



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**“POTENCIAL DE SUBSTÂNCIAS COLORIDAS PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENDOFÍTICOS AMAZÔNICOS PARA O
DIAGNÓSTICO BACILOSCÓPICO DA TUBERCULOSE”**

ALITA MOURA DE LIMA

**MANAUS
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALITA MOURA DE LIMA

**“POTENCIAL DE SUBSTÂNCIAS COLORIDAS PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENDOFÍTICOS AMAZÔNICOS PARA O
DIAGNÓSTICO BACILOSCÓPICO DA TUBERCULOSE”**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Júlia Ignez Salem

Co-Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

**MANAUS
2013**

ALITA MOURA DE LIMA

**“POTENCIAL DE SUBSTÂNCIAS COLORIDAS PRODUZIDAS
POR FUNGOS ENDOFÍTICOS AMAZÔNICOS PARA O
DIAGNÓSTICO BACILOSCÓPICO DA TUBERCULOSE”**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”.

em 31 de outubro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Júlia Ignez Salem

Presidente, Universidade Federal do Amazonas - AM

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto

Membro Externo, Universidade Federal do Amazonas - AM

Prof^ª. Dr^ª. Maria Ivone Lopes da Silva

Membro Externo, Universidade Federal do Amazonas - AM

Prof^ª. Dr^ª. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

Membro Externo, Fundação Oswaldo Cruz - AM

Prof. Dr. José Odair Pereira

Membro Interno, Universidade Federal do Amazonas – AM

Dedicatória

*À Dra. Júlia Ignez Salem, meu eterno
respeito e admiração por ser uma excelente
cientista e vitoriosa mulher.*

*Ao Dr. João Vicente Braga de Souza,
minha gratidão pela sua paciência e seus
ensinamentos, um verdadeiro Professor.*

*Ao meu Amor Alexandre Realini, pelos
incentivos e cuidados, sendo sempre a melhor
hora do meu dia.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me abençoar com sabedoria e ter colocado ao meu lado pessoas que foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho.

Meus agradecimentos e admiração a Minha Orientadora Dra. Júlia Ignez Salem por ser o exemplo do verdadeiro cientista, transbordando sabedoria e competência.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de doutorado que foi fundamental para minha dedicação no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao meu Co-orientador Dr. João Vicente Braga de Souza por toda orientação, ajuda e ensinamentos prestados.

A todos os Professores do Programa de pós Graduação em Biotecnologia por todo conhecimento passado.

Aos excelentes pesquisadores e amigos, Dr. Maurício Ogusku, Dra. Aya Sadahiro e Dra. Luciana Fujimoto, pelo apoio, ensinamentos e companheirismo em momentos ímpares em minha vida.

Aos meus Pais Vladimir Rosa de Lima e Persida Moura de Lima e As minhas lindas irmãs Ágata Moura de Lima e Agnes Moura de Lima, que mesmo com o sofrimento da distância me apoiaram com muito amor.

Ao meu Marido Alexandre Realini Dostal por todo apoio e companheirismo.

Aos colegas pós-graduandos pela amizade que me animava em momentos de cansaço: Fabiano Vargas, Ana Karla, Amaury Bentes e a minha mãe negra Ana Cláudia Cortez.

Aos técnicos de laboratório Sr. Francisco, Sr. Raimundo Bezerra, Sr. Rosalvo e Dona Eliana, fazendo dos meus dias uma doce rotina de trabalho.

E todos que me ajudaram direta ou indiretamente meus mais sinceros agradecimentos.

"A maturidade me permite olhar com menos ilusões, aceitar com menos sofrimento, entender com mais tranquilidade, querer com mais doçura."

Lya Luft

RESUMO

A tuberculose (TB), doença infecciosa que acomete em 90% dos casos os pulmões, é causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Embora a TB tenha sido descrita desde a antiguidade, ser diagnosticada a mais de 100 anos e possuir tratamento desde a década de 40, atualmente ainda é considerada um grave problema de saúde pública, sendo registrados anualmente 1,1 milhões de óbitos no mundo. Sabendo-se que o ciclo de transmissão da tuberculose envolve quase que exclusivamente o ser humano, um dos alvos para o controle global da doença é o diagnóstico, sendo esse vital para a quebra da cadeia de transmissão. Os Programas Mundiais de Controle da Tuberculose consideram a baciloscopia como a primeira opção para diagnóstico da Tuberculose pulmonar. No entanto, a solução corante de carbolfucsina utilizada na técnica é um composto tóxico, carcinogênico, combustível e contaminante da água. Com o objetivo de verificar o potencial de substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos filamentosos em substituição à carbolfucsina, foram analisados endofíticos oriundos dos vegetais *Himatanthus sucuuba*, *Copaifera multijuga*, *Piper aduncum* e *Senna reticulata*. A partir de 75 isolados, foram selecionados 30 com capacidade de produzir substâncias coloridas difusíveis em meio sólido. Os filtrados do cultivo em caldo foram testados quanto à capacidade de coloração em esfregaços preparados a partir da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A análise da coloração foi realizada por microscopia em campo claro e em fluorescência. Constatou-se a existência de capacidade de fluorescência em 78% dos filtrados de cultivo sobre as unidades bacilares de *M. tuberculosis*. No entanto, quando os filtrados foram submetidos a testes de coloração em outros microrganismos, *Escherichia coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 36232, constatou-se serem inespecíficos para *M. tuberculosis*. Em análise de caracterização química a substância responsável pela fluorescência apresentou características compatíveis com proteínas. Nesse sentido, apesar do resultado negativo ao objetivo proposto, tem-se a possibilidade da descoberta de proteínas fluorescentes que vêm sendo utilizadas como reveladores na monitoração de células, tecidos e na interação entre proteínas.

Palavras-chave: Substâncias coloridas; Diagnóstico; Tuberculose

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), an infectious disease that occurs in 90% of cases in the lungs, is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Although TB has been described since antiquity, being diagnosed about 100 years and has treatment from the 40s, is currently still considered a serious public health problem, being reported annually 1.1 million deaths worldwide. Knowing that the cycle of transmission of tuberculosis involving almost exclusively the human, being one of the targets for global TB control is the diagnosis, this being vital to break the chain of transmission. The Global Tuberculosis Control Programmes use bacilloscopies (microscopic detection of bacilli) as their first choice in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. However, carbolfucsina, the dye solution used in this method is a toxic carcinogenic compound which contaminates water and endagers human health. In order to verify the potential of coloured substances produced by fungi endophytic filamentous to replace carbolfucsina, endophytes derived from vegetables *H. sucuuba*, *C. multijuga*, *P. aduncum* and *S. reticulata* were analyzed. From 75 isolates, 30 were selected with capacity to produce coloured diffusible substances in solid medium. The culture filtrates were tested in for their ability to stain smears prepared from the standard strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Analysis of the staining was performed by bright field and fluorescence microscopy. Fluorescence substances identified as proteins by the Bradford technique, present in 78% of the culture filtrates, enabled the visualization of *M. tuberculosis* H37Rv. When the culture filtrates were tested with other microorganisms (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and *C. albicans* ATCC 36232) they were found to be nonspecific for *M. tuberculosis*. Despite the negative result of the proposed objective, there is potential for fluorescent proteins to be used in monitoring cell, tissue and protein interactions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

- Figura 1** Fluxo de atividades para busca, avaliação e caracterização de substâncias de origem fúngica com aplicação no diagnóstico baciloscópico da tuberculose..... 30

ARTIGO 1

- Figura 1** Filtrados de cultivo, da esquerda para direita, *Trichoderma longibrachiatum* 17H cultivado em meio Sabouraud; *Paecilomyces* C11 cultivado em meio batata+dextrose; *Fusarium* H54 cultivado em caldo Czapek e *Aspergillus* H22B cultivado em caldo Czapek..... 53
- Figura 2** *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cultivado, corados pelo filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1 e observado em microscópio de fluorescência – Filtro FS06, aumento 100x..... 55
- Figura 3** Comparação entre as Médias de bacilos por campo, contagem após coloração pelos filtrados de cultivo e método de Ziehl Neelsen. Os dados foram representados com média \pm erro padrão. As análises estatísticas estão representadas por asteriscos, indicando que são estatisticamente significativas 56
- Figura 4** *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923e *Candida albicans* ATCC 36232 corados pelo filtrado de cultivo *Aspergillus* P15, observados em microscópio de fluorescência – Filtro FS06, aumento 100x..... 57

ARTIGO 2

- Figura 1** Concentração das naftoquinonas produzidas por *Fusarium solani* C1 utilizando diferentes fontes de carbono (A) e nitrogênio (B). Nos experimentos de investigação da fonte de carbono, nitrato de sódio (3 g/L) foi utilizado como fonte de nitrogênio. Nos experimentos de investigação da fonte de nitrogênio, sacarose (30 g/L) foi utilizada como fonte de carbono 69
- Figura 2** Efeito das concentrações de manose, extrato de levedura e do pH na biossíntese das naftoquinonas 72

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Código identificador dos fungos endofíticos produtores de substâncias coloridas conforme a planta e parte vegetal de onde foram isolados e identificação fúngica.....	50
Tabela 2	Cor das substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos e o comprimento de onda, conforme os meios de cultivos utilizados	51
Tabela 3	Resultados baciloscópicos de esfregaços concentração 3+ de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, corados com os filtrados de cultivo de fungos endofíticos, conforme os meios de cultivo utilizados e tipo de leitura (campo claro e fluorescência)	54
Tabela 4	Influência das fontes de carbono e nitrogênio na concentração de proteínas e na capacidade de coloração de <i>M. tuberculosis</i> H37RV do filtrado de cultivo de <i>Fusarium solani</i> C1	58

ARTIGO 2

Tabela 1	Níveis utilizados para concentração de manose, extrato de levedura e pH no planejamento experimental	68
Tabela 2	Influência da [manose], [extrato levedura] e pH na produção de naftoquinonas por <i>F. solani</i> C1 em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial 2 ³	70
Tabela 3	Efeito das variáveis testadas para produção de naftoquinonas por <i>F. solani</i> C1, calculados a partir dos dados apresentados na Tabela1.....	70
Tabela 4	Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para produção de naftoquinonas por <i>F. solani</i> C1.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
'	Minutos
”	Segundos
=	Igual a
>	Maior que
μ	Micro
+	Cruz
° C	Graus Celsius
g	Gramma
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
ε	Absortividade molar média
σ	Erros padrão dos efeitos
λ	Lâmbda
λMax	Lâmbda máxima
mL	Mililitro
ABS	Absorbância
AO	Auramina O
BK	Bacilo de Koch
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BD	Batata – Dextrose
BDA	Batata-Dextrose-Agar
C	Carbono
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
CPCS	Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde
CREPS	Centro de Referência Estadual em Pneumologia Sanitária
COD	Código
CZ	Czapeck
DNAr	Ácido Desoxirribonucleico ribossomal
GFP	Green Fluorescent Protein
ID	Identificação
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ITS	Internal Transcribed Spacer
LJ	Meio de Löwenstein-Jensen
MN	Mineral
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de base
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Rf	Fator de retenção
R\$	Reais
SAB	Sabouraud
TB	Tuberculose
TBp	Tuberculose pulmonar
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
V	Volts
Xg	Unidade de rotação
WHO	World Health Organization
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Tuberculose	16
2.2	Substâncias coloridas	19
2.3	Os avanços na obtenção de substâncias coloridas e/ou fluorescente produzidas por fungos	24
3	OBJETIVOS	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Modelo de Estudo	29
4.2	Fluxo de procedimentos	29
4.3	Detalhes dos procedimentos.....	30
4.3.1	Seleção e identificação de fungos endofíticos	30
4.3.2	Bioprocesso de fungos endofíticos para obtenção de substâncias coloridas.....	32
4.3.3	Esfregaços com cepa <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	33
4.3.4	Testes de coloração sobre o <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e outras espécies de microrganismos.....	33
4.3.5	Leitura microscópica em campo claro e fluorescência	36
4.3.6	Caracterização química da substância fúngica responsável pela fluorescentes	37
4.3.7	Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de substância fúngica responsável pela fluorescência	38
4.4	Análise dos Resultados.....	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Artigo 1 - “Potencial de substâncias coloridas e fluorescentes produzidas por fungos endofíticos amazônicos no diagnóstico baciloscópico da Tuberculose”	42
5.2	Artigo 2 - “Produção de naftoquinonas por <i>Fusarium solani</i> , um endofítico de <i>Copaifera multijuga</i> Hayne”	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	APÊNDICE	86

