencial biotecnológico de fungos isolados do Parque Nacional do Iguaçu, uma unidade de conservação brasileira, declarada Patrimônio da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO). Por possuir características e diversidades naturais superlativos, contendo importantes habitats naturais para a conservação *in situ* da diversidade biológica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de Culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, v.02 n.2, p. 236-25, 2003.
- ARANDA, A. T. Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública. **III Simpósio Sobre A Biodiversidade Da Mata Atlântica**. 2014.
- AZUL, A. M. **Cogumelos do Paul da Madriz**. 1ª Ed. Imprensa da Universidade de Coimbra. 2010. Disponível em:
<<https://books.google.com.br/books?id=77sAGUIJpAgC&pg=PA16&dq=fungos+parasitas&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjunfOrgMPXAhWEjJAKHUo0CO4Q6AEIOjAD#v=onepage&q=fungos%20parasitas&f=true>>. Acesso em 16 nov. 2017.
- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A. & FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. 1ª Ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 54-79.
- BERUDE, M. C.; ALMEIDA, D. S.; RIVA, M. M.; CABANÊZ, P. A. & AMARAL, A. A. Micorrizas E Sua Importância Agroecológica. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p.132-146, 2015.
- BINI, D.; LOPEZ, M. V. & CARDOSO, E. J. B. N. Metabolismo Microbiano. In: CARDOSO, E. J. B. N. & ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2ª Ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 61-80.
- CANHOS, V. P. & VAZOLLER, R. F. A Importância Das Coleções Biológicas. **Scientific American Brazil**. p.20, 2004.
- CARVALHO, F. D. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 31(3), p. 814-820, 2007.
- CARVALHO, M. P.; ABRAHAM, W. & MACEDO, A. J. Micro-organismos Em Favor Da Saúde Humana. **Revista Liberato**, v9, p. 77-81, 2008.
- CASA, R.T., REIS, E.M. & ZAMBOLIM, L. Doenças Do Milho Causadas Por Fungos Do Gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira** 31:427-439. 2006. Disponível em:
<<http://www.scielo.br/pdf/0D/fb/v31n5/01.pdf>> Acesso em 16 nov. 2017.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M. & RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2008.
- COOPER, M.A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v.472, 2011. Disponível:
<http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/file/antibiotics_0.pdf> Acesso em 5 dez, 2017.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de micro-organismos: Revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAÚJO, S. A. C. & ROLIM, B. N. Princípios Da Estocagem E Preservação De Amostras Microbiológicas. **Ciência Animal**, 19 (2), p. 111-122, 2009.

DA –SILVA, R.; FRANCO, C. M. L & GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação No Processamento De Alimentos: Revisão. **BoL. SBCTA**, 31 (2): 249-260, jul./dez 1997.

DOS SANTOS, J. A. Potencial Biotecnológico de Fungos Marinhos e Antárticos da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). 2015. Tese de mestrado.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products And Applications. In: YANG, S. T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources** 1ª Ed., Elsevier. Amsterdam. 2007. p. 225-261

EMBRAPA. **Centro de Recursos Biológicos (CRB) da Embrapa vai abrigar coleções de micro-organismos em prol do agronegócio brasileiro**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1924597/centro-de-recursos-biologicos-crb-da-embrapa-vai-abrigar-colecoes-de-micro-organismos-em-prol-do-agronegocio-brasileiro>>. Acesso em 22 out. 2017.

FAIA, A. M. Isolamento E Identificação De Fungos Filamentosos E Leveduras Em Alguns Pontos De Uma Rede De Distribuição De Água. 2011. Dissertação de mestrado da Universidade de Lisboa.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial Para A Produção De Substâncias Bioativas. **Revista Fitos**. Vol. 2 (1), 2006.

FIOCRUZ. **Coleções biológicas**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/vpplr-gestao-das-colecoes>>. Acesso em 22 out. 2017.

FONTES, A. P. & TAVARES. T. T. Coordenação De Metais A Antibióticos Como Uma Estratégia De Combate À Resistência Bacteriana. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 1, 111-118, 2011.

GRUMACH, A. S. *et al.* A (Des)Informação Relativa À Aplicação Da Penicilina Na rede Do Sistema De Saúde Do Brasil: O Caso Da Sífilis. **DST – J bras Doenças Sex Transm** 19, p: 120-127, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S. & PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica E Perspectivas Para A Descoberta E Desenvolvimento De Novos Agentes. **Quím. Nova** vol.33 n.3 São Paulo, 2010.

KELLER, N.P.; TUNER, G. & BENNETT, J. W. Fungal Secondary Metabolism - From Biochemistry To Genomics. **Nat Rev Microbiol**. Dec;3(12):937-47, 2005. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322742>>. Acesso em 19 nov. 2017.

LIMA, L. A. Perfil Químico E Atividade Antimicrobiana De Fungos Isolados Das Plantas *Virolla Michelli* E *Bauhinia Guianensis* E De Solo Da Serra De Carajás. **Resumos Do XXIV Seminário De Iniciação Científica Da UFPA**. 2014.

MANFIO, G. P. Micro-organismos. In: LEWINSOHN, T. **Avaliação do Estado de Conhecimento da Biodiversidade Brasileira**. 1ª Ed. Fortaleza: VG Art, 2005. p. 111-145.

