



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

FLÁVIA FONTES QUEIROZ CORREIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FUNGO ENDOFÍTICO
Paecilomyces lilacinus (THOM) SAMSON, FRENTE A PATÓGENOS PRESENTES EM
INFECÇÃO ENDODÔNTICA**

MANAUS

2014

FLÁVIA FONTES QUEIROZ CORREIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FUNGO ENDOFÍTICO
Paecilomyces lilacinus (THOM) SAMSON, FRENTE A PATÓGENOS PRESENTES EM
INFECÇÃO ENDODÔNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Antônia Queiroz Lima de Souza – ESA/UEA

Colaborador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza – DQ/UFAM

MANAUS

2014

FLÁVIA FONTES QUEIROZ CORREIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO FUNGO ENDOFÍTICO
Paecilomyces lilacinus (THOM) SAMSON, FRENTE A PATÓGENOS PRESENTES EM
INFECÇÃO ENDODÔNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Antônia Queiroz Lima de Souza
Universidade do Estado do Amazonas

Prof Dr Lourivaldo da Silva Santos
Universidade Federal do Pará

Prof Dr Luiz Antônio de Oliveira
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MANAUS

2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

C824a	<p>Correia, Flávia Fontes Queiroz</p> <p>Avaliação da atividade antimicrobiana do fungo endofítico <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Trom) Samson, frente a patógenos presentes em infecção endodôntica / Flávia Fontes Queiroz Correia. Manaus : [s.n], 2014.</p> <p>79 f.: color.; 29 cm.</p> <p>Dissertação - Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2014.</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>Orientador: Souza, Antônia Queiroz Lima de</p> <p>Coorientador: Souza, Afonso Duarte Leão</p> <p>1. endodontia. 2. fungos endofíticos. 3. antibiosa. I. Souza, Antônia Queiroz Lima de (Orient.). II. Souza, Afonso Duarte Leão (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Avaliação da atividade antimicrobiana do fungo endofítico <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Trom) Samson, frente a patógenos presentes em infecção endodôntica</p>
-------	---

*Dedico este trabalho aos meus pais, meus grandes incentivadores,
que não permitiram que eu desistisse em momentos de dificuldade;*

*Ao meu irmão Fabinho (in memoriam) que me ensinou muito,
mesmo sem ter dito uma palavra;*

*Ao meu avô Zezinho (in memoriam) que desejava ver seus netos formados,
suportando a saudade com mais de 2mil km de distância.*

“Não tenhamos medo de mergulhar na vida. Estamos aqui para ganhar experiência e conhecimento, e pouco aprenderemos se não enfrentarmos a realidade e dermos o máximo de nós mesmos”

Dr Bach

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em cada instante da minha vida e não me deixar desistir nas horas difíceis;

Aos meus pais, Elimar e Paulo, fundamentais na minha vida e formação. Não mediram esforços, saindo da zona de conforto ao lado da família para dar oportunidade de crescimento a mim e ao meu irmão. Que coragem desses dois! Essa conquista é de vocês e para vocês;

Aos meus irmãos Fabinho (*in memoriam*), que mesmo não sabendo falar, ensinou coisas que professor algum pudesse explicar: o amor com ações, carinho, vontade de viver, você faz falta. E Flavio, que me presenteou com uma linda sobrinha e afilhada, Lívia;

Ao meu noivo Willyam, por seu amor e carinho, pela paciência em tempos corridos e por entender minha ausência durante essa realização;

A minha orientadora Prof^a Dr^a Antônia Queiroz Lima de Souza, por me acolher aos 30 minutos do segundo tempo, pelas horas de ensinamento seja no laboratório ou conversas informais, pela orientação na execução desse trabalho, assim como correção quando necessário, o meu muito obrigada;

Ao Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pela orientação na parte química desenvolvida neste trabalho, pelos conselhos e paciência com minha inexperiência na área da química;

Ao Reitor Prof. Dr. Cleinaldo Almeida Costa;

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA;

Aos amigos dos Laboratórios de Genética aplicada a Saúde e Biotecnologia (ESA/UEA) e do Grupo de Espectroscopia de Massas e Microrganismos da Amazônia que aqui fiz: Natalie, Thais, Elissandro, Winnie, Paulo, Sarah, Adriana's, Marta, Greiciane e Fátima pela amizade, compreensão e auxílio nas atividades laboratoriais;

As amigas de turma: Luana, Weena, Janaína, Gabrielly, Daiana, Laila, em especial a Juliana, pela força e companheirismo de sempre;

A Beverly, Vanda e a Danielle, pela compreensão e auxílio;

A CAPES pelos recursos financeiros do projeto Pesquisador Visitante, n. 096/2012;

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro da bolsa concedida.

RESUMO

A endodontia compreende o estudo conservador e radical da polpa dentária, localizada no interior do sistema de canais radiculares. Quando microrganismos da cavidade oral invadem esse sistema, a polpa dentária entra em necrose tecidual, necessitando sua remoção, limpeza e modelagem dos condutos, para posterior obturação, reduzindo assim os patógenos e permitindo que a defesa do organismo atue, impedindo a progressão e/ou induzindo a regressão da doença. Os microrganismos frequentes em infecções endodônticas são: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* entre outros. Com o uso indiscriminado dos antibióticos surgiram várias cepas com resistência aos antibióticos atuais, o que justifica a busca de novos antibióticos. Estes são produzidos em quantidades reduzidas por diferentes fontes, entre estas os vegetais e os microrganismos. Para minimizar o extrativismo da flora, há a alternativa de utilizar microrganismos endofíticos, pois estes podem produzir metabólitos similares aos de sua hospedeira. O fungo endofítico *Paecilomyces lilacinus* foi isolado da planta amazônica *Duguetia flagellaris* (Annonaceae), e foi cultivado em meio líquido: batata, dextrose e extrato de levedura durante 16 dias, a 28 °C de modo estático. Depois foi filtrado, separando a parte líquida da sólida (micélio). O meio líquido fermentado foi submetido a extração em fase sólida (SPE), utilizando acetato de etila/metanol 1:1 e metanol 100%, enquanto que o micélio foi extraído em 3 gradientes. Os dois primeiros igual da SPE e finalizado com etanol 100%. Os extratos foram submetidos a evaporação rotativa, seguida de liofilização e depois foi realizado ensaio de antibiose por difusão em ágar e microdiluição. Todos os cinco extratos apresentaram bons resultados. Para *C. albicans* e *E. faecalis* a dosagem mínima inibitória (MID) dos melhores extratos (G2 e G4) foi 62,5 µg/mL. Para *S. aureus* e *P. aeruginosa* o MID foi menor que 7,81µg/mL para G4. Estes resultados levaram ao fracionamento dos extratos, as análises em cromatografia em camada delgada (CCD), a novos ensaios de microdiluição, bioautografia e descontaminação dos cones de guta percha. Todos os dados obtidos corroboram com a presença de no mínimo seis diferentes moléculas com essas atividades. O fracionamento melhorou o MID para *C. albicans* com 15,62 µg/mL e para os outros extratos não apresentou melhora significativa. A autobiografia com as melhores frações e seus extratos de origem evidenciaram bons resultados para *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A descontaminação dos cones de guta percha foi conduzida com controle de tetraciclina, amplicilina, nistatina e hipoclorito e apresentou resultado semelhante aos controles, contudo melhores que o descrito na literatura. Os extratos e frações de *P. lilacinus* apresentam resultados promissores da inibição de crescimento bacteriano e fungico, podendo ser fonte de compostos para aplicação na odontologia ou em outras áreas da saúde.

Palavras chave: endodontia, fungos endofíticos, antibiose.

ABSTRACT

Endodontics comprises the conservative and radical study of dental pulp, located within the root canals system. Once that oral microorganisms invade this system, the dental pulp enters in tissue necrosis, necessitating its removal, cleaning and shaping of the canals for posterior fillings, thereby reducing pathogens and allowing the body's defense to act, by preventing the progression and / or inducing regression of the disease. The common microorganisms in endodontic infections, which were used in this study are: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. With the widespread use of antibiotics, several strains with resistance to current antibiotics has appeared, what justifies the search for new drugs of the genre. These are produced in small quantities by different sources, among them, plants and microorganisms. To minimize the extraction of flora, there is the alternative of using the endophytic microorganisms, since they may produce similar metabolites of those from its host. The endophytic fungus *Paecilomyces lilacinus* was isolated from the Amazonian plant *Duguetia flagellaris* (Annonaceae), and it was cultured in broth: potato, dextrose and yeast extract for 16 days, at 28°C in a static mode. Then it was filtered, by separating the liquid portion (broth with secondary metabolites) from the solid one (mycelium). The broth was submitted to SPE extraction by using ethyl acetate / methanol 1:1 and methanol 100%, while the mycelium was extracted in 3 gradients. The first two gradients were equal of the SPE, and the last one was finished with 100% ethanol. The extracts were submitted to rotary evaporation, followed by lyophilization, and subsequently the antibiosis test by agar diffusion and microdilution was made. All the five extracts presented good results. For *C. albicans* and *E. faecalis*, the MID for the best extracts was (G2 and G4) with 62.5 mg / mL. For *S. aureus* and *P. aeruginosa*, it was (G4) less than 7.81 mg / mL. These results led to the fractionation of the extracts, to analyzes in CCD, to new tests of microdilution, bioautographic and decontamination of Gutta-Percha cones. All the obtained data corroborate the presence of at least six different molecules with these activities. The fractionation improved the MID for *C. albicans* with 15.62 mg / mL and to the other extracts presented no significant improvement. The bioautography with the best fractions and their extracts of origin showed good results for *C. albicans*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The decontamination of Gutta-Percha cones was conducted with control of tetracycline, ampicillin, nystatin and sodium hypochlorite, presenting similar result to the controls. The extracts and fractions of *P. lilacinus* presented promising results of the inhibition of bacterial and fungal growth, and can be a source of compounds for use in dentistry or other health areas.

Keys-words: endodontic, endophytic fungi, antibiosis.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>E. faecalis</i>	50
Tabela 2: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>P. aeruginosa</i>	50
Tabela 3: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>S. aureus</i>	51
Tabela 4: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>C. albicans</i>	52
Quadro 1: Códigos dos extratos brutos produzidos a partir de <i>P. lilacinus</i>	37
Quadro 2: Concentrações das amostras nos poços.....	40
Quadro 3: Identificação para a segunda etapa de ensaios biológicos quantitativos.....	41
Quadro 4: Rendimento da fração orgânica	42
Quadro 5: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>E. faecalis</i>	49
Quadro 6: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>P. aeruginosa</i>	50
Quadro 7: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>S. aureus</i>	51
Quadro 8: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente <i>C. albicans</i>	52
Quadro 9: Dosagem Inibitória Mínima frente <i>E. faecalis</i>	53
Quadro 10: Dosagem Inibitória Mínima frente a <i>P. aeruginosa</i>	53
Quadro 11: Dosagem Inibitória Mínima frente <i>S. aureus</i>	54
Quadro 12: Dosagem Inibitória Mínima frente <i>C. albicans</i>	54
Quadro 13: Resultados da concentração inibitória mínima frente <i>E. faecalis</i>	55
Quadro 14: Resultados da concentração inibitória mínima frente <i>P. aeruginosa</i>	55
Quadro 15: Resultados da concentração inibitória mínima frente <i>S. aureus</i>	56
Quadro 16: Resultados da dosagem inibitória mínima frente <i>C. albicans</i>	57
Quadro 17: Resultado da avaliação das MFD e MBD dos extratos e frações dos metabólitos secundários de <i>P. lilacinus</i>	62
Quadro 18: Ensaios de bioautografia e seus controles com os extratos e frações ativos.....	60
Quadro 19: Contagem das UFC obtidas na descontaminação dos cones de guta percha	61
Quadro 20: Quantidade de UFC/mL obtida após a descontaminação	62
Quadro 21: Fatores de retenção (Rf) de extratos e frações de <i>P. lilacinus</i> com atividade biológica na bioautografia	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vista do molar superior com o sistema de canais radiculares. Fonte: KRAVER, 2010.	17
Figura 2: Luz do canal radicular e túbulos dentinários contaminados com <i>Enterococcus faecalis</i> em microscópio eletrônico de varredura. Fonte: BERBER, 2005.	19
Figura 3: Aspectos da reativação do fungo endofítico <i>P. lilacinus</i> , em BDA a 28 °C.....	32
Figura 4: Esquema do microcultivo realizado para <i>P. lilacinus</i>	33
Figura 5: Crescimento de <i>P. lilacinus</i> de modo estático.	35
Figura 6: Extração em fase sólida (SPE) do meio fermentado.	37
Figura 7: Liofilização de extratos orgânicos de <i>P. lilacinus</i>	38
Figura 8: Ensaio quantitativo para aferir a Dosagem Inibitória Mínima	40
Figura 9: CCD eluindo na fase móvel (acetato de etila e metanol 8,5:1,5)	43
Figura 10: Revelação física com luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254nm e 365nm, respectivamente, das placas CCD das amostras de <i>P. lilacinus</i>	44
Figura 11: Esquema para cálculo do fator de retenção (Rf).....	44
Figura 12: Esquema da descontaminação dos cones de guta-percha utilizados nesta pesquisa	45
Figura 13: Descontaminação com a fração orgânica A5 do extrato obtido do meio de cultura fermentado de <i>P. lilacinus</i>	45
Figura 14: Aspectos macro-micromorfológicos de <i>Paecilomyces lilacinus</i> utilizado nesta pesquisa na primeira fileira (A) e em (B) aspectos macro-micromorfológicos da literatura. ..	48
Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos da PCR dos primer Its 1 e Its 2 de fungos endofíticos de <i>Duguetia flagellaris</i>	49
Figura 16: Halo de inibição formado com extrato G5 frente a <i>Candida albicans</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UEA	Universidade do Estado do Amazonas
ESA	Escola Superior de Ciências da Saúde
FIOCRUZ	Fundação Osvaldo Cruz
CFAM	Coleção de Fungos da Amazônia
CBAM	Coleção de Bactérias da Amazônia
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
mg/mL	Miligrama por mililitro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
rpm	Rotação por minuto
°C	Graus Celsius
SB	Sabouraud
BHI	Brain Heart Infusion
BDL	Batata, dextrose e extrato de levedura
BDA	Batata, dextrose e ágar
ISP2	Ágar extrato de levedura- extrato de malte
CYA	Ágar Extrato de Levedura-CZAPEC
CZAPEC	Ágar CZAPEC
DMSO	Dimetilsulfóxido
NBT	Nitroazul de tetrazólio
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
SPE	Extração em fase sólida
MID	Dosagem Inibitória Mínima
MBD	Dosagem Mínima Bactericida
MFD	Dosagem Mínima Fungicida
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
R _f	Fator de retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Endodontia	17
2.2	Resistência microbiana aos antibióticos	22
2.3	<i>Duguetia flagellaris</i> (Annonaceae).....	23
2.4	Microrganismos endofíticos	24
2.5	Atividade antimicrobiana de endófitos	26
2.6	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	27
3	justificativa.....	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	Geral	31
4.2	Específicos	31
5	METODOLOGIA	32
5.1	Reativação e cultivo de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	32
5.2	Identificação morfológica	32
5.3	Identificação molecular	33
5.4	Identificação química.....	34
5.5	Produção de extratos orgânicos	34
5.5.1	Inóculo.....	34
5.5.2	Cultivo de <i>P. lilacinus</i>	35
5.5.3	Filtração.....	35
5.5.4	Obtenção de extratos orgânicos	35
5.5.5	Concentração e liofilização	37
5.6	Ensaio das atividades antimicrobianas	38
5.6.1	Reativação e cultivo dos microrganismos teste	38
5.6.2	Preparo das amostras.....	39
5.6.3	Preparo dos controles	39
5.6.4	Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana – Difusão em Ágar	39
5.6.5	Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana – Dosagem Inibitória Mínima (MID).....	39
5.7	Fracionamento dos extratos	41
5.8	Bioautografia	42

5.8.1 Cultivo dos patógenos e preparo do inóculo.....	42
5.8.2 Cromatografia em camada delgada.....	42
5.9 Descontaminação dos cones de guta percha.....	44
5.10 Análise Estatística.....	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1 Consideração geral.....	47
6.2 Taxonomias morfológicas, molecular e química.....	47
6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>P. lilacinus</i>	49
6.3.1 Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana – Difusão em Ágar.....	49
6.3.2 Avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana – Dosagem Inibitória Mínima (MID).....	52
6.3.3 Avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana das frações dos extratos de <i>P. lilacinus</i> – Dosagem Inibitória Mínima (MID)	55
6.4 Bioautografia	59
6.5 Descontaminação dos cones de guta percha.....	61
7 CONCLUSÃO	64
8 PERSPECTIVAS.....	65
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
10 ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

A endodontia compreende o estudo conservador e radical do sistema de canais radiculares e a região periapical. O tratamento endodôntico é indicado em duas situações básicas: inflamação pulpar irreversível e necrose pulpar com ou sem lesão periapical, seja ela causada por agentes biológicos, químicos ou físicos (QUEIROZ, 2013). Com o estudo de Kakehashi *et al* (1965), foi comprovada a correlação entre microrganismos e degenerações pulpares, tendo esses microrganismos papel decisivo no desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais. O objetivo do tratamento endodôntico é eliminar ou reduzir a quantidade de microrganismos viáveis dentro do sistema de canais radiculares, para permitir que o organismo possa iniciar o processo de reparação, caso alterações periapicais tenham iniciado (MAGALHÃES, 2006; TODA, 2010).

No organismo, uma infecção oportunista pode ser eliminada pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo necessário auxílio de antibióticos em alguns casos. Porém a logística da vascularização do sistema de canais radiculares é diferenciada, sendo a circulação terminal que dificulta o transporte de células de defesa e substâncias ativas dos antibióticos, logo os antimicrobianos atuam apenas impedindo a disseminação da infecção, contudo não eliminam os microrganismos dentro do canal radicular, permanecendo o processo infeccioso. Para que a infecção seja sanada, é necessária a atuação do endodontista dentro do canal radicular, utilizando mecanismos de limpeza, sejam instrumentos endodônticos e substâncias químicas com atividade antimicrobiana que atuem onde os instrumentos não conseguem devido a questões anatômicas (LEONARDO & LEAL, 1998). Mesmo com esse conhecimento, ainda ocorre a prescrição indiscriminada de antimicrobianos ocasionando a resistência de alguns patógenos pelo processo de seleção natural (TORTAMANO *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2010).