1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias coloridas¹ (“colored substances”) em atividades de diagnóstico laboratorial vem contribuindo, há muitos anos, com o desenvolvimento de diferentes áreas do conhecimento científico, como a Microbiologia e a Anatomia Patológica. Em ambas, soluções corantes diversas permitem a pesquisa de agentes etiológicos de diferentes doenças. A associação de características morfológicas com a afinidade tintorial, de cada agente microbiano, proporciona uma identificação preliminar de extrema importância em grupos especiais de microrganismos com dificuldades de isolamento. Entre esses grupos se destacam as Micobactérias, que por apresentarem álcool ácido resistência retém em sua parede a carbofucsina, mesmo após descoloração com soluções álcool-ácidas. Essas são conhecidas como bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), entre as quais se destaca o *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da Tuberculose (TB) humana (ZUMLA et al., 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no mundo inteiro a TB ainda é uma importante causa de morbimortalidade (WHO, 2011). O Brasil está entre os 22 países com maior número de casos absolutos de TB, com coeficiente de incidência geral, em 2011, de 36/100.000 hab. (BRASIL, 2012). O Amazonas ocupou em 2011 a primeira posição nacional de incidência da doença, com 62,6/100.000 hab. (BRASIL, 2012).

No Amazonas, assim como em quase todos os programas mundiais de controle da doença, a primeira opção de exame diagnóstico para TB pulmonar (TBp) é a pesquisa de BAAR em esfregaços de secreções bronco-pulmonares (baciloscopia direta). A técnica de coloração mais preconizada, realizada desde 1883, é a de Ziehl-Neelsen (BRASIL, 2008), cuja visualização se dá em microscópio de campo claro (tradicional). Quando corretamente realizada, permite a detecção

¹Colored Substances - termo proposto por Mapari et al. (2010) para abranger todos os pigmentos, corantes e colorantes.

de 70 a 80% dos casos de TBp em uma comunidade (DANIEL, 1990; VIEIRA, et al. 2008; BRASIL, 2008). Entretanto, apesar de mais de um século de uso, a mesma ainda utiliza corantes sintéticos, nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Destaca-se que a solução de carbolfucsina, mistura de fucsina básica e fenol, é aquecida até a emissão de vapores que são então liberados para o meio ambiente. Isoladamente ou em associação, estas duas substâncias são consideradas tóxicas, carcinogênicas, combustíveis, contaminantes da água (MERCK, 2012). Este último item, associado às dificuldades de implantação e efetivação dos Programas de Gerenciamento de Resíduos nas diversas instituições públicas e privadas do país, pode resultar em grave dano ao meio ambiente.

Mediante o potencial de dano ao meio ambiente, desde 1968 os movimentos ecológicos questionam o uso indiscriminado de substâncias coloridas sintéticas e de produtos químicos auxiliares. Estados Unidos, Inglaterra e França criaram leis proibindo o uso de corantes e pigmentos sintéticos em alimentos e cosméticos. Dinamarca, Japão, Estados Unidos e França investiram em substâncias coloridas naturais para uso nas indústrias de alimentos. Foi estabelecido o sistema mundial de qualidade total, no qual está incluído o código ISO-14.000, para classificar produtos e processos de produção ecologicamente corretos (REVILLA, 2004).

Então, o que fazer para conciliar a necessidade de substituir corantes sintéticos nocivos e a boa acurácia de resultados? Mais especificamente, o que poderia ser testado no diagnóstico baciloscópico de Tuberculose – que requer a identificação de um grupo de bactérias com características tintoriais especiais, e que apresenta alta incidência em nosso meio?

Entre os caminhos da ciência tem-se a possibilidade de obter corantes naturais a partir de fungos endofíticos, isso é, aqueles que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes, sem lhes causar danos (PEIXOTO NETO et al., 2002). Estes microrganismos, sejam bactérias ou fungos, têm proporcionado moléculas

bioativas atualmente utilizadas em diversificados produtos comerciais, com um mercado estimado em bilhões de dólares (FERRARA, 2006). Entretanto, pouco ou quase nada tem sido efetivado na obtenção de corantes de uso no diagnóstico de doenças. Assim, pigmentos oriundos de fungos podem significar uma fonte alternativa de corantes naturais. Achados deste gênero favorecem a indústria, pois a produção das substâncias coloridas pode ser realizada em grande quantidade, de forma padronizada e sem causar danos ambientais. A autorização da utilização dos pigmentos produzidos por fungos em países desenvolvidos tem fortalecido projetos de pesquisa com o objetivo de explorar essa diversidade fúngica (MAPARI et al., 2005).

Trabalhos de triagem de fungos endofíticos obtidos de plantas amazônicas, com propriedades bioativas para uso como aceleradores ou inibidores de crescimento de *M. tuberculosis* vêm sendo executados no Laboratório de Micobacteriologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Entre eles têm-se os de Carvalho (2005), Oliveira (2008) e Lima et al. (2011), desenvolvidos com as espécies *Copaifera multijuga*, *Caesalpinia ferrea*, *Himatanthus sucuuba* e *Piper aduncum*. Todas as linhagens fúngicas, estimadas em mais de 200 espécies, encontram-se depositadas no Acervo de Microrganismos da Instituição, e ainda não foram testadas para a produção de pigmentos. Analisar esses fungos implica num gasto menor de pesquisa e na execução racional de um projeto direcionado apenas para as espécies produtoras de pigmentos.

Mediante o cenário exposto, avaliaram-se substâncias coloridas excretadas por fungos endofíticos de espécies vegetais amazônicas, depositados no Acervo de Microrganismos de Interesse Médico do INPA, como corantes alternativos no diagnóstico baciloscópico da Tuberculose.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que acomete principalmente os pulmões (90% dos casos), mas que pode ocorrer em qualquer outro órgão ou ainda, se desenvolver, ao mesmo tempo, em vários órgãos do corpo humano (WHO, 2011).

A TB humana é causada por espécies do gênero *Mycobacterium* sendo as mais comuns o *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*. Todas as espécies do gênero possuem a capacidade de reter um corante como a fucsina, mesmo após a tentativa de descoloração pelo uso de soluções álcool ácidas. Por esse motivo as micobactérias são consideradas Bacilos Álcool ÁcidoResistentes, que na prática clínica e laboratorial são transcritos como BAAR. As espécies responsáveis pela tuberculose humana estão agrupadas e definidas como “Complexo *M. tuberculosis*” (BRASIL, 2008; WHO, 2011). No Brasil, a maioria dos casos tem como agente etiológico o *M. tuberculosis*, conhecido como bacilo de Koch (BK) devido à sua morfologia e o nome do pesquisador que o descreveu (BRASIL, 2001; BRASIL, 2005).

Embora descrita desde a antiguidade, ser diagnosticada há mais de 100 anos e possuir tratamento desde a década de 40, a TB nos dias de hoje ainda é considerada um grave problema de saúde pública (SOARES, 1994; WHO, 2011). Os registros atuais constataam aproximadamente 9,2 milhões de novos casos no mundo. Dados como esses ficam ainda mais preocupantes quando considerado que a TB, doença curável e evitável, em 2011 foi registrada como causa de morte de 1,4 milhões de pessoas (WHO, 2011; ZUMLA et al., 2013).

A TB é transmitida por gotículas de saliva expelidas pela tosse, fala ou espirro de doentes ainda não diagnosticados e tratados (BRIGLIA, 1999; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011; WHO,

2011). Assim, um dos alvos para o controle global da TB é a melhoria do diagnóstico, visando a quebra da cadeia de transmissão, pois os pacientes infectados são submetidos à aplicação imediata de terapêutica específica permitindo interromper rapidamente a cadeia de transmissão. Poucos dias após o início da quimioterapia, os bacilos da TB praticamente perdem seu poder infectante. Por esse motivo doentes multibacilares (baciloscopia positiva) não precisam ser segregados do convívio familiar e comunitário (BRASIL, 2005a; BRASIL, 2011).

Para o diagnóstico da TB são utilizados os dados epidemiológicos, clínicos e os resultados laboratoriais, sendo esses últimos os mais comumente usados na rotina médica. No diagnóstico laboratorial se faz necessário o encontro de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) nas secreções suspeitas e/ou o desenvolvimento do agente etiológico em meios de cultivo. Nesses casos e em relação à Tuberculose pulmonar, forma mais incidente da doença, quando as secreções dos pacientes são multibacilares (acima de 10.000 bacilos/mL de escarro), o diagnóstico é rápido e feito por exame baciloscópico (BRASIL, 2011).

Para os pacientes considerados paucibacilares (número de bacilos inferior a 10.000 bacilos/mL de escarro) deve-se realizar o isolamento do *M. tuberculosis* para a confirmação diagnóstica, o qual necessita de 30 a 60 dias em métodos de cultivos tradicionais e de 20 a 30 dias nos semiautomatizados (BRASIL, 2008). Entretanto, a maior parte dos laboratórios brasileiros atuantes nas ações de controle da Tuberculose não realiza o método de cultivo. A demora ou ausência de realização do método de cultivo faz com que os pacientes desistam de buscar os seus diagnósticos e por isso são denominados por Briglia (1999) de “pacientes evasivos suspeitos”. Assim, tem-se um intervalo bastante longo até o resultado do cultivo, o que leva ao agravamento do quadro clínico, à descrença no atendimento de saúde, à perpetuação e transmissão da tuberculose (RUFFINO-NETTO, 1998).

Buscar procedimentos que possam diminuir o tempo necessário para o diagnóstico da TB paucibacilar e/ou estudos que visem à utilização de métodos clássicos de forma otimizada são sem dúvida prioridades na linha de pesquisa diagnóstica da doença. Essas assumem maior importância quando executadas na geração de novos conhecimentos na baciloscopia, visto que é método prioritário para o diagnóstico e acompanhamento dos casos de TB pulmonar (BRASIL, 2005b).