MARINONI, L. & PEIXOTO, A. L. As Coleções Biológicas Como Fonte Dinâmica E Permanente

De Conhecimento Sobre a Biodiversidade. **Cienc. Cult.** vol.62 (3), p. 54-57, 2010.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J. & COSTA, J.A.V. Co-Produção De Lipase E Biosurfactante Em Estado Solido Para Utilização Em Biorremediação De Óleos Vegetais E Hidrocarbonetos. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 8, 1942-1947, 2008.

MAUTONE, J. N. Diversidade E Pontencial Biotecnológico E Leveduras E Fungos Semelhantes A Leveduras Isolados De Folhas De Figueira Do Parque De Itapuã, Rs, Brasil. 2008. Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation Of Microorganisms By Drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S. & PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. Disponível em: < https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=dDgcBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=fungos+que+causam+doen%C3%A7as+em+humanos&ots=6z6s3H4T0k&sig=JCB_Jc7q_WjyiY160HSiGEch2WY#v=onepage&q=fungos%20que%20causam%20doen%C3%A7as%20em%20humanos&f=true > Acesso em 16 nov. 2017.

MURPHY, R. A. & HORGAN, K. A. Antibiotics, Enzymes And Chemical Commodities From Fungi. In: KAVANAGH, K. **Fungi: Biology And Applications**. 1ªEd. Ireland: Wiley, 2005. p.113-143.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **MultiCiência**. v. 7, 2006.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), Biological Resource Centers: Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. **OECD Publications**, Paris, France, p. 66, 2001.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres, **OECD Directorate for Science, Technology and Industry**. 2007. Disponível <<http://www.oecd.org/dataoecd/7/13/38777417.pdf>> Acesso em 15 de jun, 2017.

OVERBYE, K.M & BARRETT, J.F. Antibiotics: Where Did We Go Wrong? **Drug Discovery Today**. v.10, n. 1, p. 45-52, 2005.

PASSARINI, M. R.Z. Estudo Da Degradação De Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) E Da Produção De Antimicrobianos Por Fungos Filamentosos Isolados De Invertebrados Marinhos. 2008.

PEREIRA, A. R. B. & FREITAS, D. A. F. Uso De Micro-Organismos Para A Biorremediação De Ambientes Impactados. **Rev. Elet. em Gestão**. Vol. 6, (6), p. 975–1006, 2012.

PETI, A. P. F. Identificação de Agentes Antimicrobianos Produzidos Por Actinobactérias do Solo Com Potencial Aplicação No Controle de Mastite Bovina. 2016.

RODRIGUES, B. R. *et al.* Verificação Do Potencial Antimicrobiano De Fungos Filamentosos Isolados Do Solo Amazônico. **Semana Nacional de Ciência e Tecnologia – SNCT**. 2017

ROMEIRO, R. S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. **Material didático**,

Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. & RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, 60, p: 2–8. 2013.

SHLAES, D. M.; SAHM, D.; OPIELA, C.; SPELLBERG, B. The FDA Reboot Of Antibiotic Development. **Antimic. Agen Chemot**, v. 57, p. 4605-4607, 2013. Disponível <http://aac.asm.org/content/57/10/4605.full?site=AntimicrobAgentsChemother&utm_source=TrendMDAntimicrobAgentsChemother&utm_medium=trendmdantimicrobagentschemother&utm_campaign=TrendMD_AACCLIN_1> Acesso em 5 dez, 2017.

SILVA, R. R. & COELHO, G. D. Fungos Principais Grupos E Aplicações Biotecnológicas. 2006.

SILVA, R. E. A. Avaliação da Atividade antimicrobiana de fungos e actinobactérias endofíticos isolados de *Conyza bonariensis* (L) Cronquist. (Rabo-de-raposa). 2006.

SMITH, H. A. **Production Of Antimicrobials And Antioxidants From Filamentous Fungi**. 2014.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, S. A.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M. & PEREIRA, J. O. Atividade Antimicrobiana De Fungos Endofíticos Isolados De Plantas Tóxicas Da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.** Vol. 34 (2), 2004.

TAKAHASHI, J. A. & LUCAS, E. M. F. Ocorrência E Diversidade Estrutural De Metabólitos Fúngicos Com Atividade Antibiótica. **Quim. Nova**, Vol. 31, (7), p. 1807-1813, 2008

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos Para Clínico**. 3ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. & CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª Ed. – Dados eletrônicos – Porto Alegre: Artmed, 2012.

VAZOLLER, R. F. & CANHOS, V. P. Coleções de Culturas e Serviços e Centros de Recursos Biológicos. **CGEE**. Nota Técnica. 2005.

WASSER, S. P. Current Findings, Future Trends, And Unsolved Problems In Studies Of Medicinal Mushrooms. **Microbiol Biotechnol**, 89:1323–1332. 2011.

WENZEL, J. B.; MORESCO, A. A. A; BOAS, E. V.; BURIN, F. A. G. & SOUZA, R. O. Atividade Enzimática e Antimicrobiana de Fungos Endofíticos Isolados de Soja. **Persp. online: biol. & saúde**, 9 (3), 01-15, 2013.

WISBECK, E.; ROBERT, A. P. & FURLAN, S. A. Avaliação da Produção de Agentes Antimicrobianos Por Fungos do Gênero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente**, v3 (2), 2002.

WHITTAKER, R. H. New Concepts of Kingdoms of Organisms. **SCIENCE**, VOL. 163. 1969.

WOLFE, J. & BRYANT, G. Cellular Cryobiology: Thermodynamic And Mechanical Effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001.

ZJAWIONY, J. K. Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. **Department of Pharmacognosy and National Center for Natural Product Research, Research Institute of Pharmaceutical Sciences**, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, Mississippi 38677-1848. 2003.