Com o avanço da resistência microbiana das doenças infecciosas na população mundial, surge a necessidade de descobrir novos princípios ativos com ação farmacológica frente a esses microrganismos. Novos produtos devem ser desenvolvidos para suprir a demanda do mercado, buscando na biodiversidade e na medicina popular fontes de novas pesquisas. O uso empírico de plantas denominadas medicinais, mas sem comprovação científica sugere novas pesquisas de recursos biológicos com intuito de identificar princípios ativos de uso comercial nas indústrias alimentícia, cosmética, química e farmacêutica. (BACON & WHITE JR, 2000; AZEVEDO, 2003; STROBEL & DAISY, 2003; FIGUEIREDO, 2006; CHOMCHEON *et al*, 2008; MACÍAS-RUBALCAVA *et al*, 2008; CUI *et al*, 2012). Pasteur descobriu a

fermentação provocada por células vivas, com isso surgiram pesquisas sobre microrganismos como fonte de produtos bioativos (STROBEL & DAISY, 2003). Em seguida Fleming descobre a penicilina (oriunda do fungo *Penicillium notatum*), que salvou milhares de militares na Segunda Guerra Mundial, iniciando uma nova era de progressos para a medicina e para a humanidade, a era dos antibióticos.

Nas plantas, podem ser encontrados microrganismos no seu exterior (epifíticos) e no seu interior (endofíticos) que a utilizam com habitat natural, estes microrganismos podem produzir metabólitos secundários semelhantes aos produzidos pela planta que os albergam, com a vantagem de serem reproduzidos facilmente em laboratório otimizando o tempo e reduzindo custo para obtenção do princípio ativo desejado, além de preservar a flora (LIN *et al* 2007; YIN & SUN 2011; YOU *et al*, 2012). Desde a década de 80 plantas usadas por grupos tradicionais (índios, ribeirinhos, quilombolas e etc...) tem suas aplicações investigadas como interessante fonte de bioativos, assim como seus microrganismos endofíticos, que podem produzir os mesmos metabólitos ou atuar em sinergia (CHOMCHEON, 2008; MACÍAS-RUBALCAVA *et al*, 2008; KUSARI, PANDEY & SPITELLER, 2012).

Entre os relatos da literatura que demonstram essa possibilidade cruzada de microrganismos endofíticos produzirem as mesmas substâncias ou substâncias similares as da planta hospedeira podemos citar o mais conhecido, que é do Taxol. Onde primeiro foi descoberto uma nova espécie *Taxus andreane*, que possuía a mesma capacidade de produção do Taxol. Estudos posteriores demonstraram que outros microrganismos endofíticos (*Pestalotiopsis microspora*, *Fusarium solani* e outros) apresentavam a mesma habilidade que a planta hospedeira de produzir o Taxol, a continuidade das investigações evidenciou que *Pestalotiopsis microspora* era o melhor produtor e que essa produção diferenciava-se na biossíntese. A descoberta de que vários microrganismos de gêneros diferentes isolados *Taxus* spp. tem a capacidade de produzir Taxol sugerem a possibilidade que ao longo da co-evolução destes endófitos com a planta hospedeira tenha ocorrido uma transferência de genes da planta hospedeira (é o mais aceitável) para os microrganismos ou vice-versa. Essa capacidade chamada de Transferência Gênica Horizontal, têm sido investigada desde então e outros dois trabalhos merecem ser destacados aqui, ambos trabalhos brasileiros que foram pioneiros dentro do país (STROBEL *et al*, 2003; SOUZA, 2006).

O primeiro relato de Geris e Rodrigues-filho (2002, 2003a, 2003b) que isolaram pela primeira vez, de um *Penicillium* endofítico várias substâncias da classe dos meroterpenos, dentre estas algumas inéditas. Os meroterpenos são uma classe de substâncias que possuem uma biogênese mista, envolvendo uma parte terpenoídica e outra policetílica. Essa classe de

substâncias tem sido isolada de plantas da família Meliaceae e foi justamente de uma espécie desta família, *Melia azedarach*, que os autores isolaram o fungo *Penicillium brasilianum*. Anterior a eles essa classe havia sido descrita apenas para algumas plantas da família Meliaceae e para um *Penicillium* de origem marinha. Este relato fortalece a ideia de uma Transferência Gênica Horizontal com estes grupos de organismos.

O segundo relato é de Guimarães e Colaboradores (2013) que descrevem a diversidade de microrganismos endofíticos de *Cladocolea micrantha*, uma das plantas conhecidas como erva-de-passarinho na região Amazônica e cujo estudo químico levou ao isolamento de lignanas, inéditas para fungos, mas comum entre as substâncias isoladas da família Loranthaceae. Mais uma vez parece que os microrganismos “adquiriram” a mesma capacidade de suas hospedeiras. São resultados de pesquisas como estas e a necessidade de novos produtos naturais para o controle de infecções que nos impulsionam a buscar novas fontes. Com isso, o objetivo do presente estudo propõe avaliar a atividade biológica do fungo endofítico *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson 1974 em inibir o crescimento de patógenos presentes em infecção endodôntica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endodontia

Endodontia é a especialidade da odontologia que estuda a polpa dental, o sistema de canais radiculares (Figura 1) e os tecidos periapicais, sua aplicabilidade é conhecida popularmente como tratamento de canal. O tratamento endodôntico consiste na eliminação dos microrganismos do sistema de canais radiculares e a prevenção de reinfecção (PIZZO et al 2006), visando o restabelecimento da função do dente. Tal procedimento é realizado através da limpeza e modelagem do canal radicular, por meio do emprego de instrumentos endodônticos, de substâncias ou soluções químicas auxiliares, da irrigação-aspiração, e do selamento dessa cavidade endodôntica, que outrora fora ocupado pela polpa dental, impedindo o início ou progressão da infecção (LOPES & SIQUEIRA JR, 2004; TORABINEJAD *et al*, 2010).



Figura 1: Vista do molar superior com o sistema de canais radiculares. Fonte: KRAVER, 2010.

Durante a desinfecção mecânica, realizada com instrumentos endodônticos (manuais e rotatórios), é utilizada uma substância química auxiliar, sendo mais comum o uso do hipoclorito de sódio ou clorexidina; essas substâncias tem a função de suspender os detritos oriundos da instrumentação (para que esses possam ser aspirados com facilidade), além de penetrar nos túbulos dentinários, que são locais inacessíveis para instrumentos mecânicos

porém com espaço suficiente para os microrganismos colonizarem, elas também atuam na descontaminação dos cones de Guta Percha pois sofre deformação se for esterilizado em autoclave (SOUZA *et al*, 2003). Quando o tratamento não pode ser concluído em uma única sessão, uma medicação intracanal deve ser empregada, sendo as mais comuns: hidróxido de cálcio, tricresolformalina, para-clorofenol, solução otológica (contendo corticóides e antibióticos), com veículos aquosos e viscosos. Essas substâncias podem ser combinadas ou não, dependendo da sua indicação. Para a obturação do sistema de canais radiculares, são utilizadas substâncias com atividade antimicrobiana comprovada, a fim de eliminar os microrganismos que não foram eliminados durante o tratamento (PEDROSO, 2000). A obturação dos canais radiculares representa a última etapa do tratamento endodôntico, tendo como objetivo o selamento mais hermético possível, preenchendo tridimensionalmente a cavidade pulpar com um material sólido, Guta-Percha, e outro plástico, cimento endodôntico (BORTOLINI, 2006; TOMAZINHO & OLICSHEVIS; PÉCORA *et al*, 2002; QUEIROZ, 2011).

Antony van Leewenhoek foi o primeiro autor a cogitar a possibilidade de microrganismos dentro do canal radicular em 1697, mesmo com ausência de recursos tecnológicos. Miller, em 1894, conseguiu realizar o isolamento de bactérias presentes nos canais radiculares, e encontrou as seguintes morfologias: cocos, bacilos e espirilos, mesmo com as limitações da época (FLEURY & DEBELIAN, 1998). Inclusive com esses estudos, antigamente, a presença de microrganismos nas doenças pulpares e periapicais não era comprovada cientificamente, até 1965, ano em que Kakehashi *et al* publicou um estudo clássico comprovando a influência de microrganismos no desenvolvimento de alterações pulpares, onde a polpa dental de ratos convencionais e *germ free* foram expostas ao meio bucal. Os ratos convencionais apresentaram necrose pulpar associada a alterações periapicais; em contraste os ratos “livres de germes” não apresentaram sinais de necrose pulpar, evoluindo para reparação com formação de ponte de dentina após 28 dias de exposição ao meio bucal.

A presença de microrganismos tem sido relatada, mesmo após o preparo biomecânico bem realizado do sistema de canais radiculares, a persistência microbiana e crescimento nos túbulos dentinários, canais laterais e ramificações apicais também foram relatadas. Os microrganismos residuais, juntamente com os presentes na cavidade oral, caso a cavidade de acesso não tenha sido selada adequadamente, tem facilidade para repovoar os canais vazios, podendo ocasionar lesão periapical ou persistência da mesma (LOPES & SIQUEIRA, 2010; GALLINA *et al*, 2006). Alguns fatores contribuem para essa situação: complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, limitações ao acesso de instrumentos, substância

química auxiliar e medicação intracanal. A vulnerabilidade das espécies envolvidas também favorece a reinfecção (VIVACQUA-GOMES *et al*, 2005; CHIVATXARANUKUL *et al*, 2008).

Além da complexidade anatômica dos canais radiculares, o diâmetro dos túbulos dentinários tem grande influência na manutenção da infecção, pois ele chega a ser três vezes maior que *E. Faecalis*, e sete vezes menor que um glóbulo vermelho. Esses tamanhos favorecem a penetração dos microrganismos nos túbulos dentinários (Figura 2), impedindo que os instrumentos endodônticos, soluções químicas auxiliares e medicações intracanal possam atuar. Contudo essa infecção persiste somente se tiver substrato necessário para manutenção da viabilidade das bactérias e possivelmente fungos (GOMES, 2000).

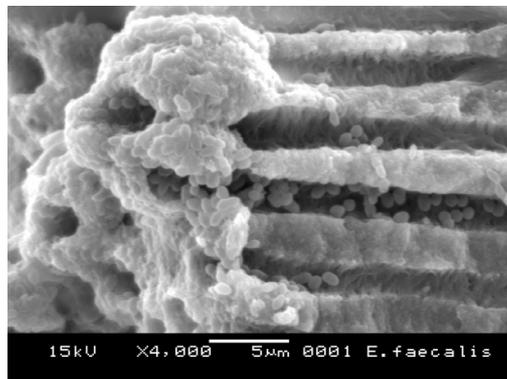


Figura 2: Luz do canal radicular e túbulos dentinários contaminados com *Enterococcus faecalis* em microscópio eletrônico de varredura. Fonte: BERBER, 2005.

As infecções endodônticas são classificadas em primárias e secundárias de acordo com o momento que elas acontecem. A infecção endodôntica primária ocorre quando há o primeiro contato de microrganismos com a polpa, evoluindo para necrose pulpar. Nessa fase, a microbiota é polimicrobiana, envolvendo diversos microrganismos e devido as condições dentro do canal radicular, as bactérias anaeróbias estritas constituem a microbiota majoritária (TAVARES *et al*, 2011). A infecção secundária ocorre quando os microrganismos patogênicos dão continuidade ou recolonizam o sistema de canais radiculares após a intervenção profissional realizada com deficiência, existe uma subclassificação que é denominada persistente, na qual os microrganismos conseguem resistir a terapia endodôntica bem conduzida, sendo caracterizada pela reduzida quantidade de espécies microbianas e na maioria das vezes ter uma única cultura associada (MAGALHÃES, 2006; FERRARI *et al*, 2007; MURAD *et al*, 2014). Este fato ocorre porque um dos contaminantes possui um arsenal

enzimático capaz de degradar os antibióticos administrados, o que a genética chama de RAMs (Resistência Adquirida a Medicamentos) e que qualquer organismo vivo pode apresentar dependendo do seu potencial genético, mas que para os microrganismos merece um olhar especial, devido a presença dos plasmídios (sequências gênicas extracromossomal) que podem infectar outras células (já descrito para bactérias e fungos) transmitindo a capacidade de resistência aos antibióticos.

Ao contrário das infecções endodônticas primárias, que tem diversos microrganismos, sendo predominantemente os bacilos Gram negativos e anaeróbios, as infecções endodônticas secundárias são compostas por uma ou poucas espécies de microrganismos (STUART *et al*, 2006). Dentre esses, a espécie *Enterococcus faecalis* é a que tem demonstrado interesse clínico. Esta é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa (VIVACQUA-GOMES *et al*, 2005), normalmente encontrada em humanos e animais no trato gastrointestinal, sem causar danos ao hospedeiro. Esse microrganismo é mais encontrado em casos de insucesso no tratamento endodôntico e estão relacionados a infecções persistentes (BODRUMLU *et al*, 2006), pois tem resistência a antimicrobianos e a capacidade de se adaptar a mudanças e agentes agressivos (ABINADER, 2005; TOMAZINHO *et al*, 2007; ARIAS-MOLIZ *et al*, 2009; DARRAG, 2013), tais como ambientes com pH extremamente alcalino (como ocasionado pela medicação intracanal: hidróxido de cálcio) (CHIVATXARANUKUL *et al*, 2008; RADCLIFFE *et al*, 2004) e concentrações de sal (STUART *et al*, 2006), além de mínima comensalidade com outras bactérias (BERBER *et al*, 2006).

Outro microrganismo que tem relevância na endodontia é *Staphylococcus aureus*, mesmo não possuindo um papel significativo em infecções orais, ele está presente na microbiota mista de abscessos odontogênicos, sendo associado a doenças mais severas: celulites, osteomielites, trombose do seio cavernoso, septicemia, mediastinite (MOURA *et al*, 2010). Caso o paciente esteja imunodeprimido, as bactérias penetram no sistema linfático e retículo endotelial, produzindo bacteremia em diversas áreas do corpo. É uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, que foi identificada como resistente a algumas soluções irrigadoras utilizadas em endodontia (SENA, 2009; ALVES *et al*, 2012).

A bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* tem forma de bastonete, e é frequentemente associada a infecções periodontais, podendo ser encontradas em infecções endodônticas secundárias, porém há relatos da presença desse microrganismo em infecções primárias. Essa espécie tem a capacidade de formar biofilme, e com isso são resistentes a antibióticos, soluções anti-sépticas (clorexidina 0,12%) e soluções químicas auxiliares em altas concentrações (hipoclorito de sódio a 5,25%). Devido a presença dessas características,

P. aeruginosa tem sido apontada como uma possível causa de insucesso da terapia endodôntica (OYAMA *et al*, 2009; PHEE *et al*, 2013).

Além das bactérias, os fungos também tem sido relatados na infecção endodôntica, sendo espécies de *Candida* as mais encontradas. A levedura *C. albicans* é um fungo endógeno, que habita a microbiota bucal de pessoas saudáveis, sendo considerado um patógeno oportunista quando há desequilíbrio na imunidade do hospedeiro, tem a capacidade de viver como comensais em locais distintos do organismo (boca e canal vaginal), passando por processo de adaptação nas variações de pH neutro do sistema sanguíneo, até um pH ácido do canal vaginal, tem a capacidade de formar biofilme, tornando-se mais resistente a antifúngicos nessa condição. Acredita-se que essa levedura é mais encontrada nos casos de infecções secundárias (RADCLIFFE *et al*, 2004) devido a resistência as soluções químicas auxiliares e medicação intracanal (FERRARI *et al*, 2007), porém os autores Möller (1996), Debelian *et al* (1997), Lana *et al* (2001), Sen *et al* (1995), Baumgartner *et al* (2000) e Siqueira *et al* (2002) relataram a presença de *C. albicans* em dentes com infecção endodôntica primária, utilizando métodos de cultura, microscópio eletrônico de varredura e reação em cadeia polimerase (PCR) (BAUMGARTNER *et al*, 2000; FERGUSON *et al*, 2002; SIQUEIRA JR *et al*, 2003; SIQUEIRA JR *et al.*, 2004).

Gomes *et al* (2004) avaliaram a microbiota presente nos canais radiculares da infecção primária e secundária. Foram avaliados 60 dentes, sendo 41 diagnosticados como necrose pulpar (infecção primária) e 19 com insucesso do tratamento endodôntico (infecção secundária). Foram isolados 224 microrganismos cultiváveis, sendo 188 isolados de dentes com necrose pulpar, 72% destes eram bactérias anaérobias estritas; e 36 bactérias isoladas de dentes com insucesso do tratamento endodôntico, sendo 16 facultativos. Um único microrganismo foi encontrado em 8 casos, quatro casos com 2 microrganismos isolados (*Streptococcus sanguis* e *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces odontolyticus*, de canais com infecção primária; *Peptostreptococcus micros* e *P. prevotii*, *Propionibacterium acnes* e *E. faecalis*, de canais com infecção secundária) e quarenta e dois casos com 3 ou mais espécies patogênicas por canal avaliado.

Lopes & Siqueira (2010) apresentam os gêneros frequentemente encontrados em dentes infectados e os classificou de acordo com a origem: infecção primária (*Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*) e infecção secundária (*Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia* e fungos).

2.2 Resistência microbiana aos antibióticos

Com o uso indiscriminado dos antibióticos, as bactérias estão sofrendo processo de seleção natural em humanos e animais, as bactérias consideradas resistentes tem desenvolvido mecanismos moleculares que degradam o composto químico com atividade antimicrobiana, por exemplo, as bactérias produtoras da enzima beta-lactamase que degradam o anel betalactâmico dos antibióticos classificados como beta-lactâmicos (SANTOS, 2004).