A baciloscopia refere-se à pesquisa microscópica de BARR em amostras clínicas como o escarro. Apesar dos avanços tecnológicos na micobacteriologia, a baciloscopia, após coloração pelo Ziehl Neelsen descrito em 1883 e seguindo a técnica padronizada de observação ao microscópio de campo claro, continua sendo particularmente importante no combate da tuberculose. Além de ser uma técnica rápida, com baixo custo (em torno de R\$2,50), e de fácil realização, permite diagnosticar de 60% a 80% dos pacientes portadores de TB pulmonar multibacilar (SES, 2002; BRASIL, 2008; BRASIL, 2011).

A baciloscopia também é empregada para acompanhar e avaliar a eficácia do tratamento, permitindo conferir a redução bacilar e negatização do escarro em exames mensais, enquanto o paciente tiver expectoração. No entanto o método é considerado de baixa sensibilidade para pacientes paucibacilares, uma vez que para obter o sucesso estimado necessita de uma quantidade mínima de 5.000 bacilos/mL de escarro (MITCHISON, 2005; BRASIL, 2008), quantidade essa nem sempre existente nas secreções dos pacientes.

Contribuindo para a problemática da referida sensibilidade, dados epidemiológicos do Programa Estadual de Controle à TB mostram que 1/3 das amostras dos pacientes são consideradas paucibacilares. Além disso, a visualização e quantificação dos BAAR variam quando realizados por diferentes profissionais (TOMAN, 2004; VIEIRA et al., 2008;). Contudo,

Steingart et al. (2006) constataram maior sensibilidade diagnóstica na microscopia por fluorescência, após realizarem uma revisão de 45 estudos que avaliavam os resultados de esfregaços corados pelo método convencional (coloração ZN) e baciloscopia utilizando corantes fluorescentes. A microscopia por fluorescência, cujo corante empregado é a Auramina O (AO), é frequentemente aplicada nos países com baixa prevalência e com maior número de amostras clínicas paucibacilares. Na execução da baciloscopia utiliza-se uma lente de menor aumento que a de imersão, portanto, sendo possível avaliar a mesma área da lâmina em menor tempo do que com a técnica de ZN (GITHUI et al., 1993; BA; RIEDER, 1999; BRASIL, 2008).

Por outro lado, coloração em esfregaços utilizando AO necessitam de posterior confirmação da positividade com a recoloração da lâmina pelo ZN ou Kinyoun, devido o corante poder impregnar objetos inorgânicos. Outras desvantagens são apresentadas como o alto custo de investimentos e na manutenção, considerando que para leitura dos esfregaços corados por AO são realizadas em microscópio de fluorescência. (BA; RIEDER, 1999; STEINGART et al., 2006; BRASIL, 2008).

Embora existam vantagens e desvantagens, maior sensibilidade ou não entre os corantes preconizados utilizados para baciloscopia de micobactérias, AO e solução carbolfucsina, ambos são nocivos à saúde humana e ao ambiente, considerados tóxicos e carcinogênicos (MERCK, 2012). Neste sentido, fazem-se necessários novos estudos para avaliar substâncias coloridas e fluorescentes não prejudiciais à saúde/meio ambiente que favoreçam o diagnóstico baciloscópico do *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Substâncias coloridas

A cor, desde os tempos pré-históricos, causa impacto antropológico, psicológico, estético,

funcional e econômico na sociedade (HAO; IQBAL, 1997). Atualmente, esse cenário apenas aumentou em suas proporções, pois substâncias coloridas são amplamente utilizadas em indústrias: têxtil, alimentícia, cosmética, farmacêutica e de utilidades domésticas (HAO; IGBAL, 1997; DUFOSSÉ, 2006; TOMANKOVA et al., 2011; CABRAL et al., 2011).

A utilização de substâncias coloridas data desde antes de Cristo aos dias de hoje, sendo as primeiras isoladas de fontes naturais: derivadas de folhas, raízes, frutos, substâncias minerais (sais de cobalto, ferro, manganês), leguminosas (açafraão, alizarina, anil) ou animal (Cochonilha) e ramos ou flores de várias plantas (GUARATINI, ZANONI, 2000; ARAÚJO, 2005; CHAST, 2005; SCHIOZER; BARATA, 2007). Atualmente o emprego das substâncias coloridas naturais está concentrado em produtos alimentícios, movimentando uma economia de mercado de bilhões de dólares (HAMANO; KILIKIAN, 2006; VOLP et al., 2009; MAPARI et al., 2009; MARARI et al., 2010).

Nas substâncias coloridas extraídas de vegetais e frutos têm-se os problemas da instabilidade de cor, condições climáticas e tempo necessário para coletas, tornando-as inadequadas para a comercialização. Tal conjunto de problemas conduziu ao desenvolvimento de corantes sintéticos com propriedades tecnicamente superiores, de baixo custo e rápida obtenção, independente de clima, ecologia ou mesmo rotas comerciais (VALDUGA et al., 2009). Segundo Chast (2005), o pioneirismo deu-se em 1856, quando William Henry Perkin produziu o primeiro corante sintético, hidrossolúvel e adequado ao tingimento de seda. O autor também relata que nos últimos 100 anos foram produzidos, em escala industrial, cerca de 10.000 compostos corantes, os quais atendem às indústrias, como a de alimentos, cosméticos, têxtil, construção, farmacêutica e de diagnóstico.

Na biologia as substâncias obtidas de origem natural foram e ainda são ferramentas

indispensáveis, com ampla aplicação como agente: antidepressivo, antiviral, antitumoral, antissépticos, antiparasitários, antibacterianos, sendo neste último as sulfonamidas um dos mais referidos (SPEARS, 1988; CHAST, 2005; TOFFOLI, 2006; MEINICKE, 2008).

Em áreas diagnósticas como histologia, citologia e microbiologia as substâncias coloridas vêm contribuindo desde o século XVIII, quando pela primeira vez uma bactéria em forma de cocos foi corada com o corante vermelho carmim, procedimento realizado pelo polonês Karl Weigert(CHAST, 2005). O microbiologista Hans Christian Gram, Berlim 1884, também marcou a história desenvolvendo umas das técnicas mais utilizadas até os dias atuais nos laboratórios de análises clínicas, conhecida como coloração de GRAM. Empregando o cristal de violeta, lugol e fucsina, a técnica permite a separação de dois grandes grupos de bactérias (CHAST, 2005).

De acordo com Guaratini; Zanoni (2000), mais de 90% das substâncias coloridas empregadas são de origem sintética. Outros autores relatam que parte delas apresenta potencial carcinogênico, teratogênico e poluidor (FABRE et al., 1993; GUARATINI; ZANONI, 2000; HAMANO; KILIKIAN, 2006). Esses problemas dependem do modo e tempo de exposição, ingestão oral, sensibilização da pele e/ou sensibilização das vias respiratórias (GUARATI e ZANONI, 2000; MEINICKE, 2008).

Para evitar danos à saúde humana, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA estabelece quais as substâncias coloridas, bem como as normas e padrões de como estas devem ser utilizadas nas diferentes áreas relacionadas com a saúde humana. Tais regulamentações estão descritas em leis e resoluções, sendo em boa parte uma replica das leis internacionais. Mesmo que nessas existam substâncias coloridas permitidas, o fato não anula seus efeitos adversos. Como exemplo, a eritrosina, corante sintético vermelho, é apresentada em artigos científicos como causadora de hipertireoidismo quando consumida em excesso. O vermelho Ponceau pode causar

anemia e doença renal (glomerulonefrite), enquanto o amarelo tartrazina recentemente foi associado como causa de insônia em crianças (CUNHA, 2008). Outras substâncias coloridas e/ou soluções compostas utilizadas em práticas laboratoriais como: giemsa, azul de bromotimol, eosina e azul de metileno, podem causar efeitos prejudiciais à saúde e/ou meio ambiente (BRASIL, 2008; MERCK, 2012). No diagnóstico da TB, como mencionado anteriormente, os corantes fucsina e Auramina O, são considerados tóxicos e carcinogênicos. Entretanto, vale lembrar que o uso de corantes fluorescentes na TB tem sua relevância, visto que pacientes paucibacilares dependem dos mesmos para seus diagnósticos.

Corantes ou substâncias fluorescentes são aquelas que quando sujeitas às radiações ultravioleta, emitem luz visível. Os átomos de substâncias fluorescentes absorvem a radiação ultravioleta, invisível para o olho humano, e logo emitem luz com comprimento de onda mais longo, sendo esse então visível para o humano. Esse fenômeno físico é chamado de fluorescência, podendo ser visualizado nas cores: violeta, azul claro, verde ou vermelho (WHO, 2005).

Substâncias que podem ser ativadas para fluorescência são chamadas fluorocromos (WHO, 2005), sendo que podem estar naturalmente presentes nos materiais biológicos (KENDALL; BADMINTON, 1998; WHO, 2005) ou serem artificialmente introduzidas (CHUDAKOV et al., 2005). A emissão de fluorescência a partir de materiais não tratados é conhecida como primária, natural ou autofluorescência. Quando são artificialmente introduzidas num espécime, a luz emitida é chamada fluorescência secundária (WHO, 2005).

Substâncias fluorescentes vêm sendo alvos de estudos devido ao seu potencial biotecnológico, na forma de biosensores (KUMAGAI et al., 2013). As pesquisas se tornam ainda mais intensas, quando as substâncias fluorescentes são oriundas de fontes naturais, visando sua aplicação na área diagnóstica para eventos fisiológicos (KENDALL; BADMINTON, 1998;

CHUDACOV et al., 2005). Isso porque, substâncias fluorescentes e coloridas utilizadas em diagnósticos, são quase que exclusivamente sintéticas, podendo ser tóxicas à saúde humana e animal (GUARATINI; ZANONI, 2000; HAMANO; KILIKIAN, 2006).

Muitas substâncias sintéticas fluorescentes foram projetadas e aplicadas com êxito em eventos fisiológicos durante os últimos 20 anos. No entanto, são muitas vezes difíceis de impregnar no tecido, não podem ser localizadas em tipos celulares específicos ou em locais subcelulares, e são restringidas a um pequeno número de eventos fisiológicos, químicos e orgânicos (GRIESBECK, 2004).

Entre as substâncias autofluorescentes se destaca a proteína fluorescente verde (GFP), isolada da água viva *Aequorea victoria* (SHIMOMURA, 2008). Essa vem sendo testada como marcador celular e foi expressa com sucesso em *E. coli* (CHALFIE et al., 1994). Atualmente, a GFP e seus homólogos vêm sendo testados na pesquisa biomédica, devido ao fato de que estas proteínas contêm um cromóforo fluorescente em suas cadeias peptídicas, podendo ser expressa em corpos vivos (SHIMOMURA, 2008; KUMAGAI et al., 2013). Portanto, tem-se a possibilidade da GFP tornar-se um sensor ativo de eventos fisiológicos.

Hoje e de acordo com a literatura, sabe-se que substâncias fluorescentes são oriundas de organismos como: corais, águas vivas, insetos, bactérias e fungos (MAYSER et al., 2003; GRIESBECK, 2004; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2006; ALIEVA et al., 2008). Mais recentemente, Kumagai et al. (2013) observaram e caracterizaram uma proteína fluorescente no músculo de enguia japonesa, sendo o primeiro relato de substância fluorescente presente no subfilo dos vertebrados. Com relação ao encontro em fungos, os estudos de Mayser et al. (2003) e Hsu et al. (2011), constataram o encontro de substâncias fluorescentes nos metabólitos secundários dos fungos *Malassezia furfur* e *Monascus*, respectivamente.

Nesse contexto, bioprocessos utilizando fungos são uma alternativa para obtenção de substâncias coloridas e fluorescente de fontes naturais, uma vez que os mesmos podem ser cultivados em laboratórios, de forma padronizada e em grande escala. Além disso, ao contrário das plantas, não são dependentes da sazonalidade e a atividade de coleta quando realizada não é tão agressiva ao meio ambiente.

2.3 Os Avanços na obtenção de substâncias coloridas e/ou fluorescentes por fungos

Fungos são importantes para as atividades humanas, participando da produção de alimentos, produtos farmacêuticos, produtos químicos e na conversão da biomassa na natureza (HAJJAJ et al., 2000), sendo também uma fonte alternativa de corantes naturais. A autorização da utilização dos pigmentos produzidos por fungos em países desenvolvidos tem fortalecido projetos de pesquisa com o objetivo de explorar a diversidade fúngica (MAPARI et al., 2005, QIU et al., 2010).

Entre os microrganismos produtores de pigmentos possíveis de serem utilizados como corantes, deve-se ressaltar os do gênero *Monascus*. Estes fungos são cultivados em arroz, dando origem ao Angka ou também conhecido como arroz vermelho, subproduto da fermentação de *Monascus* spp..Esse processo tem sido uma tradição em países do oeste asiático há mais de 2.000 anos, sendo hoje um corante natural utilizado em vários países para coloração de peixes, queijo, vinho e embutidos (WENT, 1895; HESSELTINE, 1965; H-KITTIKUN et al., 1988; BLANC et al., 1995; PASTRANA et al., 1995; PATTANAGUL, 2002; BAIPONG; PINTHONG, 2003; PINTHONG; PATTANAGUL, 2004; PATTANAGUL et al., 2008). No final da década de noventa estavam catalogados por volta de 600 corantes abrangendo os tons de cores: amarelos (monascina e ankaflavina), laranjas (monascorubrina e rubropunctatina) e vermelhos

(monascorubramina e rubropunctamina), todos extraídos de *Monascus*. Estão registradas mais de 50 patentes de corantes produzidos por fungos do gênero *Monascus* (HAJJAJ et al. 1997).

Outro corante vermelho que tem destaque na literatura é o Arpink Red™, produzido pelo fungo *Penicillium oxalicum* (MAPARI et al., 2005). Outros também de origem fúngica são, Atrovenetin (*Penicillium herquei*), Herqueinone (*Roesleria hypogea*), Purpurogenone (*Penicillium purpurogenum*), utilizados aditivos alimentares (MAPARI et al., 2005). Por outro lado, estudos científicos apresentam outras formas de utilização para essas substâncias coloridas, como: antimicrobianos e agentes controladores – lipidemias, oxidantes, inflamações e arteriosclerose (STROBEL; BRYN, 2003; STROBEL et al., 2004; GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008; VISALAKCHI; MUTHUMARY, 2010).

Dentre as atividades biológicas observadas em pigmentos produzidos por fungos, destaca-se o efeito anticarcinogênico do pigmento laranja com fluorescência amarela, produzido por um fungo do gênero *Monascus*. Esse pigmento pertence ao grupo das azofilonas denominado monapilol, sendo isolado e identificado por Hsu et al. (2011).

Outra descrição de pigmento fluorescente sendo produzido por fungo é relatada no estudo Mayser et al. (2003). Os autores isolaram um composto bisindolyl fluorocromo amarelo-esverdeado produzido pela levedura *Malassezia furfur* (CBS1878). De acordo com os autores, o composto que foi nomeado como pityrialactone pode ser o mesmo fluorocromo observado, sob lâmpada de Wood (366nm), nas lesões de pacientes com pitiríase versicolor.

Nas pesquisas de prospecção de fungos produtores de substâncias coloridas e/ou fluorescentes o pesquisador enfrenta como primeira limitação o delineamento de onde procurar – se no ambiente mineral, plantar e/ou animal. Às vezes esses ambientes se sobrepõem, como é o caso dos fungos endofíticos.

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior dos vegetais superiores aparentemente sem lhes causar doença (PEIXOTO NETO, 2002). Muitas vezes, contribuindo com a sobrevivência dos vegetais ao protegê-los contra o ataque de insetos e promovendo modificação de características fisiológicas das plantas (AZEVEDO et al. 2002; KHARWAR et al., 2011). Na medida em que se constataram as vantagens dos fungos endofíticos aos seus hospedeiros, pesquisas mais complexas começaram a ser desenvolvidas (AZEVEDO et al., 2002).

Nos últimos anos, estudos sobre a potencialidade dos microrganismos endofíticos, principalmente os relacionados à descoberta de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor químico/bioquímico ou indústria farmacêutica (STIERLE et al., 1995; AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003). Assim, hoje em dia os fungos endofíticos são considerados fontes significativas de moléculas bioativas utilizadas para produzir inúmeros produtos comerciais, com um mercado estimado em bilhões de dólares (FERRARA, 2006).

Na vertente da produção de substâncias coloridas por fungos endofíticos os bioprocessos realizados apresentaram-se promissores para obtenção de substâncias coloridas naturais. No estudo de Qiu et al. (2010), os autores isolaram do vegetal *Ginkgo biloba* L o fungo *Penicillium purpurogenum*, microrganismo conhecido pela sua produção de pigmentos vermelhos. Dentre eles, três pigmentos não carotenoides: purpurogenone, mitorobin e mitorubrinol, são compostos utilizados na indústria alimentícia. Outro grupo de pesquisadores, que também trabalhou com isolados de *Ginkgo biloba* L, aperfeiçoou a produção do pigmento laranja (Quercetin glycoside) produzido pelo fungo endofítico denominado Gh01. O quercetin vem sendo explorado por sua ação medicinal e nutricional (LIU et al., 2009). Visalakchi;

Muthumary (2010) além de otimizarem a produção do pigmento produzido pelo fungo endofítico *Monodictys castaneae* SVJM139, realizaram testes biológicos do pigmento contra bactérias patogênicas aos humanos. Os resultados do estudo constataram atividade antimicrobiana superior à estreptomicina - antibiótico comercial. Desta forma, os autores sugerem que “o pigmento *M. castaneae* SVJM139 pode ser desenvolvido como uma droga no futuro”.

Na Amazônia, onde fungos e plantas podem ser considerados como as espécies mais existentes, alguns trabalhos vêm sendo realizados no sentido de buscar nos endofíticos novas substâncias de auxílio na saúde do homem. Especificamente no Laboratório de Micobacteriologia do INPA, pesquisas de bioprospecção de endofíticos nas espécies vegetais *Copaifera multijuga*, *Caesalpinia ferrea*, *Himatanthus sucuuba* e *Piper aduncum* foram desenvolvidas por Carvalho (2005), Oliveira (2008) e Lima et al. (2011). Essas proporcionaram mais de 200 espécies fúngicas que se encontram depositadas no Acervo de Microrganismos da Instituição. Posteriormente e dando seguimento as suas pesquisas, Carvalho (2010) procurou metabólitos de endofíticos de *Copaifera multijuga* Hayne que tivessem ação antibiótica sobre o *M. tuberculosis*. A autora concluiu que a fração B2.1.2.3 do fungo *Aspergillus fumigatus* foi a mais promissora ao objetivo previsto.

Embora existam vários estudos relacionados à produção de importantes metabólitos pelos endofíticos de plantas da Amazônia, não se encontrou nenhum relacionado com os bioprocessos para obtenção de corantes naturais. Pelo exposto, a coleção de endofíticos de interesse médico já existente no INPA, passou a ser o foco da presente pesquisa. Utilizando-se método de triagem, foram avaliados os fungos existentes na referida coleção como produtores de substâncias coloridas e fluorescentes que pudessem vir a ser utilizadas como corantes alternativos no diagnóstico baciloscópio de Tuberculose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos filamentosos, isolados de *Himatanthus sucuuba*, *Copaifera multijuga*, *Piper aduncum* e *Senna reticulata*, em técnica de coloração do *Mycobacterium tuberculosis*, visando o diagnóstico laboratorial da tuberculose.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Realizar Bioprospecção de fungos endofíticos filamentosos produtores de substâncias coloridas com verificação preliminar de ação corante sobre as unidades bacilares do *Mycobacterium tuberculosis* da cepa padrão H37Rv;
- 3.2.2 Analisar a especificidade das substâncias coloridas de origem fúngica frente aos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 36232.
- 3.2.3 Realizar a caracterização química da substância colorida de origem fúngica que apresentar o melhor potencial de uso no diagnóstico baciloscópico da Tuberculose.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo experimental e laboratorial, com o objetivo de verificar substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos filamentosos, isolados de *Himatanthus sukuuba*, *Copaifera multijuga*, *Piper aduncum* e *Senna reticulata*, que possam ser utilizados para corar as unidades bacilares de *Mycobacterium tuberculosis*, visando o diagnóstico baciloscópico da Tuberculose.

4.2 Fluxo de procedimentos

O fluxo das atividades que foram desenvolvidas está apresentado na Figura 1 e será detalhado nas próximas seções.