Com frequência os microrganismos utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos; assim, a ação conjunta de múltiplos mecanismos pode produzir um acentuado aumento da resistência aos antimicrobianos. A resistência a determinado antimicrobiano pode constituir uma propriedade intrínseca de uma espécie ou uma capacidade adquirida. Para adquirir resistência, o microrganismo deve alterar seu DNA, o que ocorre de duas formas: 1.através de mutações espontâneas e/ou 2.adquiridas de genes heterólogos.

Os genes de resistência a antibióticos quase sempre fazem parte do DNA de plasmídeos extracromossomal e podem ser transferidos entre os microrganismos. Alguns genes de resistência fazem parte de unidades de DNA denominadas *transposons* (elementos transponíveis) que se movem ao longo dos genomas, entre cromossomos e plasmídeos, promovendo a troca e/ou a inserção de genes heterólogos. O DNA heterólogo pode ser adquirido mediante transformação e recombinação gênica, resultando em trocas de DNA extracromossômico dentro e entre espécies, com subsequente recombinação intra e interespecífica que ocasionará as diferentes formas de resistência microbianas aos antibióticos (LIVERMORE *et al.*, 2001).

Stuart Levy (1997) em seu livro “Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread”, demonstra que após 50 anos de uso indiscriminado dos antibióticos várias formas de resistência foram selecionadas (HENRIQUE-CAMPOS *et al.*, 2005), são elas: 1.alteração da permeabilidade da membrana plasmática (NIKAIDO, 1994), 2.alteração do sítio de ação do antibiótico (BUSH *et al.*, 1995), 3.bomba de efluxo, 4.mecanismo enzimático (HIRAMATSU *et al.*, 1997; BRADFORD, 2001; BRANDILEONE *et al.*, 2006) e 5.mecanismo de animação (LIVERMORE *et al.*, 2001; JACOBY, 2005; RICE, 2006). Essa resistência aos medicamentos elevam os custos dos tratamentos em hospitais públicos e são responsáveis pela morte de milhões de indivíduos em todo o mundo (RUBIN *ET AL.*, 1999; CARVALHANAS *ET AL.*, 2005; CAMARGOS *ET AL.*, 2006).

Geralmente, a prescrição de antibióticos não é uma prática comum do endodontista em alterações pulpares e infecções crônicas, a não ser que esteja ocorrendo complicações de

origem endodôntica (abscessos e celulites), com sinais e sintomas de disseminação da infecção. Esse hábito está embasado no conhecimento científico do processo, uma vez que a presença de bactérias ocorre quando iniciou o processo de morte pulpar, e com ela vasos sanguíneos e nervos. Como os antibióticos são administrados por via sistêmica, aquele deveria penetrar no tecido pulpar através do forame apical, contudo essa circulação está restrita, sendo o antibiótico sistêmico ineficiente nessa região, logo é contra-indicado quando não há evidências de complicações sistêmicas (TORTAMANO *et al*, 2008; OLIVEIRA *et al*, 2010; SANTI, 2013).

2.3 *Duguetia flagellaris* (Annonaceae)

A família Annonaceae, por apresentar uma combinação de caracteres marcantes, é uma das mais uniformes tanto do ponto de vista anatômico como estrutural, é uma das mais primitivas e maiores entre as Angiospermas basais. É constituída por cerca de 135 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, distribuídas principalmente pelas regiões tropicais do globo. Dos gêneros que compõem esta família, 34 podem ser encontrados na América do Sul, no Brasil, ocorrem cerca de 26 gêneros, incluindo o *Duguetia* com 50 espécies. As espécies dessa família apresentam folhas simples, dispostas alternadamente no mesmo plano ao longo dos ramos. Tem grande importância econômica como fonte de frutos comestíveis como a fruta do conde/pinha (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*A. muricata* L.). Muitas espécies dessa família são utilizadas como plantas medicinais, sendo sua bioatividade atribuída a alcalóides, acetogeninas e flavonóides. As atividades biológicas descritas são antimicrobiana, inseticida e antiparasitária (FORMAGIO *et al*, 2010).

Duguetia flagellaris Huber é uma árvore que ocorre em platôs e vertentes de florestas tropicais no Norte da América do Sul, sendo abundante no sub-bosque de florestas de terra firme da Amazônia Central. Sua abundância é similar em locais próximos a bordas de clareira ou de florestas e em locais de interior de floresta, contrastando com outras espécies arbóreas de sub-bosque abundantes em florestas tropicais que têm abundância menor em bordas em relação ao interior das florestas (DI MIGUELI, 2008).

O estudo feito com o extrato etanólico de *D. trunciflora*, tem importância quimiotaxonômica, pois mostrou que esta espécie é rica em alcalóides como têm acontecido com outras do mesmo gênero estudadas anteriormente. Um levantamento sobre o gênero *Duguetia*, feito no Banco de Dados NAPRALERT, Chemical Abstract e Biological Abstracts, mostrou que nas oito espécies descritas na literatura, todas de ocorrência Sul Americana,

foram isolados um total de 79 substâncias, dessas, 72 são alcalóides (NAVARRO *et al*, 2001). Muhammad *et al* (2002), foram os responsáveis pelo primeiro relato de alcalóides dioxoazaaporphine e copyrine nesse gênero. O extrato da casca do caule mostrou atividade antimalárica e antifúngica suficiente para justificar fracionamento biomonitorado.

Fechine *et al*, (2002) isolaram seis alcalóides das folhas e galhos finos de *D. trunciflora*. As substâncias foram identificadas através de métodos espectroscópicos usuais de RMN de ^1H e ^{13}C (200 e 50 MHz respectivamente) e comparação com dados da literatura. Os dados espectroscópicos dos alcalóides isolados de *D. trunciflora* 1-6. Isolou-se um alcalóide benzilisoquinolínico (1), quatro tetrahidroprotoberberínicos (2-4) e um do tipo berberínico (6). Os alcalóides 1, 3, 5 e 6 foram relatados pela primeira vez no gênero *Duguetia*.

2.4 Microrganismos endofíticos

Os endófitos são descritos como microrganismos que estabelecem uma relação endossimbiótica (NIMNOI, PONGSILP & LUMYONG, 2010) ou definidos como organismos que vivem no interior dos tecidos vegetais sem causar prejuízos internos e externos a planta (FIGUEIREDO, 2006; MACÍAS-RUBALCAVA *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2012; ZHANG, WEI & WANG, 2012), podendo atuar em mutualismo com o hospedeiro, promovendo aumento de crescimento, redução de doenças severas, induzindo mecanismos de defesa (SILVA *et al.*, 2012). Os endófitos podem ser encontrados nos diferentes órgãos da planta, tais como: raízes, caules, folhas, frutos, flores e sementes (NIMNOI, PONGSILP & LUMYONG, 2012). A distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos e patógenos é apenas didática, facilitando o estudo. Um microrganismo, que a princípio, é considerado endófito pode tornar-se um patógeno latente ou não à planta hospedeira dependendo das condições fisiológicas desta; assim como um microrganismo denominado epifítico pode ser encontrado no interior dos tecidos vegetais (AZEVEDO, 1998). Souza (2014) comunicação pessoal, afirmou que para alguns pesquisadores, na era das ômicas (proteômica, metabolômica e metagenômica), esta visão vem sendo alterada devido a especificidade adquirida e aos novos grupos de microrganismos que tem sido descritos. Estes apresentam uma afinidade muito grande pelo ambiente que colonizam, sendo impossível cultivá-los sem imitar esses ambientes, muitos dos endófitos encontram-se neste grupo especial de organismos.

Os endófitos apresentam grande interesse biotecnológico, são utilizados como fonte de metabólitos secundários, como o paclitaxel (taxol), uma droga anticancerígena, que combate o

câncer de mama, ovário e Sarcoma de Kaposi. Essa droga pode ser obtida da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), uma árvore que cresce lentamente, sendo necessária grande quantidade da mesma para obter o taxol. Com isso as pesquisas avançaram buscando outra forma de obter esse princípio ativo. Foi então descoberto um microrganismo produtor do taxol, otimizando a fabricação da droga, bastante utilizada no tratamento de câncer. (CORRÊA, 1995; STROBEL & DAISY, 2003; LI & TAO, 2009).

Bactérias e fungos compõem a diversidade microbiana endofítica, sendo os fungos mais frequentemente encontrados. Muitos tem aplicações biotecnológicas, como a inibição de crescimento de patógenos (STROBEL & DAISY, 2003), de grande interesse para a agricultura. Voll *et al* (2010) avaliaram os efeitos do ácido aconítico em sementes e fungos endofíticos sobre algumas espécies de plantas daninhas (amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*), picão-petro (*Bidens pilosa*), corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia*) guaxuma (*Sida rhombifolia*)) em diferentes locais do estado do Paraná, foi observado na presença de endófitos um estímulo ao crescimento e um efeito inibitório sobre as sementes estudadas, sofrendo influência do local de coleta, restringindo a competição por nutrientes.

Schulz *et al* (2002) com 12 anos de estudos, isolaram 6.500 fungos endofíticos de herbáceas e árvores que foram triados de acordo com sua atividade biológica com intuito de encontrar novos metabólitos e obter novos produtos industriais, este estudo sugere que o mutualismo entre os endófitos e as plantas hospedeiras produzem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e anti-herbicida.

Fernandes *et al* (2009) isolou 22 fungos endofíticos do café (*Coffea arabica* L.), e testaram os isolados contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, sendo que *A. alternata* apresentou os melhores resultados, quando analisados sua atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral.

Os endófitos também são utilizados no controle biológico de fitopatógenos. Silva *et al* (2012) avaliaram os microrganismos endofíticos, bactérias e fungos, no controle biológico de *Hemileia vastatrix*, que provoca a ferrugem na folha de café. Cepas bacterianas (*E. fergusonii*, *A. Calcoaceticus* e *Salmonella enterica*) mostraram-se eficientes na promoção do crescimento da planta, e outras (*Brevibacillus choshinensis*, *S. entérica*, *P. carotovorum*, *B. megaterium*, *Microbacterium testaceum*, *Cedecea davisae*) reduziram significativamente a severidade da doença quando inoculadas 72 horas antes do contato com o fitopatógeno, no entanto os fungos não demonstraram qualquer atividade.

Em relação a recuperação ambiental de áreas contaminadas, os microrganismos endofíticos também demonstram seu potencial de aplicação, como o estudo realizado por

Oliveira (2009) que teve como objetivo isolar e identificar microrganismos presentes em áreas contaminadas com hidrocarbonetos (petróleo e derivados), com potencial de biodegradação desses na tentativa de recuperar ambientes impactados. Entre nove bactérias testadas, três apresentaram atividade degradativa em diferentes frações de petróleo, óleo diesel e gasolina, demonstrando uma fonte promissora na redução de áreas impactadas por derramamento de petróleo.

Strobel & Daisy (2003) também relataram outras possibilidades do uso biotecnológico de microrganismos endofíticos como antiviral, antibióticos voláteis, anti-cancerígeno, antioxidantes, inseticida e anti-diabético.

2.5 Atividade antimicrobiana de endófitos

Como exposto, há várias aplicações biotecnológicas dos endófitos, sendo a atividade antimicrobiana uma das primeiras e mais importantes atividades biológicas pesquisadas para estes microrganismos. Trabalhos relatam o potencial farmacológico desses microrganismos. Tonial (2010) avaliou o potencial antimicrobiano de *Schinus terebenthifolius* Raddi, popularmente conhecido como aroeira. Nesse trabalho foi realizado o isolamento de fungos filamentosos e actinomicetos da planta citada, em seguida foram confrontados com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura de interesse clínico, incluindo um fitopatógeno; os microrganismos que mostraram resultado positivo foram selecionados para extração dos metabólitos secundários e avaliados biologicamente e quimicamente, em comparação ao extrato bruto da planta hospedeira e frações. Como resultado, foram encontrados nove endófitos produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, entre estes foram identificados os gêneros: *Alternaria*, *Phomopsis*, *Penicillium* e *Streptomyces*; da análise química, acredita-se que a atividade antimicrobiana destes microrganismos seja vinculada a produção de alcalóides.

Radic & Strukelj (2012) sugerem que substâncias isoladas não tem atividade antibacteriana tão eficiente quando comparada com a sinergia do extrato bruto. Orlandelli *et al* (2011) avaliaram a ação antimicrobiana de metabólitos secundários oriundos de quatro fungos endofíticos isolados da planta *Piper hispidum* Sw., conhecido como falso-jaborandi, frente *Micrococcus luteus* utilizando a técnica do *cup plate*. O resultado demonstrou atividade antimicrobiana de todos os extratos de endófitos testados.

Bernardi-Wenzel *et al* (2012) estudaram a atividade antimicrobiana de endófitos de (*Glycine max* (L.) Merrill). Iniciaram com o isolamento de 31 microrganismos, desses 16

gêneros foram identificados: *Aspergillus*, *Phomopsis*, *Bipolaris*, *Nectria*, *Nigroscopora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Alternaria* e *Botryotrichum*. O resultado foi positivo para todos os fitopatógenos testados (*Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis*, *Fusarium solani*), sendo que o gênero *Fusarium* apresentou os melhores resultados.

2.6 *Paecilomyces lilacinus*

O fungo endofítico *P. lilacinus* utilizado neste trabalho foi isolado de *D. flagellaris* por Oliveira (2012). Ele tem sido isolado de diversos hospedeiros e em várias localidades, apresentando maior frequência em solos utilizados na agricultura, e com preferência por ambientes quentes (ANGELO, 2007). É utilizado para controle biológico de nematóides presentes em plantas (KIEWNICK *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2006), e de carrapatos, que prejudicam a agricultura e pecuária respectivamente (ANGELO, 2007). Raramente *P. lilacinus* causa infecções fúngicas em humanos, e quando ocorrem estão geralmente associados a iatrogenia ou pacientes imunodeprimidos, sendo um patógeno oportunista. Apresenta rápido crescimento em meio de cultura *Sabouraud* ágar, desenvolvendo colônias com coloração lilás-violeta quando estão maduras (WESSOLOSSKY *et al.*, 2008). O gênero *Paecilomyces* pode ser confundido com o gênero *Penicillium* devido as suas características micromorfológicas, tanto que foi reclassificado no estudo feito por Samson, em 1974, antes o gênero *Paecilomyces* era classificado como *Penicillium*.

Santiago *et al* (2006) analisaram a capacidade de *P. lilacinus* no controle do nematóide *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro, com a avaliação da massa de ovos, número de ovos por sistema radicular, sobrevivência de *P. lilacinus* no solo. Eles verificaram a redução da população de *M. paranaensis* quando isolados de *P. lilacinus* estavam presentes nas raízes dos tomateiros. Cadioli *et al* (2009) também avaliaram a utilização de *P. lilacinus* como controle biológico de *M. paranaensis*, e tiveram como resultados no crescimento do cafeeiro nos experimentos I e II, redução de ovos do fitopatógeno, em alguns deles promoveram a redução das malformações causadas por *M. paranaensis*.

Kiewnick *et al* (2006) avaliaram o potencial de *P. lilacinus* no controle biológico de *M. incognita* em tomate. Foi realizado um pré-tratamento do solo com inóculo de *P. lilacinus*, verificou-se que houve redução de ovos em 74 %, e a população de *M. incognita* teve uma redução de 71 % nas raízes quando comparado ao controle sem tratamento prévio. Neste estudo também foi demonstrado que a realização do pré-tratamento com uma concentração a 1×10^6 UFC/g de solo foi suficiente para controle de *M. incognita*.

Angelo (2007) avaliou o potencial de controle biológico de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* e *P. lilacinus* frente a *Boophilus microplus* (fêmeas ingurgitadas, ovos e larvas). Os resultados mostraram que *P. lilacinus* foi o único microrganismo testado que reduziu o período de eclosão das larvas provenientes da infecção de fêmeas ingurgitadas, e *I. fumosorosea* e *L. lecanii* foram os que apresentaram maior pontencial de controle para fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*.

Wessolossky *et al* (2008) relataram o caso de um paciente de 86 anos que estava em recuperação de leucemia linfocítica crônica, e apresentou dor persistente e inchaço sobre o cotovelo esquerdo, sem histórico de trauma. Inicialmente foram prescritos antibióticos (levofloxacina e daptomicina), seguida pela punção na região que apresentou culturas negativas para bactérias e positivas para fungos, sendo relatados fungos filamentosos com hifas septadas, e a princípio denominados fungos do gênero *Pecinillium*, em seguida foram identificados como pertencentes ao gênero *Paecilomyces* devido a características microscópicas (filiádes alongadas, dobra para longe dos conídios e cadeia de conídios não ramificada), ocasionando a mudança da medicação para fluconazol. A identificação de *P. lilacinus* foi confirmada, e submetida a testes de suscetibilidade antifúngica, que demonstrou resistência a fluconazol e anfotericina B, suscetibilidade intermediária para itraconazol, e suscetibilidade a voriconazol e cetoconazol, este último foi o antifúngico de escolha devido a resistência ao antifúngico instituído, o fluconazol. Houve melhora do quadro, porém a continuidade do tratamento foi perdida.

Itin *et al* (1998) avaliaram as manifestações clínicas e histológicas de infecção por *P. lilacinus* em pacientes imunodeprimidos. Os pacientes apresentavam pancitopenia, diminuição de todos os elementos celulares do sangue ao mesmo tempo, e em seguida iniciaram as erupções na pele, com apresentações variadas: máculas eritematosas, nódulos, pústulas, lesões vesiculares e crostas necróticas, lesões sépticas nos olhos e nos rins. Esse fungo é geralmente resistente ao tratamento com antifúngicos, devendo realizar antibiograma para testar sua sensibilidade, e mesmo assim, alguns pacientes só apresentaram melhoras da infecção fúngica quando ocorria recuperação da imunidade. Foi descoberto que a infecção foi causada por um creme tópico que se encontrava contaminado por *P. lilacinus*.