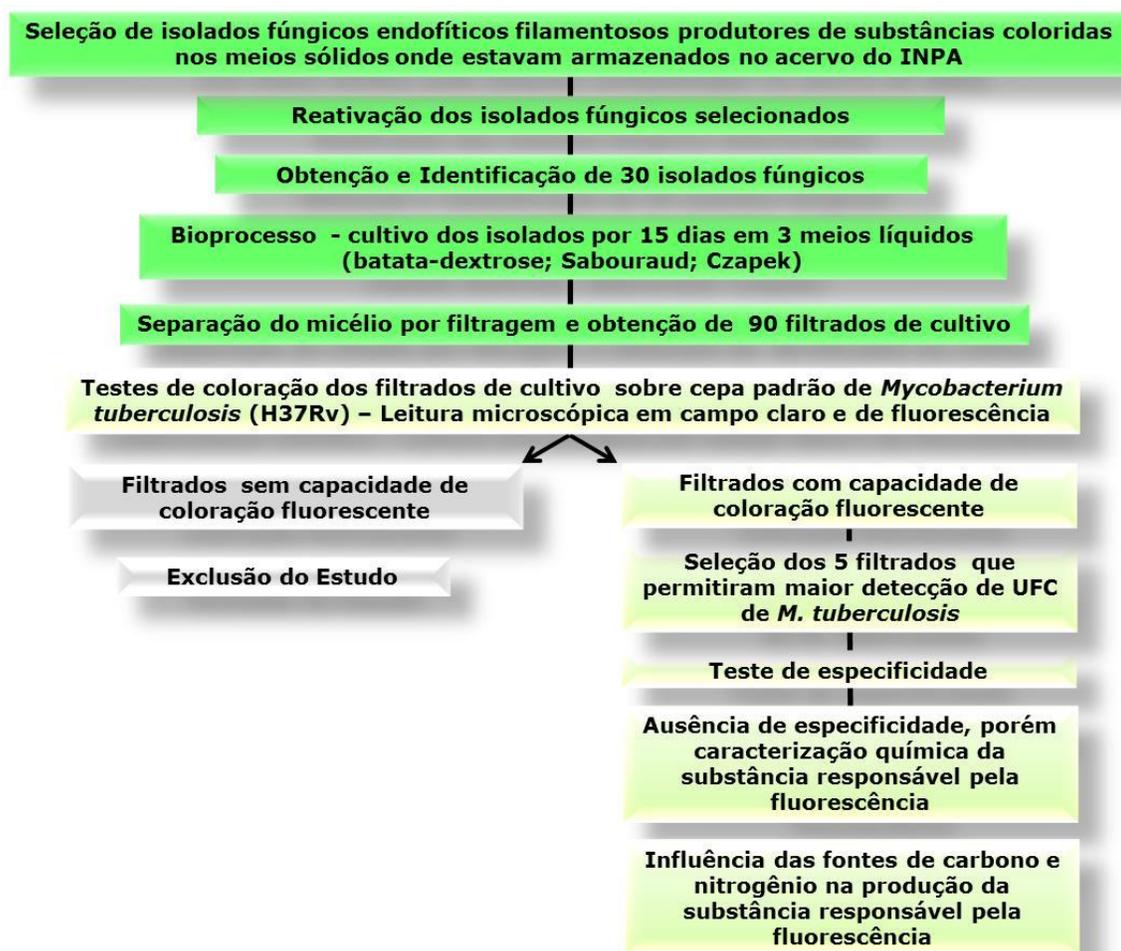


Figura 1. Fluxo de atividades para busca, avaliação e caracterização de substâncias de origem fúngica com aplicação no diagnóstico baciloscópio da Tuberculose.

4.3 Detalhes dos procedimentos

4.3.1 Seleção e identificação de fungos endofíticos

Inicialmente foi realizada uma avaliação visual dos 338 isolados fúngicos endofíticos existentes na coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Selecionaram-se 75 isolados fúngicos que apresentavam produção de substâncias coloridas nos fragmentos de meios de cultivo onde estavam armazenados. Esses

isolados foram repicados em meio de cultivo batata-dextrose-ágar e, após 14 dias, foi realizada uma nova avaliação visual quanto à capacidade de produzir substâncias coloridas. Nesse momento foram observadas as seguintes situações em relação a alguns dos isolados: que eram leveduras; que não mais produziam substâncias coloridas; ausência de crescimento celular; presença de contaminantes e os que produziam substâncias coloridas que não se difundiam no meio de cultivo. Esses foram excluídos e então selecionados para estudo 30 isolados fúngicos filamentosos produtores de substâncias coloridas difusíveis em meio sólido, sendo 17 oriundos de *Himatanthus sucuuba*, 6 de *Copaifera multijuga*, 4 de *Piper aduncum* e 3 de *Senna reticulata*.

Para identificação dos isolados fúngicos em nível de gênero foram realizadas técnicas fenotípicas (avaliação macromorfológica e microcultivo seguido de identificação utilizando chaves taxonômicas). Para tanto, os 30 isolados selecionados que estavam cultivados em placa de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar – BDA por 14 dias à temperatura ambiente foram analisados quanto às características macromorfológica das colônias (cor, textura, aspecto, superfície, pigmento difusível no meio de cultura e velocidade de crescimento). Paralelamente, os isolados também foram submetidos à técnica de microcultivo, conforme descrito por Sidrim; Moreira (1999). A partir do microcultivo foram observadas as estruturas vegetativas e reprodutivas e, de acordo com as chaves taxonômicas, determinado o gênero (BARNETT; HUNTER, 1988). Os fungos cujos filtrados de cultivo coloridos permitiram maior detecção das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Mycobacterium tuberculosis* foram identificados em nível de espécie por técnica Genotípica (extração, amplificação e identificação por sequenciamento do DNA fúngico).

Para genotipagem primeiramente foi realizada a extração de DNA utilizando o kit de extração comercial “Qiagen”, cujos procedimentos foram realizados conforme as orientações do fabricante. Em seguida foram amplificadas as regiões do DNA ITS1 e ITS4 por Reação da cadeia

de polimerase – PCR. Para a PCR dos fungos foi utilizada uma mistura de soluções: 31,2µL água Milli Q, 5,0µL de tampão para PCR, 5,0 µL d´NTPs, 1,0µL Primer ITS 1, 1,0µL Primer ITS 4, 3,0µL MgCl₂, 0,8 µL Taq Polimerase e 3,0µL DNA fúngico, na qual cada reação teve o volume final de 50 µL. As reações foram realizadas em termociclador programado para efetuar uma desnaturação inicial (5 minutos a 94°C), seguido de 30 ciclos, sendo que cada ciclo é composto de uma etapa de desnaturação (30 segundos a 94°C), uma etapa de pareamento (30 segundos a 55°C) e uma etapa de alongamento (30 segundos a 72°C) e por fim uma etapa de extensão final (7 minutos a 72°C) (WAITE et al., 1990). Uma alíquota de 5µL do produto da PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x. O gel foi corado com sybergreen para visualização de um fragmento de aproximadamente 600 pb. Cada produto amplificação foi submetido ao sequenciamento, sendo utilizados aproximadamente 250ng de DNA, 0,4µL de TRR Mix (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), 5 pmoles de primer ITS1 (5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3'), tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂) em um volume final de 10 µL. O sequenciamento foi realizado em sequenciador capilar 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) do INPA. As sequências genômicas fornecidas pelo sequenciador foram analisadas pelo programa BLASTn contra a base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information). Somente foram aceitas as identificações com pelo menos 98% de similaridade.

4.3.2 Bioprocesso de fungos endofíticos para obtenção de substâncias coloridas

Os isolados fúngicos foram cultivados em tubos contendo meio ágar Sabouraud, por cinco dias a 30 °C. Após esse período, foi acrescentado aos tubos 5 mL de água destilada estéril para

obtenção de uma suspensão de esporos. Alíquotas de 200 µL da suspensão de esporos (10^8 células/mL) foram transferidas para Erlenmeyers contendo 30 mL de meio de cultivo líquido (Batata-Dextrose, Sabouraud e Czapek). Os cultivos foram mantidos de forma estática, por 15 dias, a 30 °C. Os filtrados de cultivos foram obtidos após o processo de filtração sequencial em papel filtro qualitativo tipo celulose seguido de filtração em membrana Millipore de 0,22 µm, após esse processo foram armazenados em freezer a -20 °C até utilização.

4.3.3 Esfregaços com cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Foram realizados esfregaços de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cultivado em meio Middlebrook 7H9GC. A partir do cultivo, foi preparada uma suspensão de *M. tuberculosis* em água destilada com diluição de 3×10^{-1} células/mL (equivalente à concentração bacilar de 3+). Em seguida alíquotas de 30 µL dessa suspensão foram depositadas em lâminas, previamente desengorduradas em álcool a 70 %. Todas as lâminas foram fixadas pelo verso, com três passagens rápidas sobre a chama do bico de Bunsen. Foram realizados 150 esfregaços do mesmo inóculo micobacteriano. Os esfregaços foram armazenados em porta lâminas até o procedimento de coloração.

4.3.4 Testes de coloração sobre *M. tuberculosis* H37Rv e em outras espécies de microrganismos

As lâminas com os esfregaços de *M. tuberculosis* H37Rv foram submetidas a dois procedimentos de coloração - convencional e utilizando os filtrados de cultivo.

➤ *Coloração convencional – método Ziehl Neelsen (ZN)*: após posicionamento das lâminas em suporte metálico, a superfície dos esfregaços foi coberta com solução de carbolfucsina de ZN (0,3%), previamente filtrada. O verso das lâminas foi aquecido até emissão de vapor, por chama produzida com o auxílio de um chumaço de algodão hidrofílico embebido em álcool etílico. Marcou-se 5 minutos e ao cessar a emissão de vapor, repetiu-se por mais duas vezes a etapa de aquecimento. Em seguida, com jato d'água de baixa pressão, foi eliminado o excesso do corante. A lâmina foi reposicionada no suporte e a superfície dos esfregaços foi coberta com solução álcool-ácida (3%) por 1 minuto e findo esse período realizado o enxágue das lâminas com jato d'água de baixa pressão. Depois, os esfregaços foram cobertos pela solução de azul de metileno (0,3%) por 30 segundos, e novamente submeteu-se a lâmina a enxágue com jato d'água de baixa pressão. As lâminas foram secas à temperatura ambiente. O método de ZN foi empregado como controle de qualidade da quantidade e integridade dos bacilos presentes nos esfregaços. Os procedimentos do método de coloração acima descritos, bem como os corantes utilizados para execução, estão de acordo com o Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

➤ *Coloração utilizando filtrados de cultivo*: após adequado posicionamento das lâminas baciloscópicas em suporte metálico sobre pia, cada esfregaço foi coberto com 100µL do filtrado de cultivo, por 10 minutos. Após esse período cada lâmina foi lavada com um jato d'água de baixa pressão até que todos os resíduos do filtrado de cultivo tivessem sido removidos. Depois, os esfregaços foram cobertos pela solução de álcool ácido a 1% por 1 minuto, e novamente as lâminas seguiram para enxágue com jato d'água de baixa pressão. As lâminas foram armazenadas em porta lâminas até leitura microscópica.

Foram selecionados cinco filtrados de cultivo que apresentaram substâncias coloridas de cor

intensa. Apenas os filtrados selecionados, durante o procedimento de coloração, receberam uma etapa de aquecimento para verificar a possível contribuição ou não, do aquecimento na ação colorante dos filtrados sobre os bacilos:

→ Após o repouso das lâminas, previamente identificadas, sobre suporte metálico, cada esfregaço foi coberto com 100µL do filtrado de cultivo fúngico. Em seguida utilizando uma chama produzida com o auxílio de um chumaço de algodão hidrofílico, foram realizadas 5 passadas, por volta de 5 a 10 segundos, sob o verso das lâminas. Após esse processo cada lâmina foi lavada com um jato d'água de baixa pressão até que todos os resíduos do filtrado de cultivo tivessem sido removidos.

➤ *Teste de coloração em outras espécies de microrganismos*: os filtrados de cultivo foram submetidos a uma verificação da capacidade de coloração em outros microrganismos. Para tanto, foram realizados esfregaços de *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactéria Gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactéria Gram positiva) e *Candida albicans* ATCC 36232 (fungo levediriforme).

Os esfregaços de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, foram cobertos com 100µL do filtrado de cultivo, por 10 minutos. Após esse período, foram inclusas mais duas etapas, descoloração e contracoloração, isoladas ou combinadas. Sendo essas etapas executadas de 6 formas diferentes, conforme a seguir apresentado:

- 1°. Descoloração por lavagem em água corrente - jato d'água de baixa pressão;
- 2°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto,
- 3°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 2 minutos;
- 4°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto, seguida de suave lavagem com um filete de água corrente, para eliminação do Álcool ácido. Logo, foi feita uma

contracoloração utilizando permanganato de potássio (5 M), por 1 minuto;

5°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto, seguida de suave lavagem com um filete de água corrente, para eliminação do Álcool ácido. Logo, foi feita uma contracoloração utilizando Tinta Nankim Azul (comercial), por 1 minuto;

6°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto, seguida de suave lavagem com um filete de água corrente, para eliminação do álcool ácido. Logo, foi feita uma contracoloração utilizando azul de metileno a 0,3%, por 1 minuto.

Após os procedimentos (2-6) as lâminas foram lavadas com um jato d'água de baixa pressão até que todos os resíduos das soluções utilizadas (álcool ácido; contracorante) tivessem sido removidos. Todas as lâminas secaram a temperatura ambiente.

As etapas de descoloração e contracoloração foram realizadas considerando a possibilidade de coloração dos microrganismos testados pelos filtrados (sensibilidade) utilizando as substâncias coloridas sobre todos os microrganismos testados e a propriedade de álcool ácido resistência das micobactérias. Nesse sentido, por análise microscópica foi possível verificar a afinidade das substâncias coloridas frente a outros microrganismos e a interação e/ou estabilidade dessas substâncias com outras soluções que permitem a diferenciação do *M. tuberculosis*.

4.3.5 Leitura microscópica em campo claro e fluorescência

As leituras dos esfregaços foram realizadas utilizando um microscópio triocular Zeiss Axioskop 40 – HBO 50, em campo claro e em (epi)fluorescência, com objetiva plano-acromática de 100x (imersão) e com três conjuntos de filtros de fluorescência Zeiss, cujas características estão apresentadas a seguir (ZEISS, 2012): FS02: excitação G 365, beam filter FT 395, e emissão

LP 420, FS06: excitação BP 436/10, beam filter FT 460, e emissão LP 470 e FS15: excitação BP 546/12, beam filter FT 580, e emissão LP 590. Os resultados das baciloscopias dos esfregaços de *M. tuberculosis* H37Rv corados de forma convencional e com os filtrados de cultivo, foram expostos de acordo com as orientações do Ministério da Saúde (WHO, 1998), onde:

- 10 a 99 bacilos em 100 campos → positivo 1+
- Média de 1 a 10 bacilos em 50 campos → positivo 2+
- Média superior a 10 bacilos em 20 campos → positivo 3+
- Neste estudo foi considerado resultado negativo para as leituras de 0 a 9 bacilos em 100 campos.

Foi realizada fotodocumentação utilizando câmera digital Canon PowerShot A640, acoplada à saída triocular do microscópio.

4.3.6 Caracterização química da substância fúngica responsável pela fluorescência

Primeiramente o filtrado de cultivo destacado (que permitiu a maior detecção das UFC de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV) foi submetido a cromatografia de camada delgada– CCD preparativa em fase fixa (1.05553 DC- Alufolien Kieselgel 60 / Schichtdicke 0,2 mm), utilizando etanol 100% como eluente visando o isolamento da substância fluorescente. Em seguida a placa cromatográfica foi visualizada com auxílio de lâmpada de luz ultravioleta (366 nm) para observar a eluição da substância fluorescente e calcular o valor do fator de retenção (Rf). Utilizando uma espátula, o achado fluorescente do filtrado de cultivo foi removido e transferido para um tubo de eppendorf com capacidade de 1,5 mL identificado de acordo com o código do filtrado de cultivo de origem. Logo, o material foi resuspenso em 100 µL de água deionizada estéril (cada um desses procedimentos foi realizado 4x, visando obtenção de 400 µL da suspensão do achado

fluorescente). A suspensão foi separada em quatro alíquotas, as quais foram submetidas a diferentes testes, sendo:

1ª alíquota → observada sob lâmpada de luz ultravioleta (366 nm), visando confirmar o isolamento da substância fluorescente em CCD preparativa.

2ª alíquota → realizada uma análise para detecção de proteínas, utilizando o corante coomassie brilhante blue G250 de acordo com a técnica colorimétrica de Bradford (1976).

3ª alíquota → submetida à técnica de precipitação de proteínas por solução saturada de sulfato de amônia (REMIÃO et al., 2003).

4ª alíquota → enviada para o Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, onde foi processada e submetida ao espectrômetro de massas MALDI-TOF AutoFlexII da Bruker, conforme protocolo do fabricante (RP_700-3500) e utilizando método padrão de peptídeo por meio da matrix alfa-ciano.

4.3.7 Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da substância fúngica responsável pela fluorescência

Foram realizados ensaios de cultivo com o objetivo de avaliar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da substância fluorescente pelo fungo destacado. Os ensaios foram realizados utilizando o meio de cultivo Czapeck substituindo-se sua fonte de carbono (sacarose) e de nitrogênio (Nitrato de sódio). As fontes de carbono avaliadas foram glicose, manose, sacarose, xilose e ramnose, todas na concentração de 30 g/L. As fontes de nitrogênio foram: peptona de carne, extrato de levedura, extrato de malte e nitrato de potássio, todas na concentração de 3 g/L. Erlenmeyers (125 mL), cada um contendo o meio de cultivo (50 mL) de acordo com sua fonte de carbono/nitrogênio, receberam o inóculo fúngico (10^8 células/mL) e em

seguida foram mantidos de forma estática, por 14 dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, os cultivos foram filtrados sequencialmente em papel filtro qualitativo tipo celulose, seguido de filtração em membrana Millipore de 0,22 μm . Os filtrados de cultivo foram submetidos à análise para detecção de proteínas pelo método de Bradford (1976) e a teste de coloração de *M. tuberculosis* H37Rv, como descrito no item 4.3.4 (*Coloração utilizando filtrados de cultivo*).

4.4 Análise dos resultados

Foi definida como substância colorida promissora a que corou aos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv em leitura baciloscóptica e que conferiu maior média bacilar por campo.

Os resultados da coloração pelo método de ZN representaram controle de positividade e de integridade dos BAAR para as análises dos filtrados fúngicos em teste.

Na comparação entre as médias bacilares por campo, resultados das leituras de esfregaços corados com os filtrados fúngicos e pelo método de ZN, foi utilizada uma Análise de Variância com 1 Fator (ANOVA One-way). O teste de Bartlett's foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. O nível de significância foi $\alpha=0,05$. Todos os testes utilizados foram bicaudais. Foi realizado o teste de comparação múltipla de Turkey com intervalo de confiança de 95%. Os valores de p foram representados por: *** $p<0,001$; ** $p<0,01$. Todas as análises foram realizadas com o graphPadprism versão 6.

5. RESULTADOS

Substâncias coloridas e fluorescentes foram produzidas por espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Oidiodendron*. Referindo-se as substâncias fluorescentes, esse fato permite inferir que os presentes achados contribuem com a literatura, que atualmente, apresenta poucos estudos sobre substâncias fluorescentes de origem fúngica (MAYSER et al., 2003; HSU et al., 2011).

Dentre as substâncias fúngicas avaliadas no presente estudo, destaca-se a substância colorida de tonalidade vermelha produzida pelo fungo *Fusarium solani* C1, oriundo do vegetal *Copaifera multijuga*. Essa substância passou por todos os testes propostos no presente estudo, visando obtenção de um corante alternativo no diagnóstico da Tuberculose. Constatou-se, que o filtrado de cultivo emitia uma cor laranja fluorescente quando visualizado sob lâmpada ultravioleta e que em teste de coloração conferiu fluorescência aos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. Esses achados tornaram-se ainda mais interessantes em testes de coloração, onde a maior média bacilar por campo foi visualizada em leituras baciloscópicas de esfregaços corados pela substância fúngica, quando comparada com os resultados de esfregaços corados pelo método ZN. Desta forma, constatou-se que a substância fluorescente teve expressiva afinidade pelo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. No entanto, não foram realizados testes que permitissem inferir em qual ou quais locais a substância fúngica interagiu quimicamente com o BARR.

O resultado de leituras baciloscópicas, anteriormente citado, gerou uma expectativa quanto ao potencial da substância fúngica como um corante para micobactérias. Por outro lado, em testes de coloração constatou-se que a substância fúngica também conferiu fluorescência em

outras espécies de microrganismos. Desta forma, pode-se considerar que a substância colorida / fluorescente oriunda de *Fusarium solani* C1 não contribuiu para o diagnóstico baciloscópio da TB por não apresentar especificidade para *Mycobacterium tuberculosis*.

Os detalhes dos testes realizados com a substância colorida em destaque e com outras oriundas dos fungos endofíticos pertencentes ao Acervo de Microrganismos de Interesse Médico, seguem descritos no artigo: “Potencial de substâncias coloridas e fluorescentes produzidas por fungos endofíticos amazônicos no diagnóstico baciloscópio da Tuberculose”.

Um segundo artigo foi elaborado, a partir de um estudo experimental utilizando o fungo endofítico anteriormente destacado *Fusarium solani* C1. O artigo está intitulado em: “Produção de naftoquinonas por *Fusarium solani*, um endofítico de *Copaifera multijuga*” e foi realizado considerando a premissa que a espécie *Fusarium solani* é produtora de pigmentos naftoquinonas metabólito de interesse biotecnológico para indústrias farmacêutica e alimentícia (AMMAR et al. 1979; BAKER et al., 1990; PRADEEP et al., 2013). No estudo foi realizada uma avaliação da influência de variadas fontes e concentrações de carbono, nitrogênio e pH em caldo mineral na produção do pigmento naftoquinona pelo fungo endofítico *Fusarium solani* C1.

Os artigos estão apresentados em sequência e de acordo com a formatação das revistas a que foram submetidos.

ARTIGO 1 – Revista: Dyes and Pigments

Título do Artigo e autores: “Potencial de substâncias coloridas e fluorescentes produzidas por fungos endofíticos amazônicos no diagnóstico baciloscópio da Tuberculose”

Alita Moura de Lima, Ana Cláudia Alves Cortez, João Vicente Braga de Souza, Julia Ignez Salem

Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Resumo

Os Programas Mundiais de Controle da Tuberculose consideram a baciloscopia como a primeira opção para diagnóstico da Tuberculose pulmonar. No entanto, a solução corante de carbolfucsina utilizada na técnica é um composto tóxico, carcinogênico, combustível e contaminante da água. Com o objetivo de verificar o potencial de substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos filamentosos em substituição à carbolfucsina, foram analisados endofíticos oriundos dos vegetais *Himatanthus sucuuba*, *Copaifera multijuga*, *Piper aduncum* e *Senna reticulata*. A partir de 75 isolados, foram selecionados 30 com capacidade de produzir substâncias coloridas difusíveis em meio sólido. Os filtrados do cultivo em caldo foram testados quanto à capacidade de coloração em esfregaços preparados a partir da cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. A análise da coloração foi realizada por microscopia em campo claro e em fluorescência. Constatou-se a existência de capacidade de fluorescência em 78% dos filtrados de cultivo sobre as unidades bacilares de *M. tuberculosis* de características compatíveis com proteínas. Quando os filtrados foram submetidos a testes de especificidade com *E. coli* ATCC 25922; *S. aureus* ATCC 25923 e *C. albicans* ATCC 36232, constatou-se serem inespecíficos para *M. tuberculosis*. Apesar do resultado negativo ao objetivo proposto, tem-se a possibilidade da descoberta de proteínas fluorescentes que possam vir a ser utilizadas como reveladores na monitoração de células, tecidos e na interação entre proteínas.