Jackson *et al* (2006) relataram o caso de um paciente recém-nascido com síndrome de Down, que nasceu com icterícia, distensão abdominal e sopro cardíaco, dias depois apresentou febre. Foi introduzida a sonda nasogástrica para alimentação e os antibióticos ampicilina, cloxacina, gentamicina e metronidazol foram administrados através de catéter intravenoso. Após sete dias de terapia antibiótica, houve resolução da febre e distensão

abdominal, e parcialmente da icterícia. Alguns dias depois, houve retorno dos sinais infecciosos. A distensão abdominal foi submetida a ultrassom, que verificou presença de abscessos, com cultura positiva para *Escherichia coli* e *Citrobacter diversus*. Nova terapia antibiótica foi instalada, com ceftriaxona, metronidazol e ampicilina, sem sucesso pois a criança ainda apresentava febre. Após novos exames, verificou-se a infecção fúngica, inicialmente identificado como *Penicillium* sp, houve troca da medicação para anfotericina B, amicacina e ceftazidima. Posteriormente foi identificado o fungo *Paecilomyces lilacinus* como agente causador da infecção, apresentando regressão da doença com anfotericina B, seguido por fluconazol de manutenção. Acredita-se que essa infecção fúngica ocorreu devido o uso prolongado de cateter intravenoso e a característica desse fungo que é oportunista, porém houve resolução com anfotericina B e fluconazol, diferente do caso relatado por Wessolossky *et al* (2008), que *P. lilacinus* apresentou resistência a esses dois antimicrobianos.

Como escrito no início deste ítem *P. lilacinus* não é um fungo muito comum de isolamento, e seus poucos relatos de isolamento estão relacionados ao solo, a doentes imunocomprometidos e raramente como endófito. As linhagens isoladas de solo tem sido avaliadas como controle de fitopatógenos enquanto que as isoladas de pacientes tem se avaliado a resistência aos antifúngicos e os poucos isolados como endófitos tem apenas sua frequência descrita e um pouco do seu potencial na produção de metabólitos secundários e primários investigados. Esta ausência de dados sobre a produção de metabólitos bioativos deste fungo em questão torna oportuna essa abordagem sobre a potencial atividade antimicrobiana de seus metabólitos secundários frente a patógenos presentes em infecções endodônticas.

3 JUSTIFICATIVA

O insucesso da endodontia atual tem sido associado a falta de conhecimento anatômico do sistema de canais radiculares e a microbiota presente nas diversas fases das patologias pulpares e periapicais. Sabe-se que os túbulos dentinários tem aproximadamente o triplo do diâmetro de bactérias, sendo o local perfeito para sua colonização. Mesmo com a instrumentação, também denominada preparo mecânico, são necessárias substâncias com atividade antimicrobiana para atuarem onde os instrumentos endodônticos não conseguem chegar (túbulos dentinários, canais laterais e região periapical), hoje são utilizados cimentos endodônticos, medicação intracanal e substâncias químicas auxiliares com essa finalidade.

Contudo o insucesso do tratamento endodôntico ainda é um desafio a ser superado, buscando novos compostos capazes de impedir ou reduzir o crescimento microbiano durante e após o tratamento, tanto em infecções primárias quanto secundárias. Porém com o uso indiscriminado de antibióticos, os microrganismos patogênicos tem se tornado cada vez mais resistentes, necessitando da descoberta de novos fármacos com essa finalidade. Esses novos fármacos podem estar ocultos na biodiversidade das florestas, e para uso sustentável desse recurso natural, tem sido sugerido estudos com microrganismos endofíticos que tenham ação farmacológica semelhante a planta hospedeira.

O presente estudo avaliou o potencial antimicrobiano de extratos e frações orgânicas do fungo endofítico *P. lilacinus* frente aos patógenos: *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, buscando esse uso sustentável da Microbiodiversidade Amazônica para atender a necessidade da descoberta de novos fármacos, especialmente na endodontia em que o acesso do Cirurgião-Dentista ao sistema de canais radiculares é bem limitado.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a capacidade dos metabólitos secundários de *Paecilomyces lilacinus* em inibir o crescimento microbiano de patógenos humanos (*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) presentes em infecção endodôntica.

4.2 Específicos

Reativar e Cultivar o fungo endofítico *Paecilomyces lilacinus* para análises taxonômicas: morfológica, química e molecular;

Realizar ensaios qualitativos e quantitativos dos extratos e/ou frações de *Paecilomyces lilacinus* contra patógenos presentes em infecções endodônticas;

Caracterizar os grupos de substâncias presentes nos extratos e/ou frações que tiverem atividades antimicrobianas;

Realizar ensaios antimicrobianos de descontaminação dos cones de guta percha com as frações orgânicas selecionadas;

Fazer análises estatísticas dos resultados de antibiose.

5 METODOLOGIA

5.1 Reativação e cultivo de *Paecilomyces lilacinus*

Nesta pesquisa foi utilizado o fungo endofítico *P. lilacinus* isolado do galho da planta *D. flagellaris*. Esse fungo está armazenado na Coleção de Trabalho do Laboratório de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (ESA/UEA). Para obter culturas viáveis, o microrganismo foi reativado em batata, dextrose e ágar (HIMEDIA[®]), em placa de Petri de 90 mm x 12 mm, por 11 dias a 28 °C (Figura 3).

Fungo	Registro
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	DfGa 2.1.2 I+ AT



Figura 3: Aspectos da reativação do fungo endofítico *P. lilacinus*, em BDA a 28 °C

5.2 Identificação morfológica

O fungo *P. lilacinus*, depois de reativado, foi cultivado a 28 °C durante 11 dias em meio BDA para análise macromorfológica: forma, coloração, presença/ausência de pigmento difuso e textura da colônia.

Para fazer essa análise micromorfológica: tipos de hifas, formação do micélio e de corpos de frutificação, o fungo foi submetido ao microcultivo, onde fragmentos dele foram dipostos ao redor de lamínulas previamente esterilizadas, como demonstrado na Figura 4. Após 48 horas, a lamínula foi transferida para uma lâmina de microscopia onde tinha uma gota de Lactofenol de Amman com azul de algodão, e analisada a microscópio óptico sob luz branca na objetiva de 40x. As estruturas vegetativas e reprodutivas observadas foram registradas através de microfotografia (Figura 4)

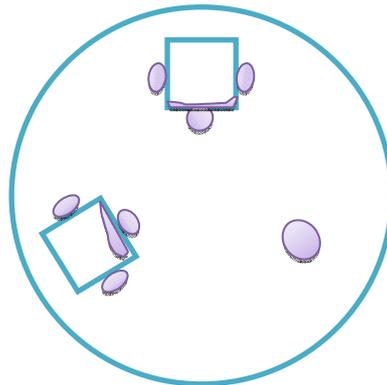


Figura 4: Esquema do microcultivo realizado para *P. lilacinus*

5.3 Identificação molecular

Após reativação 10 μL de uma suspensão de conídios (item 5.5.1) foi inoculado em 50 mL de BD, em duplicatas, e cultivado a 28 °C por 48 h. O micélio foi então separado por filtração a vácuo, seco com papel de filtro autoclavado e triturado com silica também autoclavada para depois o DNA total ser isolado de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit innuPREP Plant DNA (analyticJena), com pequenas modificações descritas por Souza, 2006.

Para amplificação do DNA ribossomal, utilizou-se as regiões *ITS-1*, *5,8s* e *ITS-2* deste por serem consideradas altamente conservadas (WHITE *et al*, 1990) e, portanto, servem como marcadores taxonômicos universais para eucariotos. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizou-se os primers: *Its1* (5'TCCGTAGGTGAACCTTGCGG 3') e *Its4* (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). A reação possuiu volume total de 50 μL e é composta por: 5,0 μL de Buffer 10x, 6,0 μL de dNTP (1,5 μM), 6,0 μL de MgCl_2 (25 mM), 4 μL de cada primer (10 pmoles), 50 ng de DNA genômico, 0,5 μL unidade de Taq polimerase (5 unidades / μL) e 13 μL de água milli-Q para completar o volume da reação.

A reação foi realizada em termociclador Mastercycler pro S da eppendorf e submetida a um processo de desnaturação inicial a 94 °C por 2,5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação

(94 °C / 15 seg), anelamento (58 °C / 30 seg), extensão (72 °C / 1,5 min), ao término dos ciclos, havendo uma extensão final a 72 °C por 10 min. Após a reação, a amostra foi transferida para um freezer a -20 °C. Cerca de 5 µL dos amplicons foram checados em gel de agarose a 1,2 %, corado com GelRed (10 mg/mL) e visualizado sob luz UV. O produto da PCR foi submetido ao sequenciamento realizado em ambas as direções utilizando os mesmos primers do processo de amplificação, na FioCruz/AM.

5.4 Identificação química

A identificação de microrganismos atualmente passa por uma adaptação as novas técnicas decorrentes dos novos aparelhos desenvolvidos e do conhecimento acumulado sobre estes. Entre estas técnicas podemos citar: as morfológicas (de microscopia óptica e eletrônica), fisiológicas (bioquímicas), químicas (composição da parede, perfis de metabólitos secundários e de proteínas intra-celulares) e moleculares (sequências de genes e de proteínas de interesse taxonômicos) entre outras. A integração de três ou mais dessas técnicas na identificação taxonômica de um individuo ou de um grupo da mesma espécie tem sido empregada como Identificação polifásica. Dai a importância de Identificação Química para este isolado.

Amostras de todos os extratos do micélio e do meio líquido fermentado (ítem 55) foram separadas para análise em Espectrometro de Massas a fim de se obter um espectrometro total dos metabólitos produzidos. Para o perfil de metabólitos secundários seguiu-se a metodologia descrita por Souza (2005) com pequenas modificações. Onde foram feitos em quintuplicatas o cultivo de *P. lilacinus* em 2 mL de meio de cultura líquido (BDL, ISP₂, CYA, CZAPEC e Malte) por 8 dias a 28 °C. As extrações e análises foram de acordo com Souza (2005) e, LC/MS. O cultivo em BDA para análises em Maldi-tof (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de vôo) foi após 72 h que é uma técnica de ionização branda utilizada em espectrometria de massa, para as análises dos espectros será usado o software SARAMIS.

5.5 Produção de extratos orgânicos

5.5.1 Inóculo

A suspensão de conídios foi preparada em tubos de ensaio contendo 5 mL de água com 20% de glicerol. A concentração de conídios foi estimada pelo n° 8 da escala de Mc Farland.

5.5.2 Cultivo de *P. lilacinus*

O cultivo de *P. lilacinus* foi realizado em escala laboratorial em meio de cultura líquido de batata e dextrose (BDL). Foram adicionados 300 mL do meio de cultura e 50 µL de inóculo por frasco de Erlenmeyer de 1L, no total foram 94 frascos de Erlenmeyer para o experimento, sendo 03 utilizados como controle (meio de cultura sem inóculo). A fermentação foi realizada no modo estático com temperatura a 26 °C (Figura 5).



Figura 5: Crescimento de *P. lilacinus* de modo estático.

5.5.3 Filtração

Após 16 dias em crescimento estático, o meio de cultura líquido fermentado contendo micélio e metabólitos passou por processo de filtração a vácuo em funil de buchner.

5.5.4 Obtenção de extratos orgânicos

5.5.4.1 Micélio

Após a separação por filtração a vácuo, o micélio foi submetido a extração com 500 mL dos solventes acetato de etila e metanol na proporção 1:1 durante 48h. O extrato 1 foi separado do micélio, e este armazenado para 2ª extração. O micélio foi submetido a 2ª extração com 500 mL de metanol 100%, durante 48h. O extrato 2 foi separado do micélio, e este armazenado novamente para a 3ª extração. Na terceira extração, houve maceração do micélio e foi adicionado 500 mL metanol 100%.

Os extratos brutos oriundos do micélio foram armazenados separados em frascos âmbar na geladeira para posterior concentração no rotaevaporador sob pressão reduzida.

5.5.4.2 Meio líquido

As extrações de metabólitos secundários do meio líquido foram realizadas em colunas de SPE (extração em fase sólida - Strata[®] phenomenex), utilizando bomba de vácuo. O processo iniciou com a ativação da sílica presente no cartucho, adicionando 60 mL de metanol, seguido pelo condicionamento da sílica com 60 mL de solução metanol a 5%. Foi necessário realizar o condicionamento do material a ser extraído semelhante ao condicionamento realizado na sílica do cartucho, transformando o meio fermentado que era uma solução 100% aquosa, numa solução com metanol a 5%.

Com os materiais ativados e condicionados, a obtenção de metabólitos secundários prosseguiu. O meio fermentado foi dispensado no cartucho gradativamente para interagir e ser retido na sílica, tal procedimento foi repetido até a percepção visual de saturação da sílica. O líquido que ficou armazenado na parte inferior do frasco Kitasato foi reservado para posterior descarte.

A extração propriamente dita foi realizada após a saturação da sílica, inicialmente com os solventes acetato de etila e metanol na proporção 1:1, sendo o extrato 4 (Figura 6), e num segundo momento a extração foi realizada com metanol 100%, denominado extrato 5.



Figura 6: Extração em fase sólida (SPE) do meio fermentado.

Os extratos brutos do meio de cultura fermentado obtidos foram armazenados separados em frascos âmbar, na geladeira para posterior concentração. Para facilitar a identificação, foram atribuídos códigos aos extratos, detalhado no quadro 1

Quadro 1: Códigos dos extratos brutos produzidos a partir de *P. lilacinus*.

Código	Origem	Solvente	*	Rendimento
G1	Micélio	Acetato/Metanol 1:1	1	21,4565 g
G2		Metanol 100%	2.1	0,9600 g
			2.2	5,5086 g
G3		Etanol 100%	3	5,3425 g
G4	Meio	Acetato/Metanol 1:1	4	1,0039 g
G5		Metanol 100%	5	3,3124 g

5.5.5 Concentração e liofilização

Os extratos orgânicos obtidos foram submetidos a evaporação rotativa a 40 °C, 100 rpm e sob pressão reduzida, em seguida foram armazenados em vidros com tampas rosqueáveis (previamente limpos, pesados e identificados) e colocados no dessecador para evaporação de solventes presentes nas amostras. As amostras que permaneceram com água foram submetidas a liofilização no Laboratório de Química Orgânica do Programa de Pós-

Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Figura 7). Após a liofilização os frascos foram pesados novamente para quantificar a massa dos extratos.



Figura 7: Liofilização de extratos orgânicos de *P. lilacinus*

5.6 Ensaios das atividades antimicrobianas

5.6.1 Reativação e cultivo dos microrganismos teste

Os microrganismos presentes na infecção endodôntica testados foram: *Enterococcus faecalis* (CBAM 0282), *Staphylococcus aureus* (CBAM 0324), *Pseudomonas aeruginosa* (CBAM 0222) e *Candida albicans* (CFAM 1342). Esses foram disponibilizados pela Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM) e pela Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM) do Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane da Fundação Oswaldo Cruz/Amazonas (FIOCRUZ/AM). As bactérias foram reativadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) ágar (ágar infusão de cérebro e coração) (HIMEDIA[®]) e a levedura em sabouraud (SB) ágar (HIMEDIA[®]), e mantidas a 30 °C por 24 horas e 48 horas, respectivamente. Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI para bactérias, e caldo SB para levedura, ambos foram mantidos a 30 °C, sendo as bactérias por 24 horas e a levedura por 48 horas, a concentração utilizada no presente estudo foi correspondente a 0,5 na escala de Mc Farland para as bactérias e 6 para a levedura.

5.6.2 Preparo das amostras

As amostras (extratos brutos e frações) foram pesadas e solubilizadas na concentração de 2 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %.

5.6.3 Preparo dos controles

O controle negativo foi realizado com água destilada estéril. O controle positivo foi realizado com tetraciclina 2 mg/mL para *P. aeruginosa*, ampicilina 2 mg/mL para *S. aureus* e *E. faecalis* e nistatina 2 mg/mL para *C. albicans*.

5.6.4 Determinação qualitativa da atividade antimicrobiana – Difusão em Ágar

O ensaio qualitativo para determinar a atividade antimicrobiana foi realizado em placas petri contendo meio de cultura BHI ágar, para testes com bactérias, e SB ágar, para levedura. Para iniciar o teste, 100 µL de patógenos foram plaqueados com auxílio de alça drigalski, em seguida 5 poços foram confeccionados no meio de cultura com 6 mm de diâmetro e pelo menos 1 cm de distância da borda e entre eles. Esses poços foram preenchidos com 100 µL dos extratos preparados. As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas.

5.6.5 Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana – Dosagem Inibitória Mínima (MID)

Os ensaios para determinação da dosagem inibitória mínima (MID) foram realizados em placas de Elisa, na qual foram adicionadas 100 µL do meio de cultura, cuja concentração estava dobrada, 100 µL da amostra preparada e 10 µL da suspensão de células do patógeno testado (Figura 8), de acordo com a metodologia descrita por Souza (2006).

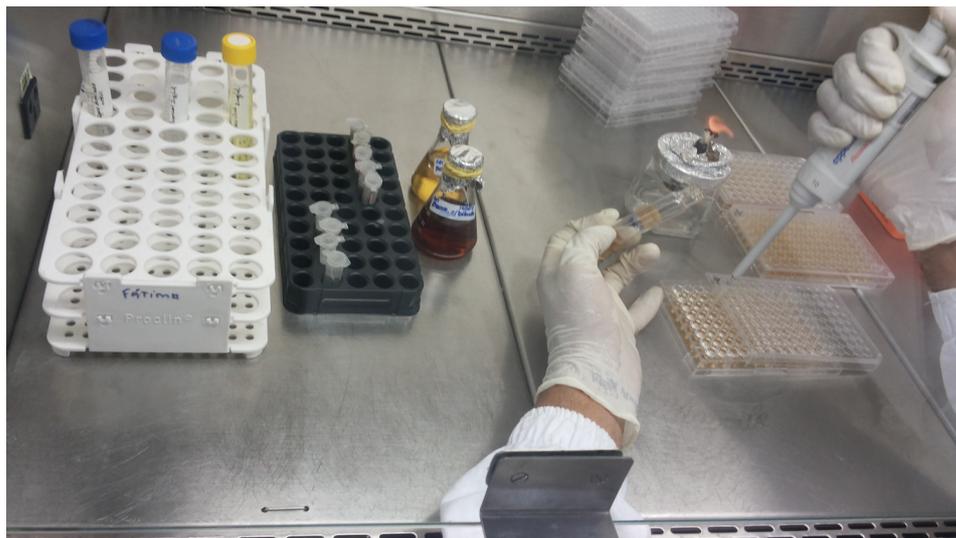


Figura 8: Ensaio quantitativo para aferir a Dosagem Inibitória Mínima

A quantidade de 100 μL de amostra preparada foi introduzida somente no primeiro poço (correspondente a letra A da placa de Elisa). Em seguida foi realizada uma diluição seriada com a micropipeta, sendo transferidos 100 μL para o segundo poço (correspondente a letra B), esse processo foi repetido até o último poço (letra H), os 100 μL de solução que seria transferido para outro poço, foi descartado. Com a diluição seriada houve redução das concentrações gradativamente, conforme o quadro 2 demonstra. Para o controle negativo, a amostra preparada foi substituída por 100 μL de água destilada estéril, e para o controle positivo foi utilizado 100 μL de solução antibacteriana, para testes com bactérias, e antifúngica, para testes com a levedura. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Quadro 2: Concentrações das amostras nos poços.