Palavras chaves: fungos endofíticos; substâncias coloridas; diagnóstico da tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; substâncias fluorescentes.

1. Introdução

A utilização de substâncias coloridas (corantes e pigmentos) em atividades de diagnóstico laboratorial vem contribuindo há muitos anos com o desenvolvimento de diferentes áreas do conhecimento científico, como a Microbiologia e Anatomia Patológica [1]. Em ambas, soluções

corantes diversas permitem a pesquisa de diferentes agentes. A associação de características morfológicas com a afinidade tintorial, de cada agente microbiano, proporciona uma identificação preliminar de extrema importância em grupos especiais de microrganismos com dificuldades de isolamento. Entre esses grupos se destacam as Micobactérias, que por apresentarem álcool ácido resistência retêm em sua parede a carbolfucsina, mesmo após descoloração com soluções álcool-ácidas[2]. Por esse motivo são conhecidas como bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), entre as quais se destaca o *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente etiológico da Tuberculose (TB) humana [2].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no mundo inteiro, a TB ainda é uma importante causa de mortalidade, tendo sido em 2011 responsável por 1,1 milhão de mortes por doenças infecciosas. Informação como essa se torna ainda mais preocupante quando consideradas as 10 milhões de crianças órfãs como resultado da morte dos pais por TB [2]. O Brasil está entre os 22 países com maior número de casos absolutos de TB, com o coeficiente de incidência geral estimado em 2011, decerca de 36 casos novos/100.000 hab. [3]. Para diagnosticar a doença pulmonar, os programas mundiais de controle têm como primeira opção a pesquisa de BAAR, realizada em esfregaços de secreções bronco-pulmonares, com auxílio de microscópio de campo claro. Essa é denominada de baciloscopia e a técnica de coloração mais preconizada, realizada desde 1883, é a de ZiehlNeelsen [4]. Entretanto, as substâncias e corantes empregados na técnica são considerados tóxicos, carcinogênicos, combustíveis e contaminantes da água, causando malefícios à saúde humana e ao meio ambiente [5]. Neste sentido, a busca por novas substâncias coloridas oriundas de fontes naturais poderia contribuir na diminuição de tais danos.

Os fungos endofíticos são uma alternativa para obtenção de substâncias coloridas de fontes naturais [6,7]. Estudos sobre os fungos endofíticos, principalmente os relacionados à descoberta

de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor químico/bioquímico ou indústria farmacêutica e alimentícia. Algumas das moléculas bioativas são atualmente utilizadas para produzir produtos comerciais, com um mercado estimado em bilhões de dólares [6,7,8,9,10,11,12,13,14].

Devido à importância do diagnóstico da TB e a relevância biotecnológica dos fungos verificou-se o potencial de substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos filamentosos, isolados de espécies vegetais amazônicas (*Copaifera multijuga*, *Caesalpinia ferrea*, *Himatanthus sucuuba* e *Piper aduncum*) no diagnóstico baciloscópico de Tuberculose.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos e identificação

Foram avaliados 30 fungos endofíticos produtores de substâncias coloridas pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Os fungos foram identificados por técnica clássica de microcultivo sendo observados os aspectos macro e micromorfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas. Os resultados foram comparados com as chaves taxonômicas e assim determinado o gênero[15]. Para identificação por sequenciamento, o DNA dos microrganismos foi extraído utilizando o kit de extração comercial “Qiagen”, em seguida foram amplificadas as regiões do DNA ribossomal ITS1 e ITS4 por Reação da cadeia de polimerase – PCR. As amostras amplificadas foram processadas para reação de sequenciamento, utilizando-se o sequenciador capilar 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)[16]. As sequências genômicas fornecidas pelo sequenciador

foram analisadas pelo programa BLASTnem relação a base de dados NCBI (National Center for Biotechnology) [17]. Somente foram aceitas as identificações com pelo menos 98% de similaridade.

2.2. Bioprocesso para obtenção de substâncias coloridas

Os isolados fúngicos foram cultivados em tubos contendo meio ágar Sabouraud, por cinco dias a 30°C. Após esse período, foi acrescentado aos tubos 5 mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão de esporos. Uma alíquota de 200 µL da suspensão de esporos (10^8 células/mL) foi transferida para Erlenmeyers contendo 30 mL de meio de cultivo líquido (batata-dextrose, Sabouraud e Czapek). Os cultivos foram mantidos de forma estática, por 15 dias, a 30°C. Os filtrados de cultivo foram obtidos após o processo de filtração sequencial em papel filtro qualitativo tipo celulose, seguido de filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Os filtrados de cultivo foram armazenados em freezer a -20 °C até serem utilizados.

2.3. Preparação de esfregaços com a cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Foram realizados esfregaços de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cultivado em meio Middlebrook 7H9GC. A partir do cultivo, foi preparada uma suspensão de *M. tuberculosis* em água destilada com diluição de 3×10^{-1} células/mL (equivalente à concentração bacilar de 3+). Em seguida alíquotas de 30 µL da suspensão foram depositadas em lâminas, previamente desengorduradas em álcool a 70 %. Todas as lâminas foram fixadas pelo verso, com três passagens rápidas pela chama do bico de Bunsen. Os esfregaços foram armazenados em porta lâminas até o procedimento de teste.

2.4. Coloração

Coloração de M. tuberculosis H37Rv utilizando os filtrados de cultivo fúngicos: após adequado posicionamento dos esfregaços em suporte metálico sobre pia, os mesmos foram cobertos com 100 µL do filtrado de cultivo. Após 10 minutos, realizou-se a retirada com um jato d'água de baixa pressão, até que todos os resíduos do filtrado de cultivo tivessem sido removidos. Os esfregaços foram então cobertos por solução de álcool ácido 1% por 1 minuto, e nova lavagem com jato d'água de baixa pressão foi executada. Após secagem em temperatura ambiente, realizou-se a leitura microscópica.

Técnica de Ziehl Neelsen (ZN): foi efetuada como controle de qualidade da quantidade e integridade das micobactérias presentes nos esfregaços e executada conforme determinação mundial [18].

2.5. Microscopia

As leituras dos esfregaços foram realizadas utilizando um microscópio triocular Zeiss Axioskop 40 – HBO 50, em campo claro e em (epi) fluorescência, com objetiva plano-acromática de 100x (imersão) e com três conjuntos de filtros de fluorescência com as seguintes características: FS02: excitação G 365, *beam filter* FT 395, e emissão LP 420, FS06: excitação BP 436/10, *beam filter* FT 460, e emissão LP 470, e FS15: excitação BP 546/12, *beam filter* FT 580, e emissão LP 590 [19]. Os resultados das leituras dos esfregaços de *M. tuberculosis* H37Rv, corados de forma convencional e com os filtrados de cultivo, foram descritos de acordo com as orientações da Organização Mundial de Saúde [18].

2.6. Teste de coloração em outras espécies de microrganismos

Os filtrados de cultivo selecionados foram submetidos a verificação de especificidade com outros microrganismos. Para tanto, foram realizados esfregaços de *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactéria Gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactéria Gram positiva) e *Candida albicans* ATCC 36232 (levedura).

Os esfregaços de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* foram cobertos com 100µL do filtrado de cultivo, por 10 minutos. Após esse período, foram incluídas mais duas etapas, descoloração e contracoloração, isoladas ou combinadas. Sendo essas etapas executadas de 6 formas diferentes, conforme a seguir apresentado: 1°. Descoloração por lavagem em água corrente - jato d'água de baixa pressão; 2°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto; 3°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 2 minutos; 4°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto, seguida de suave lavagem com um jato d'água de baixa pressão, para eliminação do álcool ácido. Depois, foi realizada uma contracoloração utilizando permanganato de potássio (5M), por 1 minuto; 5°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto, seguida de suave lavagem com um jato d'água de baixa pressão, para eliminação do álcool ácido. Depois, foi feita uma contracoloração utilizando Tinta Nankim Azul (comercial), por 1 minuto; 6°. Descoloração com solução álcool ácida a 1% por 1 minuto, seguida de suave lavagem com um jato d'água de baixa pressão, para eliminação do álcool ácido. Depois, foi feita uma contracoloração utilizando azul de metileno a 0,3%, por 1 minuto.

Após os procedimentos (2-6) as lâminas foram lavadas com um jato d'água de baixa pressão até que todos os resíduos das soluções utilizadas (álcool ácido; contracorante) tivessem sido removidos. Todas as lâminas secaram a temperatura ambiente.

2.7. Caracterização química da substância fluorescente

O filtrado de cultivo destacado (que permitiu a maior detecção das UFC de *Mycobacterium tuberculosis*H37RV) foi submetido a uma cromatografia de camada delgada-CCD preparativa em fase fixa (1.05553 DC- Alufolien Kieselgel 60 / Schichtdicke 0,2 mm) visando à separação da substância fluorescente. Em seguida a placa cromatográfica foi visualizada com auxílio de uma lâmpada de luz ultravioleta (366 nm) para observar a eluição da substância fluorescente e calcular o valor do fator de retenção (Rf). Utilizando uma espátula, o achado fluorescente foi removido e transferido para um tubo de eppendorf com capacidade de 1,5 mL, identificado de acordo com o código do filtrado de cultivo de origem. O material foi resuspendido em água deionizada estéril. Dessa suspensão foram separadas quatro alíquotas, sendo: A alíquota 1 utilizada para corar o bacilo de *M. tuberculosis* e confirmar o isolamento da substância fluorescente. Da alíquota 2 foi realizada uma análise para detecção de proteínas, utilizando o corante coomassie brilhante blue G250 conforme método de Bradford [20]. A alíquota 3 foi submetida à técnica de precipitação de proteína por solução saturada de sulfato de amônia [21]. Alíquota 4, processada e submetida ao espectrômetro de massas Mald-tof AutoflexII da Bruker, conforme protocolo do fabricante (RP_700-3500) e utilizando método padrão de peptídeo por meio da matrix alfa-ciano.

2.8. Influência das fontes de carbono e nitrogênio

Foram realizados ensaios de cultivo com o objetivo de avaliar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da substância fluorescente pelo fungo destacado. Os ensaios foram realizados utilizando o meio de cultivo Czapeck substituindo-se sua fonte de carbono

(sacarose) e de nitrogênio (Nitrato de sódio). As fontes de carbono avaliadas foram glicose, manose, lactose, xilose e ramnose, todas na concentração de 30 g/L. As fontes de nitrogênio foram: peptona de carne, extrato de levedura, extrato de malte e nitrato de potássio, todas na concentração de 3 g/L. Erlenmeyers (125 mL), cada um contendo o meio de cultivo (50 mL) de acordo com sua fonte de carbono/nitrogênio, receberam o inóculo fúngico (10^8 células/mL) e em seguida foram mantidos de forma estática, por 14 dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, os cultivos foram filtrados sequencialmente em papel filtro qualitativo tipo celulose, seguido de filtração em membrana Millipore de 0,22 μ m. Os filtrados de cultivo foram submetidos a análise para detecção de proteínas pelo método de Bradford (1976)[20] e a teste de coloração em esfregaços de *M. tuberculosis* H37Rv, como descrito no item 2.4.

2.9. Análise dos resultados

Foi definida como substância colorida promissora a que corou os isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e que conferiu maior média bacilar por campo, em leitura baciloscópica.