Poços	Concentração
A ○○○	1 mg/mL = 1000 μg /mL
B ○○○	0,5 mg/mL = 500 μg /mL
C ○○○	0,25 mg/mL = 250 μg /mL
D ○○○	0,125 mg/mL = 125 μg /mL
E ○○○	0,0625 mg/mL = 62,5 μg /mL
E ○○○	0,03125 mg/mL = 31,25 μg /mL
G ○○○	0,015625 mg/mL = 15,62 μg /mL
H ○○○	0,0078125 mg/mL = 7,81 μg /mL

No dia seguinte foi colocado 10 μL do revelador NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1% nos poços com inóculo leveduriforme, e 10 μL de revelador TTC (2,3,5- cloreto de 2,3,5-

trifeniltetrazólio) a 1% nos poços com inóculo bacteriano. Quando houve crescimento microbiano, o revelador NBT mudou a solução para a cor azul escuro e o TTC para a cor vermelha.

Esse ensaio biológico foi feito novamente, porém com as frações dos extratos orgânicos, que foram denominados de acordo com o quadro 3. Neste foi realizado o ensaio para identificar se as frações testadas eram bactericidas ou bacteriostáticas, e fungicidas os fungicidas, fazendo o plaqueamento de 50 µL do poço acima da atividade antibacteriana e 50 µL do poço abaixo, antes de colocar os reveladores específicos.

Quadro 3: Identificação para a segunda etapa de ensaios biológicos quantitativos.

Extrato de origem	Solvente utilizado para fracionamento	Nova identificação
Micélio Reunido	Acetato de etila	Am
G2	Acetato de etila	A2
G4	Acetato de etila	A4
G5	Acetato de etila	A5
Micélio Reunido	Metanol	Mm
G2	Metanol	M2
G4	Metanol	M4
G5	Metanol	M5
Micélio Reunido	Fase aquosa da SPE	Sm
G2	Fase aquosa da SPE	S2
G4	Fase aquosa da SPE	S4
G5	Fase aquosa da SPE	S5
Emulsão do G5	Acetato de etila	E5

5.7 Fracionamento dos extratos

Antes de iniciar o fracionamento dos extratos brutos foi decidido que os extratos oriundos do micélio deveriam ser reunidos por apresentar características semelhantes em cromatografia de camada delgada, o que não ocorreu com o extrato 2.1, sendo a exceção a reunião dos extratos do micélio.

O fracionamento dos extratos brutos do micélio reunido (EMR), 2.1 (extrato metanólico do micélio), 4 (extrato acetato/metanol do meio fermentado) e 5 (extrato metanólico do meio fermentado) foi realizado com solventes de polaridade crescente (acetato de etila, metanol e água), e teve início com a diluição dos extratos com metanol/água destilada na proporção 2:1, seguindo com o condicionamento da solução com solução metanol a 5% para ser submetido a nova extração.

A extração líquido-líquido, também denominada partição, ocorreu em três etapas, sendo a primeira com o solvente orgânico acetato de etila a 20% e segunda e a terceira com acetato de etila a 10%. Houve reunião da primeira e segunda extração, a terceira extração e a fase aquosa dessa partição foram armazenadas em frascos distintos. Os extratos fracionados foram submetidos a evaporação rotativa, pesados (quadro 4) e avaliados em cromatografia em camada delgada (CCD).

Quadro 4: Rendimento da fração orgânica

	EMR	2.1	4	5
Fase orgânica Acoet 1° e 2° extração	0,5699 g	0,0963 g	0,1673 g	0,5340 g
Fase orgânica Acoet 3° extração	0,1100 g	0,0520 g	0,1357 g	0,1075 g

De posse dos resultados, foi decidido prosseguir com o fracionamento utilizando a fase aquosa da partição na extração em fase sólida (SPE) com o solvente metanol. As frações metanólica e aquosa foram submetidas a evaporação rotativa e em seguida a liofilização, descritos anteriormente.

5.8 Bioautografia

O ensaio biológico foi realizado após a análise da CCD, com a definição do sistema utilizado na fase móvel. Esse teste seguiu a metodologia citada por Amaral *et al* (2003) e Cunico *et al* (2012) com modificações.

5.8.1 Cultivo dos patógenos e preparo do inóculo

Os patógenos foram cultivados em BHI ágar (*E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e em SB ágar (*C. albicans*) a 37 °C por 24 horas. Para realização do ensaio, uma colônia isolada foi cultivada em 50 mL de meio líquido a 37 °C por 24 horas, padronizada na concentração correspondente a escala 0,5 de MacFarland para as bactérias e 6 para a levedura.

5.8.2 Cromatografia em camada delgada

Após a primeira fase de ensaios biológicos, realizou-se CCD com o objetivo de verificar possíveis semelhanças entre os extratos brutos de *P. lilacinus*, e no segundo momento para preparar a bioautografia. Uma pequena alíquota de cada extrato bruto liofilizado foi suspensa em metanol 100%. Para realizar esse ensaio, utilizou-se sílica gel (com espessura de 0,2 mm e 5 cm de altura) como fase estacionária, e diferentes sistemas de fases móveis, contendo geralmente hexano, acetato de etila, isopropanol, metanol e água destilada. Foram traçadas duas linhas na placa de CCD, sendo uma inferior, onde as amostras foram aplicadas, e outra superior, que marcava o limite para eluição da fase móvel. Os “spots” das amostras foram aplicados com auxílio de capilares de vidro na placa cromatográfica, mantendo 0,5cm de distância entre as amostras. Em seguida a placa foi transferida para uma cuba contendo a fase móvel, até a completa eluição dessa (Figura 9). A placa foi removida da cuba com auxílio de pinça e reveladas por métodos físicos (visualizada em luz ultravioleta de comprimentos de onda: 254 e 365nm) e químicos (reveladores químicos dragendorff, NP PEG e vanilina sulfúrica).

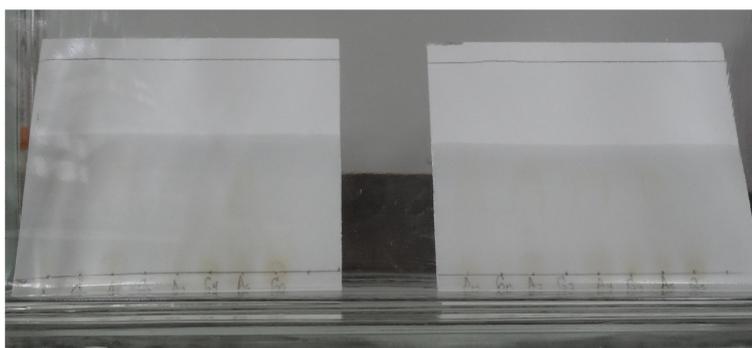


Figura 9: CCD eluindo na fase móvel (acetato de etila e metanol 8,5:1,5)

Foram utilizadas 07 placas cromatográficas nesse ensaio, utilizando o sistema acetato de etila/metanol na proporção 8,5:1,5 como fase móvel. As alíquotas dispensadas (20 μ L) na linha da base tinham a concentração 1 mg/mL. Todas as placas foram reveladas com o método físico (com a luz ultravioleta nos comprimentos de onde 254 nm e 365 nm- Figura 10) previamente a bioautografia, e uma das placas foi utilizada como controle, sendo revelada com o reagente quase universal vanilina sulfúrica, e avaliado o fator de retenção (R_f) (Figura 11) das frações para posterior comparação com o halo de inibição formado.

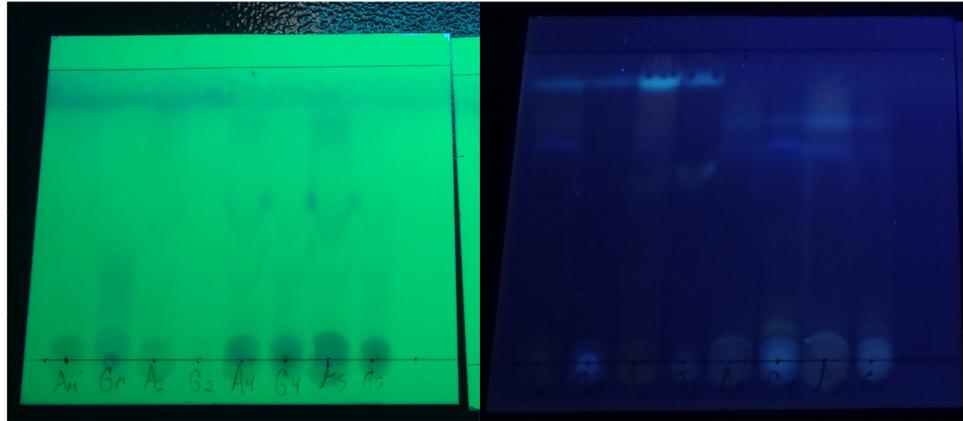


Figura 10: Revelação física com luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254nm e 365nm, respectivamente, das placas CCD das amostras de *P. lilacinus*.

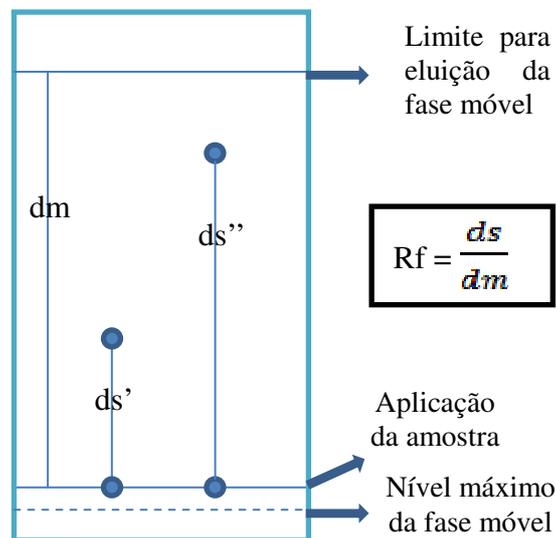


Figura 11: Esquema para cálculo do fator de retenção (R_f).

5.9 Descontaminação dos cones de guta percha

Para a realização do teste de descontaminação dos cones de guta percha foi utilizada a metodologia descrita por Monteiro (2012), com adaptações. Os cones de guta percha Odous De Deus[®] de formato Medium Extra Longo foram padronizados com auxílio de régua calibradora Prisma[®] em 10 mm de comprimento e 1,3 mm (correspondente a lima #130) de diâmetro na ponta. Os microrganismos testadores foram reativados, cultivados e padronizados como descrito anteriormente. As amostras foram preparadas através da diluição das frações A4 e A5 em DMSO 10 %, a concentração de 2 mg/mL.

Após cultivo e padronização do inóculo microbiano em meio de cultura líquido, 1,5 mL foram aspirados com micropipeta e transferidos para os poços da fileira A de placas de cultura de células com 24 poços, em seguida foram introduzidos os cones de guta percha

padronizados. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Decorridas 24 horas, foram aspirados 1,5 mL de solução salina estéril e transferidos para os poços das fileiras B e C, os cones de guta percha foram imersos nos poços da fileira B por 1 minuto, repetindo o processo na fileira C. Em seguida os cones foram transferidos para os poços da fileira D, onde estavam as frações testadas (A4 e A5), permanecendo por 10 minutos. O ensaio foi realizado em quintuplicata, tendo a solução salina estéril como controle negativo e o hipoclorito de sódio 2,5 % como controle positivo. O ensaio está esquematizado na Figura 12, e a Figura 13 apresenta a placa de cultura de células com todas as soluções, estando o cone de guta-percha na fase de descontaminação.

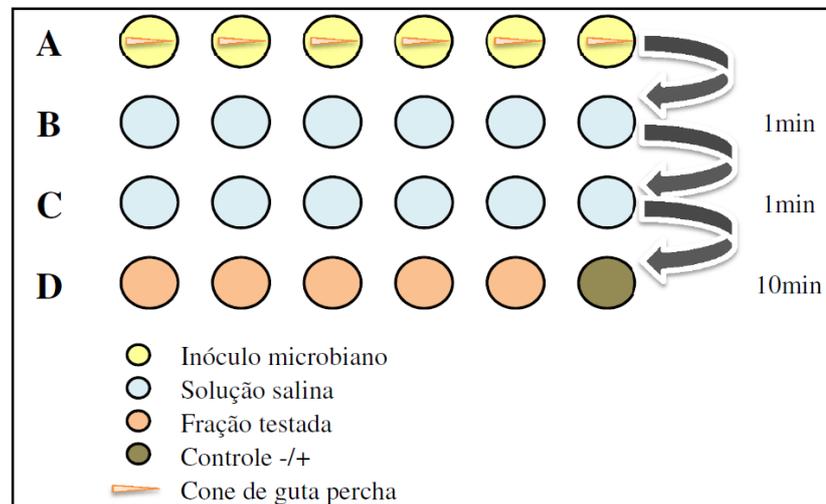


Figura 12: Esquema da descontaminação dos cones de guta-percha utilizados nesta pesquisa

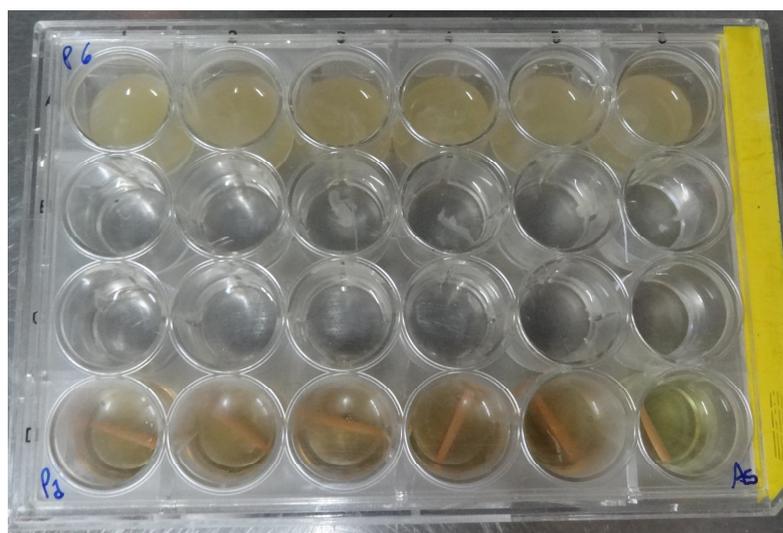


Figura 13: Descontaminação com a fração orgânica A5 do extrato obtido do meio de cultura fermentado de *P. lilacinus*

Posteriormente a desinfecção dos cones de guta percha, esses foram transferidos para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução salina e submetidos a agitação em vortex. Alíquotas de 50 μ L da solução obtida após a agitação foram semeadas em triplicata em placas Petri e incubadas a 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, as unidades formadoras de colônias foram quantificadas pelo método clássico.

5.10 Análise Estatística

Os dados do ensaio qualitativo da atividade antimicrobiana foram apresentados por meio de quadros e tabelas, onde calculou a mediana, primeiro quartil (Q_1), terceiro quartil (Q_3), mínimo, máximo, média e desvio-padrão, utilizando programa estatístico R.

Para os ensaios quantitativos de dosagem inibitória mínima, bioautografia e descontaminação dos cones de guta percha foram realizadas análises descritivas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Consideração geral

O uso de microrganismos endofíticos como fonte de produtos naturais tem se mostrado uma alternativa viável desde a produção de moléculas bioativas como: antimicrobianas, antihelmínticas, antiprotozoárias, inseticidas, inibidores de fosfolipases, antioxidantes, anti-diabéticas, anticâncer, inibidores de acetil-colinestrerase entre outras atividades. Além de poderem ser usados como agentes de biotransformação de moléculas de interesse farmacêutico, para biorremediação e para produção de enzimas de interesse industrial, como: a indústria alimentícia, de celulose e papel, de tecido, farmacêutica e a produção de energia renovável entre outras.

Contudo esse recurso ainda é pouco explorado, ou pouco conhecido na área odontológica. Algumas pesquisas estão sendo conduzidas em nosso grupo e outros grupos de pesquisa de nossa região estão começando a investigar essa área. O uso de microrganismos endofíticos de *D. flageris* teve início em 2012 pela MSc. Juliana Gomes de Souza Oliveira, a qual isolou e fez as primeiras avaliações antimicrobianas, onde foi detectado o potencial de *P. lilacinus* como produtor destes metabólitos secundários. Em continuidade a essa pesquisa, este trabalho demonstra a potencialidade deste fungo como uma possível fonte para o controle de patógenos presentes em infecções endodônticas tanto para uso *in situ* quanto para descontaminação dos materiais usados neste processo.

6.2 Taxonomias morfológicas, molecular e química

O fungo endofítico *P. lilacinus* após reativação, conforme o item 5.1, apresentou o aspecto macroscópico do micélio, que no início era branco e quando houve esporulação, transformou-se em lilás, e o dorso da placa ficou cor de vinho sombreado. Os aspectos macroscópicos estão de acordo com a descrição feita por Samson (1974), mesmo sendo o crescimento e o meio de cultura diferentes deste estudo. Pois Samson (1974) e Angelo (2007) relataram o crescimento com 14 dias, utilizando o meio de cultura de extrato de malte enquanto que fizemos a opção pelo meio BDA e ISP₂ no qual este fungo havia sido isolado e produzido os metabólitos avaliados anteriormente. Quanto as características micromorfológicas, estão de acordo com estes autores também, onde os conidióforos foram pigmentados e clamidosporos ausentes. O micélio apresentou-se hialino, septado, com fiáides

divergente e conidióforos terminais semelhantes a pincéis com longas cadeias de conídios elípticos. Estes dados podem ser observados na Figura 14 que apresenta esses resultados e compara com dados da literatura expostos a seguir.

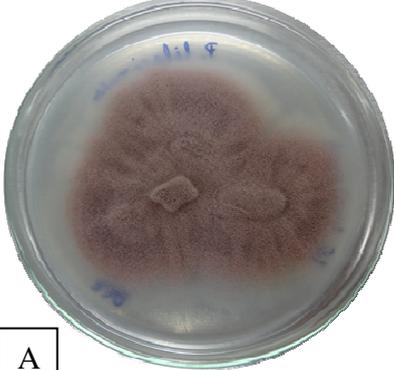
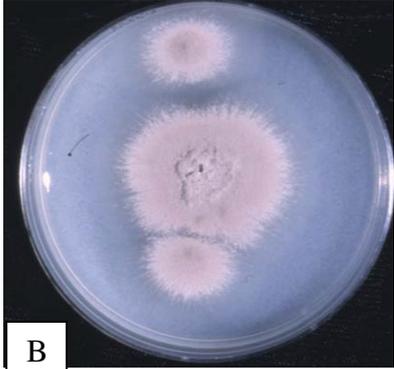
Macroscopia – Frente	Macroscopia – Dorso	Microcultivo
 <p data-bbox="225 846 280 891">A</p>		
 <p data-bbox="225 1243 280 1288">B</p>		
<p data-bbox="252 1317 592 1377">Carey <i>et al.</i>, 2003 – BDA 14 dias a 25 °C.</p>	<p data-bbox="662 1317 1038 1377">Oliveira, 2013 – ISP2 14 dias a 28 °C.</p>	<p data-bbox="1086 1317 1481 1377">Carey <i>et al.</i>, 2003 – BDA 14 dias a 25 °C.</p>

Figura 14: Aspectos macro-micromorfológicos de *Paecilomyces lilacinus* utilizado nesta pesquisa na primeira fileira (A) e em (B) aspectos macro-micromorfológicos da literatura.

Para as análises quimio-taxonômicas foram separadas de 2 a 4 mg dos extratos brutos do micelio e do meio de cultura líquido (BDL) conforme descrito no item 5.5 para posterior análises, contudo devidos imprevistos estes extratos aguardam as análises em LC/MS. Outras duas formas de análises a do perfil químico, descrita por Souza (2005), e as análises por Maldi-tof (item 5.4) também aguardam condições de análises. Mas ambas as formas de análise químicas são inéditas para esta espécie, o que sugere importantes avanços no conhecimento gerado sobre essa linhagem e na própria espécie.

Para as análises das regiões *Its-1* e *Its-2* do rDNA, conforme descrita no item 5.3 o DNA total foi extraído com sucesso e a PCR também alcançou os resultados esperados, com a

amplificação de um fragmento com aproximadamente 570 pb (Figura 15). Aguardamos apenas o resultado do sequenciamento para confrontar com os bancos de dados gênicos.

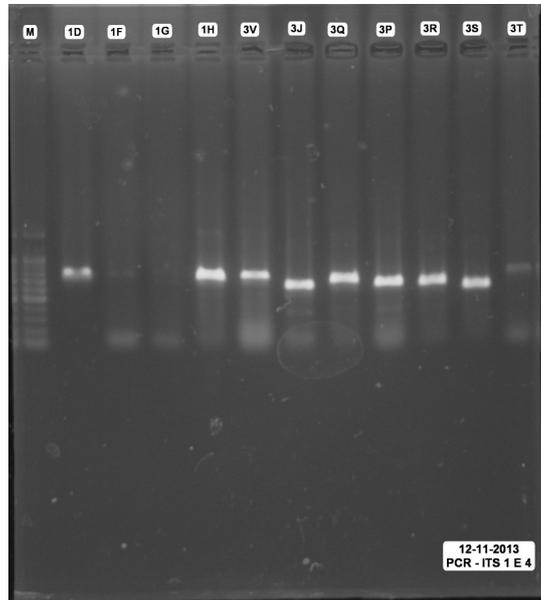


Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos da PCR dos primer Its 1 e Its 2 de fungos endofíticos de *Duguetia flagellaris*.

6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *P. lilacinus*

6.3.1 Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana – Difusão em Ágar

O método de difusão em ágar foi utilizado para fazer a avaliação qualitativa da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos, conforme Quadro 5, Quadro 6, Quadro 7 e Quadro 8. A análise estatística foi realizada com o software R, para determinação do mínimo, máximo, 1º quartil, 3º quartil, mediana, média e desvio-padrão, e está exposta nas Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4.

Quadro 5: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *E. faecalis*

Extrato bruto	<i>Enterococcus faecalis</i>					Média
G1	7 mm	6 mm	4 mm	6 mm	5 mm	5,6 mm
G2	2 mm	4 mm	5 mm	6 mm	6 mm	4,6 mm
G3	8 mm	7 mm	3 mm	5 mm	8 mm	6,2 mm
G4	9 mm	6 mm	10 mm	7 mm	6 mm	7,6 mm
G5	9 mm	6 mm	5 mm	4 mm	8 mm	6,4 mm

Tabela 1: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *E. faecalis*

Extrato Bruto	Mínimo	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Máximo	Desvio-Padrão
G1	4	5	6	5.6	6	7	1.140
G2	2	4	5	4.6	6	6	1.673
G3	3	5	7	6.2	8	8	2.167
G4	6	6	7	7.6	9	10	1.816
G5	4	5	6	6.4	8	9	2.073

Machado (2009) avaliou a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos (*Botryosphaeria rhodina*, *Xylaria multiplex* e *Pestalotiopsis* sp.) frente aos patógenos: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* e *S. aureus* numa concentração inicial de 5 mg/mL. Devido a ausência de atividade, Machado optou por aumentar a concentração para 50 mg/mL e testou novamente para *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, ainda assim não houve inibição do crescimento bacteriano, em quanto que no presente estudo encontramos a atividade bactericida para uma concentração inferior (2 mg/mL) avaliada tanto para difusão em ágar e como para microdiluição e outros ensaios posteriores.

Quadro 6: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *P. aeruginosa*

Extrato bruto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					Média
G1	4 mm	3 mm	4 mm	2 mm	3 mm	3,2 mm
G2	5 mm	4 mm	5 mm	3 mm	3 mm	4 mm
G3	8 mm	5 mm	4 mm	5 mm	6 mm	5,6 mm
G4	4 mm	4 mm	2 mm	3 mm	5 mm	3,6 mm
G5	8 mm	7 mm	7 mm	9 mm	10 mm	8,2 mm

Tabela 2: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *P. aeruginosa*

Extrato Bruto	Mínimo	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Máximo	Desvio-Padrão
G1	2	3	3	3.2	4	4	0.836
G2	3	3	4	4	5	5	1
G3	4	5	5	5.6	6	8	1.516
G4	2	3	4	3.6	4	5	1.140
G5	7	7	8	8.2	9	10	1.303

Quadro 7: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *S. aureus*

Extrato bruto	<i>Staphylococcus aureus</i>					Média
G1	5 mm	3 mm	2 mm	3 mm	4 mm	3,4 mm
G2	1 mm	2 mm	0	1 mm	1 mm	1 mm
G3	2 mm	0	1 mm	3 mm	0	1,2 mm
G4	10 mm	8 mm	8 mm	11 mm	11 mm	9,6 mm
G5	8 mm	7 mm	9 mm	10 mm	9 mm	8,6 mm

Tabela 3: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *S. aureus*

Extrato Bruto	Mínimo	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Máximo	Desvio-Padrão
G1	2	3	3	3.4	4	5	1.140
G2	0	1	1	1	1	2	0.707
G3	0	0	1	1.2	2	3	1.303
G4	8	8	10	9.6	11	11	1.516
G5	7	8	9	8.6	9	10	1.140

Orlandelli *et al* (2011) avaliaram a ação antibacteriana de quatro fungos isolados de *Piper hispidum* frente a *S. aureus*. Houve variação na concentração dos extratos fúngicos, a concentração referente ao endófito G20-20 foi 61,4 mg/mL, do G65-65 foi 50,1 mg/mL, do G33-73 foi 19,9 mg/mL e do G53-83 foi 24 mg/mL. O halo de inibição formado por G20-20 teve uma média de 12,42 mm \pm 1,01 mm, este foi diferente estatisticamente dos outros G65-65, que teve 3,17 mm \pm 1,42 mm de halo de inibição, G33-73, com média de 3,75 mm \pm 0,25 mm de halo de inibição, e G53-83, com 2,67 mm \pm 1,59 mm de halo formado. Nossos resultados foram superiores aos obtidos por Orlandelli *et al*, que obteve um único resultado superior ao nosso (G20-20), mas cuja concentração utilizada foi 30 vezes superior a padronizada e utilizada nos Laboratórios de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia ESA/UEA e no do Grupo de Espectroscopia de Massas e Microrganismos da Amazônia do DQ/UFAM onde foram realizadas as análises.

Souza *et al* (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de 79 fungos endofíticos, sendo 64 isolados de *Palicourea longiflora* e 15 de *Strychnos cogens* frente aos microrganismos: *Bacillus* sp, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *C. albicans*, *Trichoderma* sp. e *Aspergillus flavus*. Não houve inibição do crescimento de *C. albicans*, nem *Trichoderma* sp. Para *S. aureus*, houve variação no halo de inibição de 0 a 23 mm. Quando comparado ao presente estudo, houve variação entre 0 e 11 mm na formação do halo de inibição, sendo inferior ao resultado relatado por Souza e colaboradores, ainda vale lembrar que os autores trabalharam com o líquido metabólico *in natura* enquanto nesta pesquisa trabalhamos com extratos e frações.

Quadro 8: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *C. albicans*

Extrato bruto	<i>Candida albicans</i>					Média
G1	5 mm	6 mm	6 mm	6 mm	7 mm	6 mm
G2	6 mm	5 mm	5 mm	4 mm	6 mm	5,2 mm
G3	3 mm	5 mm	2 mm	5 mm	3 mm	3,6 mm
G4	13 mm	9 mm	12 mm	13 mm	10 mm	11,4 mm
G5	10 mm	11 mm	9 mm	11 mm	12 mm	10,6 mm

Tabela 4: Halo de inibição formado em milímetros (mm) frente *C. albicans*

Extrato Bruto	Mínimo	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Máximo	Desvio-Padrão
G1	5	6	6	6	6	7	0.707
G2	4	5	5	5.2	6	6	0.836
G3	2	3	3	3.6	5	5	1.341
G4	9	10	12	11.4	13	13	1.816
G5	9	10	11	10.6	11	12	1.140

**Figura 16:** Halo de inibição formado com extrato G5 frente a *Candida albicans*

Teles *et al* (2013) testaram a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de *P. lilacinus*. Dos 13 extratos testados, 6 apresentaram atividade frente a *Listeria monocytogenes* e 8 a *S. aureus*, sendo que 2 destes apresentaram halo de inibição maior que o produzido pelo controle com cloranfenicol. Também foi testada a ação antifúngica frente a *C. albicans*, todos os extratos testados apresentaram halo de inibição maior que o halo produzido pelo controle positivo (miconazol).

6.3.2 Avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana – Dosagem Inibitória Mínima (MID)

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos para a determinação da MID dos extratos estão plotados individualmente nos quadros de 9 a 12 e das frações nos quadros de 13 a 16 que serão apresentados na sequência dos resultados quantitativos.

Quadro 9: Dosagem Inibitória Mínima frente *E. faecalis*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	G1	G2	G3	G4	G5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-
250 µg/mL	-	-	-	-	-
125 µg/mL	+	-	+	-	-
62,5 µg/mL	+	-	+	-	+
31,25 µg/mL	+	+	+	+	+
15,62 µg/mL	+	+	+	+	+
7,81 µg/mL	+	+	+	+	+

Quadro 10: Dosagem Inibitória Mínima frente a *P. aeruginosa*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	G1	G2	G3	G4	G5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-
250 µg/mL	+	-	-	-	+
125 µg/mL	+	-	-	-	+
62,5 µg/mL	+	-	+	-	+
31,25 µg/mL	+	-	+	-	+
15,62 µg/mL	+	+	+	-	+
7,81 µg/mL	+	+	+	-	+

Dias *et al* (2005) avaliaram o MID de extratos brutos de flores, caule e folhas de *Aster lanceolatus*, frente a patógenos de interesse médico, dentre eles estava *P. aeruginosa* e *S. aureus*. O MID obtido foi 19,62 mg/mL com extratos brutos da flores frente *P. aeruginosa*, e 11,88 mg/mL de extratos brutos do caule. Para *S. aureus*, os resultados foram inferiores sendo 9,81 mg/mL com extratos brutos de flores, e 5,94 mg/mL com extratos brutos de caule e folhas. Apesar dos resultados para *S. aureus* serem inferiores aos apresentados para *P. aeruginosa*, aqueles apresentam valores extremamente superiores quando comparados ao MID dos extratos brutos de *P. lilacinus*, que tiveram variação de 500 µg/mL a < 7,81 g/mL tanto frente a *P. aeruginosa*, quanto a *S. aureus*.

Quadro 11: Dosagem Inibitória Mínima frente *S. aureus*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	G1	G2	G3	G4	G5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-
250 µg/mL	-	-	+	-	-
125 µg/mL	-	+	+	-	-
62,5 µg/mL	+	+	+	-	-
31,25 µg/mL	+	+	+	-	-
15,62 µg/mL	+	+	+	-	-
7,81 µg/mL	+	+	+	-	+

Alves *et al* (2008) realizaram um estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos e substâncias puras de espécies vegetais. O resultado do MID de extratos brutos frente a *S. aureus* foi superior a 400 µg/mL, para *P. aeruginosa* chegou a 250 µg/mL e para *E. faecalis* foi 400 µg/mL. Em contraste a este estudo, os extratos G1, G2, G4 e G5 obtiveram inibição do crescimento de *S. aureus* com 250 µg/mL, chegando a ser inferior a 7,81 µg/mL no extrato bruto G4. Quando comparado o MID frente a *E. faecalis*, houve inibição do crescimento bacteriano do extrato G1 e G3 na concentração 250 µg/mL, sendo inferior ao descrito por Alves *et al* (2008). Em relação a *P. aeruginosa*, o MID dos extratos G1 e G5 tiveram inibição com 500 µg/mL, sendo superior a descrição de Alves *et al* (2008).

Quadro 12: Dosagem Inibitória Mínima frente *C. albicans*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	G1	G2	G3	G4	G5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-
250 µg/mL	-	-	-	-	-
125 µg/mL	+	-	-	-	-
62,5 µg/mL	+	-	+	-	+
31,25 µg/mL	+	+	+	+	+
15,62 µg/mL	+	+	+	+	+
7,81 µg/mL	+	+	+	+	+

6.3.3 Avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana das frações dos extratos de *P. lilacinus* – Dosagem Inibitória Mínima (MID)

A concentração inibitória mínima foi testada com as frações obtidas com as extrações (líquido-líquido, fase sólida-SPE) frente, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, *C. albicans*. O Quadro 13 demonstra os resultados dos extratos frente *E. faecalis*.

Quadro 13: Resultados da concentração inibitória mínima frente *E. faecalis*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	Am	A2	A4	A5	Mm	M2	M4	M5	Sm	S2	S4	S5	E5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125 µg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
62,5 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31,25 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,62 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,81 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Os resultados do MID frente *P. aeruginosa* estão expostos no quadro 14.

Quadro 14: Resultados da concentração inibitória mínima frente *P. aeruginosa*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	Am	A2	A4	A5	Mm	M2	M4	M5	Sm	S2	S4	S5	E5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125 µg/mL	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
62,5 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31,25 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,62 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,81 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Müller (2006) afirmou que extratos brutos podem apresentar compostos de polaridades distintas com interações sinérgicas, apresentando aumento de atividade em bioensaios, que pode ser reduzida quando as substâncias são isoladas.

Barbosa (2009) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos/frações de fungos endofíticos frente a cepas presentes em infecção endodôntica. Ele verificou que o extrato VRTRB1 2.1a apresentou inibição na concentração 1000 µg/mL e o extrato VRC2 não foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* na concentração 1000 µg/mL durante o MID, enquanto os extratos brutos deste estudo demonstraram atividade antibacteriana na concentração 500 µg/mL, chegando a ser inferior a 7,81 µg/mL no extrato G4. Também foi testada a fração VRC2 2.2 – TC4 que apresentou atividade na concentração 250 µg/mL, e neste estudo oito frações apresentaram atividade antibacteriana a 125 µg/mL e 5 a 250 µg/mL. Os demais extratos e frações testados por Barbosa (2009) não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos *E. faecalis* e *C. albicans*.

O Quadro 15 exibe os resultados do MID frente *S. aureus*.

Quadro 15: Resultados da concentração inibitória mínima frente *S. aureus*.
Crescimento microbiano (+). Ausência de crescimento microbiano (-).

Concentração	Am	A2	A4	A5	Mm	M2	M4	M5	Sm	S2	S4	S5	E5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 µg/mL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250 µg/mL	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
125 µg/mL	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
62,5 µg/mL	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
31,25 µg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15,62 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,81 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Banhos *et al* (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* frente aos patógenos: *S. aureus*, *E. faecalis* e *Penicillium avellaneum*. Foi avaliado o MID das frações FA1 e FA2. Para *S. aureus*, o MID obtido pelas frações FA1 e FA2 foi 25 µg/mL, para *E. faecalis*, o MID obtido foi 50 µg/mL, e para *P. avellaneum* chegou a 12,5 µg/mL. O resultado de Banhos *et al* (2014) foi superior frente a *E. faecalis*, comparando com o presente estudo, que obteve o MID em 125 µg/mL nas frações A4 e A5, e discretamente superior frente a *S. aureus*, onde foi obtido 31,25 µg/mL também nas frações A4 e A5.

Koolen *et al* (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano de *Penicillium* sp, um fungo isolado de *Mauritia flexuosa* L. f. frente aos patógenos *S. aureus*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*, e identificaram 7 compostos presentes no extrato acetato de etila do micélio.

O extrato bruto apresentou atividade frente a *S. aureus*, com inibição na concentração 500 µg/mL. Dos 7 compostos identificados, um deles apresentou atividade frente a *S. aureus*, *M. luteus* e *E. coli* com inibição até a concentração 100 µg/mL, esse composto foi identificado como o alcaloide indólico glandicoline B, e os outros 6 compostos não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados. Diferente do presente estudo, que obteve o MID em 31,25 µg/mL frente a *S. aureus* com as frações A4 e A5.

Os resultados da avaliação frente *C. albicans* está representado no Quadro 16.

Quadro 16: Resultados da dosagem inibitória mínima frente *C. albicans*.
Crescimento microbiano +. Ausência de crescimento microbiano.

Concentração	Am	A2	A4	A5	Mm	M2	M4	M5	Sm	S2	S4	S5	E5
1000 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
125 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
62,5 µg/mL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
31,25 µg/mL	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
15,62 µg/mL	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,81 µg/mL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

O ensaio para verificar se a atividade antimicrobiana foi bactericida/fungicida ou bacteriostática/fungistática está representado no Quadro 17. Somente a fração Sm apresentou atividade bactericida/fungicida frente a todos os patógenos testados, porem em concentrações altas quando comparada (de 250 µL a 500 µL) as demais frações. As frações A4 e A5 apresentaram melhores resultados, tendo o menor MID frente a *E. faecalis* na concentração 125 µg/mL, mas com atividade bacteriostática. Para *S. aureus*, essas frações permitiram a atividade bactericida na concentração 31,25 µg/mL. Quando as frações A4 e A5 foram testadas frente a *P. aeruginosa*, apresentaram atividade bacteriostática na concentração 125 µg/mL. Frente a *C. albicans*, o MID das frações A4 e A5 chegaram a 15,62 µg/mL, com ação fungicida. Os resultados de Teles *et al* (2013) corroboram com esses resultados descritos a cima.

Quadro 17: Resultado da avaliação das MFD e MBD dos extratos e frações dos metabólitos secundários de *P. lilacinus*.

Frações	<i>Candida albicans</i>		Atividade antimicrobiana	<i>Enterococcus faecalis</i>		Atividade antimicrobiana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Atividade antimicrobiana	<i>Staphylococcus aureus</i>		Atividade antimicrobiana
	Poço ↑	Poço ↓		Poço ↑	Poço ↓		Poço ↑	Poço ↓		Poço ↑	Poço ↓	
Am	C -	E +	Fungicida	B +	D +++	Bacteriostático	C -	E +	Bactericida	A -	B +	Bactericida
A2	E +	G +++	Fungicida	B +	D +++	Bacteriostático	C +++	E +++++	Bacteriostático	A +	C +++	Bacteriostático
A4	F -	H +	Fungicida	C +	E +++	Bacteriostático	C +++	E +++++	Bacteriostático	E -	G +++	Bactericida
A5	F -	H +	Fungicida	C +	E +	Bacteriostático	C +++	E +++++	Bacteriostático	E -	G +++	Bactericida
Mm	D -	F ++	Fungicida	B +	D +++	Bacteriostático	C -	E +++++	Bactericida	D -	F +++	Bactericida
M2	D -	F ++	Fungicida	B +	D +++	Bacteriostático	C -	E +++++	Bactericida	D +	F +++++	Bacteriostático
M4	E -	G ++	Fungicida	B +	D +++	Bacteriostático	B -	D +++++	Bactericida	D +	F +++	Bacteriostático
M5	D -	F ++	Fungicida	B +	D +++	Bacteriostático	B -	D +++++	Bactericida	D ++	F +++	Bacteriostático
Sm	B -	D ++	Fungicida	B -	D ++	Bactericida	B -	D +++	Bactericida	A -	C +	Bactericida
S2	B -	D +++	Fungicida	B +++	D ++++	Bacteriostático	B -	D +++	Bactericida	A -	C +	Bactericida
S4	C -	E +	Fungicida	B ++	D +++	Bacteriostático	C -	E +++++	Bactericida	B +	D +++	Bacteriostático
S5	C -	E +	Fungicida	B ++	D +++	Bacteriostático	C -	E +++++	Bactericida	D +	F +++	Bacteriostático
E5	D -	F ++	Fungicida	B -	D +++	Bactericida	B -	D +++	Bactericida	D +	F +++++	Bacteriostático

*- nenhum crescimento/ + ≤ 10 UFC, ++ 10 < UFC ≤ 20, +++ 20 < UFC ≤ 40, ++++ 50 < UFC ≤ 100, +++++ > 100

6.4 Bioautografia

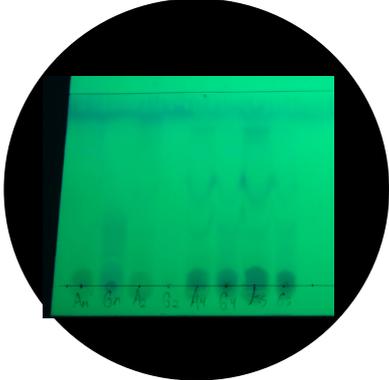
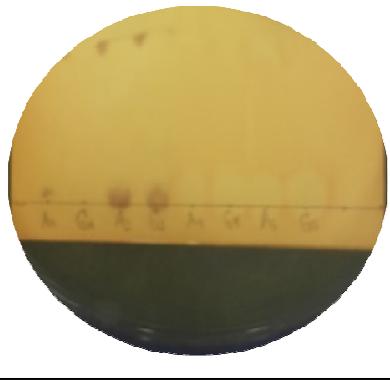
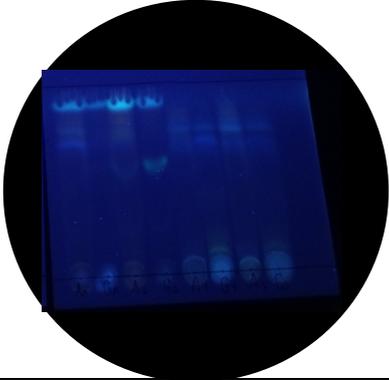
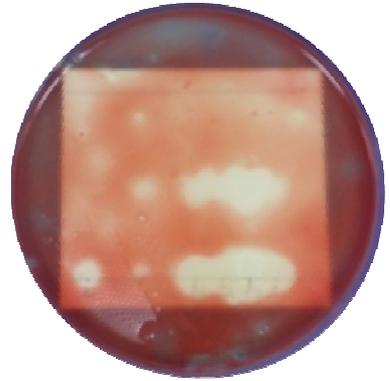
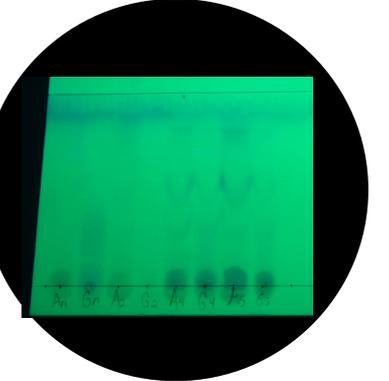
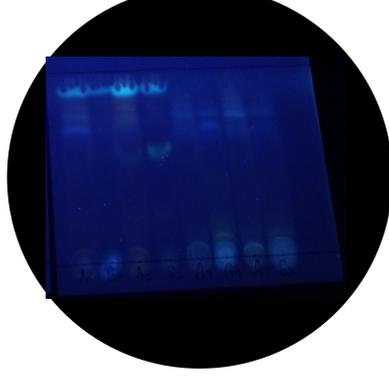
As placas cromatográficas utilizadas na bioautografia foram reveladas com métodos destrutivos (vanilina sulfúrica, NP PEG e dragendorff) e não destrutivos (luz UV 254nm e 365nm). Os halos de inibição formados podem ser observados no Quadro 18 e demonstram para *C. albicans* o mínimo de duas substâncias para as amostras Am e A2 que apresentaram baixa atividades inibitórias (fungicidas e fungiestáticas respectivamente) quando comparados com as frações A4 e A5 e os extratos que deram origem a elas, que ficaram com a MFD de 15,62 µg/mL. Estes resultados evidenciam o potencial destas misturas presentes nas frações para o controle de *C. albicans*.

Para *E. faecalis* o resultado da bioautografia não foi satisfatório, e será necessário repetir. Infelizmente a MBD apresentou resultados apenas para Sm e E5 e estas frações não foram testadas neste ensaio.

Para *S. aureus*, as frações A4 e A5 e os extratos G4 e G5 apresentaram halo de inibição em dois pontos, sugerindo o mínimo de duas frações com bioatividade. Vale lembrar que tanto *C. albicans* quanto *S. aureus* apresentam parede celular Gram positiva e foram as mesmas frações que apresentaram os melhores resultados para estes patógenos, o que pode indicar que o mecanismo de ação age sobre a parede, talvez modificando a permeabilidade desta e provocando a morte celular. É necessário, portanto, uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo de ação destas frações (A4 e A5). Para *P. aeruginosa*, as frações A2 e A4 apresentaram dois pontos de inibição, enquanto A5 e os extratos G4 e G5 apresentaram um ponto de inibição que ocorreu próximo a linha de aplicação das amostras.

Cafêu *et al* (2005) fizeram bioautografia do extrato bruto de milho, substâncias isoladas desse extrato e dos metabólitos secundários de *Xylaria* sp. frente aos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. O extrato bruto de milho e suas substâncias isoladas não apresentaram bioatividade, diferente do que ocorreu com os metabólitos de *Xylaria* sp. que apresentaram substâncias antifúngicas pelo teste de bioautografia. Trabalhos anteriores de nosso grupo também tem demonstrado a atividade antimicrobiana dos extratos de *Xylaria* e de outros fungos endofíticos, mas poucos apresentaram atividade antimicrobianas tão acentuadas quanto os extratos e frações de *P. lilacinus* aqui apresentados.

Quadro 18: Ensaio de bioautografia e seus controles com os extratos e frações ativos

<p style="text-align: center;"><i>Candida albicans</i></p> 	<p style="text-align: center;">Luz UV 254nm</p> 
<p style="text-align: center;"><i>Enterococcus faecalis</i></p> 	<p style="text-align: center;">Luz UV 365nm</p> 
<p style="text-align: center;"><i>Staphylococcus aureus</i></p> 	<p style="text-align: center;">Luz UV 254nm</p> 
<p style="text-align: center;"><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> 	<p style="text-align: center;">Luz UV - 365 nm</p> 

6.5 Descontaminação dos cones de guta percha

Os extratos A4 e A5 foram eficientes no processo de descontaminação na concentração 2 mg/mL durante 10 minutos, demonstrando resultados idênticos ao controle positivo, no qual foi utilizado o hipoclorito de sódio a uma concentração de 2,5%. Houve crescimento microbiano nos controles negativos realizados com água destilada, o que demonstra que os patógenos estavam viáveis durante o processo de contaminação (quadro 19).

Quadro 19: Contagem das UFC obtidas na descontaminação dos cones de guta percha

Extratos testados	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
A4				
A5				
Controle Negativo				
Controle positivo				

A avaliação das frações testadas no processo de descontaminação dos cones de guta percha foi realizada através do método clássico de contagem das Unidades Formadoras de Colônia, representada no Quadro 20.

Quadro 20: Quantidade de UFC/mL obtida após a descontaminação

Microrganismos testadores	Controle negativo			Média
<i>E. faecalis</i>	1209	1185	1323	1239
<i>P. aeruginosa</i>	984	1079	1006	1023
<i>S. aureus</i>	816	897	819	844
<i>C. albicans</i>	13	9	19	13,7

Pires Jr (2011) avaliou qualitativamente duas substâncias químicas utilizadas na descontaminação dos cones de guta percha frente *E. faecalis*. Nesse trabalho, ele testou formas de apresentação diferentes (cloredixina gel 2%, clorexidina líquida 2%, hipoclorito de sódio 2,5% e hipoclorito de sódio 5,25%) e tempo. Todas as substâncias testadas foram eficientes no processo de descontaminação em 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos e 30 minutos, exceto a clorexidina líquida 2% que só apresentou atividade após 30 minutos de descontaminação. O presente estudo teve atividade biológica frente aos quatro patógenos testados, sendo que as duas frações foram eficientes após 10 minutos de desinfecção, apresentando um resultado superior ao desempenho da clorexidina líquida 2% frente *E. faecalis*.

Fagundes *et al* (2005) avaliaram a eficácia da descontaminação dos cones de guta percha frente a *E. faecalis* por agentes químicos, entre eles 1. álcool 70 %, 2. álcool 70 % + iodo, 3. álcool 70 % + clorexidina 4 %, 4. clorexidina 4 %, 5. NaOCl 2,5 %, 6. NaOCl 5,25% e 7. solução salina. Também foi avaliado o tempo necessário para uma efetiva descontaminação, de 1 e 5 minutos. Os grupos 1, 2, 5 e 7 apresentaram crescimento microbiano após 1 minuto de descontaminação; decorridos 5 minutos os grupos 5 e 7 foram os únicos a apresentar crescimento microbiano. O presente estudo obteve excelentes resultados, com a ausência de crescimento microbiano, porém o tempo testado foi 10 minutos, sendo superior aos dois tempos testados por Fagundes *et al* (2005).

Souza *et al* (2003) avaliaram a descontaminação dos cones de guta percha com três diferentes agentes químicos, polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I), hipoclorito de sódio 5,25 % e formaldeído, frente aos patógenos *E. faecalis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus mutans* nos tempos 3, 15 e 45 segundos e 1 hora. Todos os agentes químicos testados com variação no tempo de descontaminação apresentaram resultados satisfatórios. Os resultados do presente estudo foram inferiores em relação ao tempo testado, porém com a

concentração de agentes a 2 mg/mL, o que pode ter influenciado resultado de Souza *et al* (2003), que utilizou o hipoclorito de sódio a 5,25 %.

Novos ensaios precisam ser realizados com as frações testadas, incluindo a variação no tempo de descontaminação e na concentração, podendo ser testadas as substâncias que serão isoladas e purificadas.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou resultados favoráveis ao uso de agentes naturais de origem da microbiota amazônica, concluindo que:

- Os extratos orgânicos produzidos por *Paecilomyces lilacinus* apresentaram atividade biológica frente aos patógenos associados a infecção endodôntica: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;
- As frações A4 e A5 apresentaram os melhores resultados na dosagem mínima inibitória, variando entre 125 µg/mL até 15,62 µg/mL, concentração bem inferior aos antimicrobianos sistêmicos (amoxicilina, nistatina) comumente utilizados em odontologia;
- A biautografia demonstrou ocorrência maior de halos de inibição nos extratos G4 e G5, e nas frações A4 e A5, sugerindo que a purificação da substância ativa possa aumentar a atividade antimicrobiana dessas frações;
- O ensaio para descontaminação dos cones de Guta Percha apresentou-se bastante promissor na concentração 2 mg/mL com as frações A4 e A5, devendo prosseguir com a purificação e caracterização da substância ativa para depois avaliar seu potencial como substância natural auxiliar;

8 PERSPECTIVAS

1. Concluir as análises taxonômicas iniciadas;
2. Elucidar as substâncias bioativas;
3. Desenvolver uma formulação líquida e/ou viscosa para assepsia dos cones de guta percha e para controle dos patógenos *in situ*;

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINADER, C. D. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente a *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis***. 160p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 2005.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n.5, p.1224-1229, 2008

ALVES, R. A. A. ; SAMPAIO, F. C.; GUEDES, O. A.; ALENCAR, A. H. G.; ESTRELA, C. R. A. ; ESTRELA, C. Suscetibilidade do *E. faecalis* e *S. aureus* a vários antimicrobianos. **Rev Odontol Bras. Central.**, v.21, n.56, p.426-429, 2012.

AMARAL, R. R. DO; ARCENIO NETO, F.; CARVALHO, E. S.; TEIXEIRA, L. A. ; DE ARAÚJO, G. L.; SHARAPIN, N.; TESTA, B.; GNERRE, C.; ROCHA, L. Avaliação da atividade antimicrobiana IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.24-27, 2003.

ANGELO, I. da C. 2007. **Avaliação in vitro dos efeitos de *Isaria farinosa*, *I. fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* e *Lecanicillium lecanii* sobre *Boophilus microplus***. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2007.

ARIAS-MOLIZ, M. T.; FERRER-LUQUE, C. M.; ESPIGARES-GARCIA , M.; BACA, P. *Enterococcus faecalis* Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p.711-714, 2009.

AZEVEDO, C. M. A. **Bioprospecção: Coleta de Material Biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**. 2 edição. São Paulo : Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2003. 35p.

AZEVEDO, J. L. Micro-organismos Endofíticos. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. (eds). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p. 117-137, cap. 4.

BACON, C. W. e WHITE JR, J. F. **Microbial Endophytes**. 1 edição. New York: Marcel Dekker, 2000. 500p.

BANHOS, E. F. dos; SOUZA, A. Q. L. de; ANDRADE, J. C. de; SOUZA, A. D. L. de; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p.153-161, 2014

BARBOSA, R. S. S. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos frente a cepas presentes nas endodônticas**. 59p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 2009.

BAUMGARTNER, J. C., WATTS, C. M. e XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, v.26, n.12, p.695-698, 2000

BERBER, V. B. **Verificação da redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares e técnicas de instrumentação: estudo *in vitro***. 108p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica). Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP. Piracicaba, SP, 2005.

BERBER, V. B.; GOMES, B. P. F. Q.; SENA, N. T.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v.39, p.10-17, 2006.

BERNARDI-WENZEL, J.; SIQUEIRA, A.L.; GONÇALVES, S.A. Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **SaBios:Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.86-96, 2012.

BODRUMLU, E.; SEMIZ, M.. Antibacterial activity of a new endodontic sealer against *Enterococcus faecalis*. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.72, n.7, p.637, 2006.

BORTOLINI, M. C. T. **Avaliação de cimentos endodônticos quanto à penetração intratubular e microinfiltração por *Enterococcus faecalis***. 72p. Dissertação (Mestrado em Endodontia). Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, 2006.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev.**, v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRANDILEONE, M.C.C.; CASAGRANDE, S.T.; MARIA-LUIZA, L.; GUERRA, S.; ROSEMEIRE, C.Z.; ANA-LUCIA, S.; ANDRADE, S. DE; DI FABIO, J.L. Increase in numbers of β -lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.567-574, 2006.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A.. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.6, p.1211-1233, 1995.

CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; OLIVEIRA, A. D. DE; PAES, V. DOS S.; ARIEIRA, G. DE O.; BAIDA, F. C. Efeito de isolados de *Pacilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaensis*. **Ciênc. agrotec.**, v.33, n.3, p.713-720, 2009.

CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. da S.; ARAÚJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n.6, p.991-995, 2005.

CAREY, J.; D'AMICO, R.; SUTTON, D. A.; RINALD, M. G. *Paecilomyces lilacinus*: Vaginitis in an Immunocompetent Patient. **Emergin Infections Diases**, v.9, n.9, p.1155-1158, 2003.

CHIVATXARANUKUL, P., DASHPER, S. G.; MESSER, H. H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v.41, p.873-882, 2008.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N. Metabolites from the endophytic mitosporic *Dothideomycete* sp. LRUB20. **Phytochemistry**, v.70, p.121-127, 2008.

CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**, v.18, n.5, p.460-467, 1995.

CUI, Y.; YI, D.; BAI, X.; SUN, B.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from Ginkgo biloba. **Fitoterapia**, v.83, p.913-920, 2012.

CUNICO, M. M.; AUER, C. G.; LIMA, C. P. DE; CÓCCO, L. C.; YAMAMOTO, C. I.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; SANQUETTA, C. R. Bioautography to assess antibacterial activity of *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae) on the human oral microbiota. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.4, p.515-519, 2012.

DARRAG, A. M. Antimicrobial efficacy of endodontic irrigation solutions against planktonic microorganisms and dual-species biofilm. **Tanta Dental Journal**, v.10, p.129-137, 2013.

DI MIGUELI, C. O. Aclimação a diferentes condições de luminosidade de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). **Ecologia da Floresta Amazônica**, p.1-9, 2008.

DIAS, J. F. G.; VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI-JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, A. B.; FERRONATO, M. L. Atividade antibacteriana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.83-87, 2005.

FAGUNDES, F. S.; LEONARDI, D. P.; HARAGUSHIKU, G. A.; BARATTO FILHO, F.; TOMAZINHO, L. F.; TOMAZINHO, P. H. Eficiência de diferentes soluções na descontaminação de cones de guta-percha expostos ao *Enterococcus faecalis*. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v.2, n.2, p.7-11, 2005.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. V. L. da; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.17-19, 2002.

FERGUSON, J. W., HATTON, J. F. e GILLESPIE, M.J. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. **Journal of endodontics**, v.28, n.2, p.68-71, 2002.

FERNANDES, M. R. V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.4, 2009.

FERRARI, P. H. P., CAI, S.; BOMBANA, A. C. Periodontite Apical Secundária. In: MACEDO, M. C. S.; BALDACCI FILHO, R. **25o. Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo**. 2007, p. 342-354, cap.11.

FIGUEIREDO, J. A. G. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PN, 2006.

FLEURY, A.; DEBELIAN, G. Infecções endodônticas. In: BERGER, C. R. **Microbiologia de interesse para a Endodontia**. São Paulo: Pancast, 1998, p. 81-102.

FORMAGIO, A. S. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. da S.; VIEIRA, M. do C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.4, p.349-354, 2010.

GALLINA, G.; GIAMMANCO, M. G. ; CUMBO, E.; PIZZO, G.; NICOLOSI, G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. **Journal of Dentistry**, v. 34, p.35-40, 2006.

GERIS, R.; RODRIGUES FILHO, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v.61, n.8, p. 907-912, 2002.

GERIS, R.; RODRIGUES FILHO, E. Structures of Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp, an Endophytic Fungus found Associated with *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.5, p. 722-727, 2003a.

GERIS, R.; RODRIGUES FILHO, E. Further Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp, an Endophyte Obtained from *Melia azedarach*. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences*, v.58, p.319-324, 2003b.

GOMES, B. P. F. A. Microrganismos: quais são, onde estão, que danos causam? In: 20o. Congresso Internacional de São Paulo. **Endodontia/Trauma**. São Paulo, 2000, p.77-97, cap. 15.

GOMES, B. P. F. A.; PINHEIRO, E. T.; GADÊ-NETO, C. R.; SOUSA, E. L. R.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, p.71-76, 2004.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, p.135-136, 1997.

ITIN, P. H.; FREI, R. ; LAUTENSCHLAGER, S.; BUECHNER, S. A.; SURBER, C.; GRATWOHL, A.; WIDMER, A. F. Cutaneous manifestations of *Paecilomyces lilacinus* infection induced by a contaminated skin lotion in patients who are severely immunosuppressed. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.39, n.3, p.401-409, 1998

JACKSON, S. T.; SMIKLE, M. F.; ANTOINE, M. G.; ROBERTS, G. D. *Paecilomyces lilacinus* fungemia in a Jamaican neonate. **West Indian Medical Journal**, v.55, n.5, p.1, 2006.

JACOBY, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin Infect Dis.**, v.41, n.2, p.120-126, 2005.

KAKEHASHI, S., STANLEY, H. R. E FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg.**, September de 1965, Vol. 20, 3, pp. 340-349.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Biological Control**, v.38, p.179-187, 2006.

KOOLEN, H. H. F. ; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A. da; ALMEIDA, R. A. de; SOUZA, A. D. L. de. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f. **Química Nova**, v.35, n.4, p.771-774, 2012.

KUSARI, S., PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, 2012.

LEONARDO, M. R.; LEAL, J. M. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares**. 3ª edição. São Paulo: Panamericana, 1998.

LI, Y. C.; TAO, W. Y. Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation. **Cell Biology International**, v.33, p.106-112, 2009.

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

LIVERMORE, D.M.; WINSTANLEY, T.G.; SHANNON, K.P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **J Antimicrob Chemother**, v.48, n.1, p.87-102, 2001.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. **Endodontia: Biologia e Técnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 980 p.

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

MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E., B. E. ; JIMÉNEZ-ESTRADA M.; GONZÁLEZ, M. C. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. **Phytochemistry**, v.69, p.1185-1196, 2008.

MAGALHÃES, K. M. **Análise in vivo da eficácia antibacteriana do preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio a 2,5% e da medicação intracanal com a pasta HPG em canais radiculares infectados.** 74p. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estácio de Sá. Rio de Janeiro, RJ, 2006.

MILLER, W. D. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. **Dent Cosmos**, v.36, p.505-528.

MONTEIRO, J. M. M. **Ação de enxaguatórios bucais na desinfecção de resinas acrílicas utilizadas como base de próteses colonizadas por *Candida albicans* - Análise in vitro.** 59p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2012.

MOURA, P. S.; ALVARES, L. D.; TUJI, F. M.; NOGUEIRA, J. S. E. Complicação sistêmica de angina de Ludwig: relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, v.24, n.2, p.71-75, 2010.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C. ; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial, Cytotoxic, and Antifungal Alkaloids from *Duguetia hadrantha*. **Journal of Natural Products**, v.64, n.5, p.559-562, 2001.

MÜLLER, J. de B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antinociceptiva das folhas da *Luehea divaricata* Martius.** 99p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2006.

MURAD, C. F.; SASSONE, L. M.; FAVERI, M.; HIRATA JR, R.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbial Diversity in Persistent Root Canal Infections Investigated by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. **Journal of Endodontics**, v.40, n.7, p.899-906, 2014.

NAVARRO, V. R.; SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p.23-29, 2001.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J Biol Chem.**, v.269, n.6, p.3905-3908, 1994.

NIMNOI, P., PONGSILP, N. e LUMYONG, S. Genetic diversity and community of endophytic actinomycetes within the roots of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec assessed by Actinomycetes-specific PCR and PCR-DGGE of 16S rRNA gene. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p.592-601, 2010.

OLIVEIRA, J. C. M., DIAS, L. A. e UZEDA, M. de. Antibióticos sistêmicos em Endodontia: novos conceitos. **Rev. bras. Odontol**, v.67, n.2, p.247-254, 2010.

OLIVEIRA, J. G. DE S. **Estudo da biodiversidade de fungos endofíticos, potencial citotóxico e antimicrobiano de *Duguetia flagellaris* Huber.**70p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2013.

OLIVEIRA, N. C. **Seleção de microrganismos endofíticos com potencialidades para a biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e/ou derivados.** 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO, 2009.

ORLANDELLI, R. C., ALBERTO, R. N. e KWIATKOWSKI, A. **Ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* sw. contra *Micrococcus luteus*.** In: *VII Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, Maringá: 2011.

OYAMA, T.; NAKANO, M. H. ; ARAI, T.; KATO, D. ; MAEDA, N. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Iontophoresis against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. **J. Oral Biosci**, v.51, n.2, p.91-96, 2009.

PÉCORA, J. D.; RIBEIRO, R. G. ; GUERISOLI, D. M. Z.; BARBIZAM, J. V. B.; MARCHESAN, M. A. Influence of the spatulation of two zinc oxide-eugenol-based sealers on the obturation of lateral canals. **Pesqui. Odontol. Bras**, v.16, n.2, 2002.

PEDROSO, J. A. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos.** Tese (Doutorado em Clínica Odontológica). Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP. Piracicaba, SP, 2000.

PHEE, A.; BONDY-DENOMY, J.; KISHEN, A.; BASRANI, B.; AZARPAZHOOH, A.; MAXWELL, K. Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Endodontics**, v.39, n.3, p.364-369, 2013.

PIRES JR, A. J. M. P. **Estudo in vitro da ação antimicrobiana de soluções químicas auxiliares frente à desinfecção de cones de guta-percha.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2011.

PIZZO, G.; GIAMMANCO, M. G. ; NICOLOSI G, Gallin, G.; NICOLOSI, G.; GALLINA, G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. **Journal of Dentistry**, v.34, p.35-40, 2006.

QUEIROZ, F. F. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobianas dos cimento Endomethasone, Endofil e MTA Fillapex utilizando o método de difusão em ágar.** 40p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2011

QUEIROZ, F. F. **Reabsorção Dentária Interna: Relato de casos.** 25p. Monografia (Especialização em Endodontia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2013.

RADCLIFFE, C. E.; POTOURIDOU, L.; QURESHI, R.; HABAHBEH, N.; QUALTROUGH, A.; WORTHINGTON, H.; DRUCKER, D. B. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeshlundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **international endodontic journal**, v.37, p.438-446, 2004.

RADIC, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi—The treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v.19, p.1270-1284, 2012.

RICE, L.B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. **Am J Med.**, v.119, n.6A, p.11-19, 2006.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. In: **Studies in Mycology**. Baarn, 1974, v.6.

SANTI, B. T. di. **Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico**. 31p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP. Piracicaba, SP, 2013.

SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1055-1064, 2006.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v.13, p.64-70, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.

SENA, N. T. **Propriedades antimicrobianas do cimento AH Plus, Sistema Epiphany e de cones de guta percha e Resilon desinfetados**. 174p. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica). Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP. Piracicaba, SP, 2009.

SILVA, H. S. A.; TOZZI, J. P. L.; TERRASAN, C. R.; BETTIOL, W. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, v.63, p.63-67, 2012.

SIQUEIRA JR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.97, n.5, p. 32-41, 2004.

SIQUEIRA JR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P.; MAGALHÃES, F. A. C.; UZEDA, M.de. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **Journal of endodontics**, v.29, n.8, p.501-504, 2003.

SOUZA, A. D. L. **Perfis químico Pos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros *Eutypa*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis* isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Strychnos cogens*, *Pinus taeda* e *Gustavia cf. elliptica***. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2005.

SOUZA, A. Q. L. de; SOUZA, A. D. L. de; ASTOLFI FILHO, S.; BÉLEM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. de M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v.34, n.2, p.185-195, 2004.

SOUZA, A. Q. L. DE. **Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. Tese (Doutorado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 2006.

SOUZA, R. E. de; SOUZA, E. A. de; SOUSA-NETO, M. D.; PIETRO, R. C. L. R. In vitro evaluation of different chemical agents for the decontamination of gutta-percha cones. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.1, p.75-77, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment/ Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, v.32, n.2, p.93-98, 2006.

TAVARES, F. A.; SILVA, D. V. **Microbiologia endodôntica - uma revisão do processo**. Monografia (Especialização em Endodontia). Instituto de Educação da Saúde. Belo Horizonte, MG, 2011.

TELES, A. P. C., ATALIBA, G. S.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of *Paecilomyces lilacinus* antimicrobial metabolite production by co-culturing with *Salmonella typhimurium*. **Natural Product Research**, v.27, n.17, p.1598-1601, 2013.

TODA, C. **Potencial Antimicrobiano de fungos endofíticos com ação antagônica a microrganismos de interesse odontológico**. 79p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 2010.

TOMAZINHO, L. F.; SILVA, D. C. C. da; FAGUNDES, F. S.; TOMAZINHO, P. H. Estudo in vitro da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras na eliminação de *Enterococcus faecalis*. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v.4, n.1, p.12-16, 2007.

TOMAZINHO, P. H. e OLICSHEVIS, T. Atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos: revisão crítica. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, 2007.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (aroeira)**. 138p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 2010.

TORABINEJAD, M.; WALTON, R. E. **Endodontia: princípios e práticas**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

TORTAMANO, I. P.; HORLIANA, A. C. R. T.; COSTA, C. G.; ROMANO, M. M.; SOARES, M. S.; ROCHA, R. G. Antibioticoterapia no tratamento de abscessos periapicais agudos: quando indicar e como proceder? **Revista Odonto**, v.16, n.32, p.90-97, 2008.

VIVACQUA-GOMES, N.; GURGEL-FILHO, E. D.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single – or

multiple – visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. **International Endodontic Journal**, v.38, p.697-704, 2005.

VOLL, E., GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F. S. Ácido aconítico em sementes de espécies de plantas daninhas de diferentes locais. **Planta Daninha**, v.28, n.1, p.13-22, 2010.

WESSOLOSSKY, MIREYA, HARAN, JOHN P.; BAGCHI, KAUSHIK. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. **Diagnostic Microbiology and infections disease**, v.61, p.354-357, 2008.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. *et al.* **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990.

YIN, H.; SUN, Y. H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, v.18, p.802-805, 2011.

YOU, X.; FENG, S.; LUO, S.; CONG, D. Studies on a rhein-producing endophytic fungus isolated from *Rheum palmatum* L. **Fitoterapia**, 2012.

ZHANG, Q.; WEI, X.; WANG, H. Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspense*. **Fitoterapia**, v.83, p.1500-1505, 2012.

10 ANEXO

Meios de culturas e soluções utilizadas nesta pesquisa:

I

<u>Ágar Batata Dextrose – BDA</u>	
Batata descascada	200g
Dextrose	20g
Extrato de levedura	2g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL

II

<u>Caldo Batata Dextrose – BDL</u>	
Batata descascada	200g
Dextrose	20g
Extrato de levedura	2g
Água destilada	1000 mL

III

<u>Ágar Brain Heart Infusion – BHI (himedia®)</u>	
Ágar BHI	52g
Água destilada	1000 mL

IV

<u>Caldo Brain Heart Infusion – BHI (himedia®)</u>	
Caldo BHI	37 g
Água destilada	1000 mL

V

<u>Ágar Sabouraud – SBA (himedia®)</u>	
Ágar Sabouraud	65g
Água destilada	1000 mL

VI

<u>Caldo Sabouraud – SB (himedia®)</u>	
Caldo Sabouraud	60 g
Água destilada	1000 mL

VII

<u>ISP₂</u>	
Amido	10g
Extrato de levedura	4g
Extrato de malte	10g
Dextrose	4g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL

VIII

<u>Malte</u>	
Malte	20g
Água destilada	1000 mL

IX

<u>Ágar Czapek</u>	
Glicose anidra	10g
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	3g
Fosfato Potássico dibásico anidro (K ₂ HPO ₄)	1g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,5g
Cloreto de potássio (KCl)	0,5g
Sulfato ferroso hidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,01g
Ágar	20g
Água destilada	1000 mL

X

<u>CYA</u>	
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	1g
Extrato de levedura	5g
Sacarose	10g
Czapeck concentrado	30 mL
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL

XI

<u>20 % de Glicerol</u>	
Glicerol	20 mL
Água destilada estéril	80 mL

XII

<u>Álcool 70%</u>	
Álcool 92,8° INPM	730 mL
Água destilada	270 mL

XIII

<u>Tetraciclina 2mg/mL</u>	
Tetraciclina	500 mg
Álcool 70%	125 mL
Água destilada	125 mL

XIV

<u>Ampicilina 2mg/mL</u>	
Ampicilina	500 mg
Água destilada	250 mL

XV

<u>Nistatina 2mg/mL</u>	
Nistatina	150 mg
Água destilada	75 mL

XVI

<u>Hipoclorito de sódio 2,5%</u>	
Hipoclorito de sódio 2,5%	1 L

XVII

<u>Nitroazul de Tetrazólio (NBT) 1%</u>	
Nitroazul de Tetrazólio	1 mg
Água destilada	100 mL

XVIII

<u>Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) 1%</u>	
Cloreto de trifeniltetrazólio	1 mg
Água destilada	100 mL

ANEXO II

Quadro 21: Fatores de retenção (Rf) de extratos e frações de *P. lilacinus* com atividade biológica na bioautografia

Extrato/Fração	Sistema de eluição	Patógeno	Rf
A4	Acetato de etila/Metanol 8,5:1,5	<i>E. faecalis</i>	0,05
G4			0,07
A5			0,05
G5			0,06
A2		<i>P. aeruginosa</i>	0,03 - 0,78
A4			0,05 - 0,76
G4			0,03
A5			0,04
G5		0,05	
Am		<i>S. aureus</i>	0,05
A4			0,06 - 0,46
G4			0,06 - 0,48
A5			0,08 - 0,47
G5		0,07	
Am		<i>C. albicans</i>	0,06 - 0,46
Gm			0,04 - 0,52
A2			0,06 - 0,47
G2			0,03
A4			0,3
G4			0,3
A5	0,3		
G5	0,28		