Os resultados da coloração pelo método de ZN representaram a base para as análises das substâncias coloridas em teste.

Na comparação entre as médias bacilar por campo, leituras de esfregaços corados com as substâncias coloridas em teste e pelo método ZN, foi utilizada uma Análise de Variância com 1 Fator (ANOVA One-way). O teste de Bartlett's foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. O nível de significância foi $\alpha=0,05$. Todos os testes utilizados foram bicaudais. Foi realizado o teste de comparação múltipla de Turkey com intervalo de confiança de 95%. Os

valores de p foram representados por: ***p<0,001; **p<0,01. Todas as análises foram realizadas com o graphPadprism versão 6.

3. Resultados

3.1. Identificação de fungos endofíticos

De 30 fungos endofíticos produtores de pigmentos, 17 foram oriundos de *Himatanthus sucuuba*, 6 de *Copaifera multijuga*, 4 de *Piper aduncum* e 3 de *Senna reticulata*. Todos pertencem ao Filo Ascomycota, sendo dos gêneros; *Fusarium* (9), *Aspergillus* (7), *Paecilomyces* (4), *Penicillium* (4), *Trichoderma* (1) e *Oidiodendron* (1). Seus códigos de identificação, a planta e parte vegetal de origem e a identificação fúngica, encontram-se apresentados na Tab. 1.

Tab. 1. Código identificador dos fungos endofíticos produtores de substâncias coloridas conforme a planta e parte vegetal de onde foram isolados e identificação fúngica.

COD. ID	ISOLAMENTO		IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA
	PLANTA	PARTE VEGETAL	
C1	<i>Copaifera multijuga</i>	Caule	<i>Fusarium solani</i>
C2	<i>Copaifera multijuga</i>	Folha	<i>Fusarium</i> sp.
C9	<i>Copaifera multijuga</i>	Folha	<i>Fusarium</i> sp.
C10	<i>Copaifera multijuga</i>	Galho	<i>Fusarium</i> sp.
C11	<i>Copaifera multijuga</i>	Galho	<i>Paecilomyces</i> sp.
C12	<i>Copaifera multijuga</i>	Galho	<i>Penicillium</i> sp.
15P	<i>Piper aduncum</i>	Folha	<i>Aspergillus</i> sp.
16P	<i>Piper aduncum</i>	Folha	<i>Penicillium</i> sp.
P11	<i>Piper aduncum</i>	Caule	<i>Fusarium</i> sp.
P16	<i>Piper aduncum</i>	Folha	<i>Fusarium</i> sp.
S09	<i>Senna reticulata</i>	Folha	<i>Aspergillus</i> sp.
S15	<i>Senna reticulata</i>	Folha	<i>Penicillium</i> sp.
S30	<i>Senna reticulata</i>	Folha	<i>Penicillium</i> sp.
3H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Folha	NI

5H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Caule	NI
7H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	NI
8H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Folha	NI
17H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	<i>Trichoderma</i> sp.
H18	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	<i>Aspergillus</i> sp.
H22	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Caule	<i>Paecilomyces</i> sp.
H22b	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Caule	<i>Aspergillus</i> sp.
H24	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	<i>Oidiodendron</i> sp.
H30	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Folha	<i>Fusarium</i> sp.
H36	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Caule	<i>Paecilomyces</i> sp.
H37	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	<i>Aspergillus</i> sp.
H54	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Folha	<i>Fusarium</i> sp.
H59	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	<i>Paecilomyces saturatus</i>
H63	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Folha	<i>Aspergillus fumigatus</i>
H64	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Galho	<i>Aspergillus</i> sp.
H64B	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Folha	<i>Fusarium solani</i>

NI= Não identificado; Cod.Id.= Código de identificação

3.2. Substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos

Após o cultivo dos isolados em diferentes caldos, obtiveram-se 90 filtrados de cultivo pigmentados, sendo 4 considerados perdidos (*Aspergillus* sp. H18 – cultivo em BD; SAB; CZ e *Penicillium* sp. C12 – cultivado em BD) devido a contaminação em meio de cultivo. A cor amarela foi predominante em 84% dos filtrados de cultivo, seguida pela cor marrom (8%) e vermelha (7%). O filtrado de cultivo C11 (quando cultivado em batata-dextrose) apresentou pigmentação verde, distinta dos demais isolados Tab. 2. Na Fig. 1 está apresentado o tom das cores das substâncias coloridas.

A partir de leituras realizadas através de espectrofotometria de varredura, foram obtidos os valores em absorbância máxima dos filtrados de cultivo conforme apresentado na Tab. 2.

Tab. 2. Cor das substâncias coloridas produzidas por fungos endofíticos e o comprimento de onda, conforme os meios de cultivos utilizados

ISOLADO	Batata-dextrose (BD)	λ_{\max} nm	Sabouraud (SAB)	λ_{\max} nm	Czapek (CZ)	λ_{\max} nm
<i>Fusarium solani</i> C1	Vermelho	518	Amarelo	341	Amarelo	341
<i>Fusarium</i> sp. C2	Amarelo	342	Amarelo	341	Amarelo	341
<i>Fusarium</i> sp. C9	Amarelo	341	Amarelo	342	Amarelo	341
<i>Fusarium</i> sp. C10	Amarelo	342	Amarelo	342	Amarelo	341
<i>Paecilomyces</i> sp. C11	Verde	536	Amarelo	341	Amarelo	342
<i>Penicillium</i> sp. C12	--		Amarelo	342	Amarelo	342
<i>Aspergillus</i> sp.15P	Amarelo	343	Amarelo	347	Marrom	351
<i>Penicillium</i> sp.16P	Amarelo	342	Amarelo	341	Amarelo	342
<i>Fusarium</i> sp. P11	Amarelo	341	Amarelo	342	Amarelo	342
<i>Fusarium</i> sp. P16	Amarelo	341	Amarelo	342	Amarelo	342
<i>Aspergillus</i> sp.S09	Amarelo	342	Amarelo	297	Amarelo	343
<i>Penicillium</i> sp.S15	Amarelo	261	Amarelo	272	Amarelo	536
<i>Penicillium</i> sp.S30	Amarelo	341	Amarelo	341	Amarelo	341
3H-não identificado	Amarelo	343	Marrom	341	Amarelo	341
5H-não identificado	Amarelo	343	Marrom	342	Marrom	342
7H-não identificado	Amarelo	344	Amarelo	341	Amarelo	342
8H-não identificado	Amarelo	235	Amarelo	341	Vermelho	344
<i>Trichoderma</i> sp. 17H	Amarelo	342	Amarelo	342	Amarelo	342
<i>Aspergillus</i> sp.H18	--		--		--	
<i>Paecilomyces</i> sp. H22	Amarelo	445	Amarelo	444	Amarelo	343
<i>Aspergillus</i> sp.H22b	Amarelo	274	Amarelo	347	Vermelho	226
<i>Oidiodendron</i> sp.H24	Marrom	353	Amarelo	343	Amarelo	343
<i>Fusarium</i> sp. H30	Amarelo	341	Amarelo	344	Vermelho	328
<i>Paecilomyces</i> sp. H36	Amarelo	341	Amarelo	300	Amarelo	343
<i>Aspergillus</i> sp.H37	Amarelo	342	Amarelo	444	Vermelho	354
<i>Fusarium</i> sp. H54	Amarelo	342	Amarelo	343	Vermelho	344
<i>Paecilomyces saturatus</i> H59	Amarelo	341	Amarelo	444	Marrom	341
<i>Aspergillus fumigatus</i> H63	Amarelo	341	Amarelo	344	Marrom	344
<i>Aspergillus</i> sp.H64	Amarelo	--	Amarelo	--	Amarelo	--
<i>Fusarium solani</i> H64B	Amarelo	279	Amarelo	365	Amarelo	341

(--)= Leitura no espectrofotômetro não realizada.

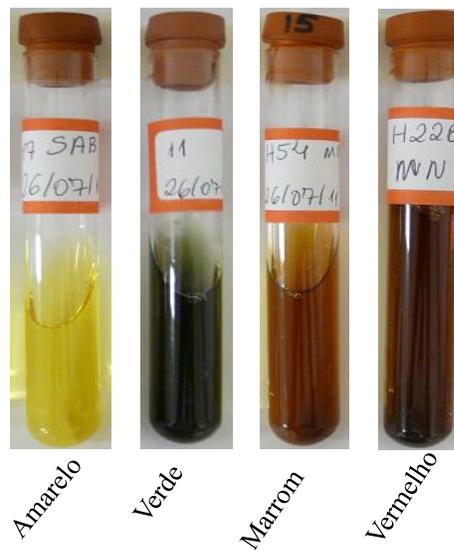


Fig. 1. Filtrados de cultivo, da esquerda para direita, *Trichoderma* sp.17H cultivado em meio Sabouraud; *Paecilomyces* C11 cultivado em meio batata+dextrose; *Fusarium* H54 cultivado em caldo Czapek e *Aspergillus* H22B cultivado em caldo Czapek

3.3. Coloração dos esfregaços de *M. tuberculosis* H37Rv

Na avaliação da capacidade de coloração dos filtrados de cultivo sobre a cepa *M. tuberculosis* H37Rv, realizadas por leituras baciloscópicas, nenhum dos filtrados de cultivo possibilitou a visualização em campo claro de BAAR. Em contrapartida, 28 isolados produziram substâncias que conferiram fluorescência ao *M. tuberculosis*H37Rv, quando observados em fluorescência sob os Filtros FS02-420 λ /nm, FS06-470 λ /nm e FS15-590 λ /nm Tab. 3.

Os resultados obtidos nas leituras baciloscópicas conforme classificação da Organização Mundial de Saúde – OMS [17]estão apresentados na Tab.3.

Tab. 3. Resultados baciloscópicos de esfregaços concentração 3+ de *M. tuberculosis* H37Rv, corados com os filtrados de cultivo de fungos endofíticos, conforme os meios de cultivo utilizados e tipo de leitura (campo claro e fluorescência)

ISOLADO	BATATA-DEXTROSE (BD)				SABOURAUD (SAB)				CALDO CZAPEK (CZ)			
	Visível	Fluorescência			Visível	Fluorescência			Visível	Fluorescência		
	CC	FS02	FS06	FS15	CC	FS02	FS06	FS15	CC	FS02	FS06	FS15
<i>Fusariumsolani</i> C1	neg	2+	3+	2+	neg	Neg	neg	2+	neg	1+	2+	2+
<i>Fusarium</i> sp. C2	neg	neg	2+	neg	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	1+	neg
<i>Fusarium</i> sp. C9	neg	1+	2+	1+	neg	1+	2+	1+	neg	neg	2+	neg
<i>Fusarium</i> sp. C10	neg	neg	2+	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Paecilomyces</i> sp. C11	neg	1+	2+	neg	neg	Neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Penicillium</i> sp. C12	--	--	--	--	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp.15P	neg	neg	2+	neg	neg	Neg	3+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Penicillium</i> sp.16P	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	1+	neg
<i>Fusarium</i> sp. P11	neg	neg	2+	neg	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Fusarium</i> sp. P16	neg	neg	neg	neg	neg	1+	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp.S09	neg	1+	2+	1+	neg	Neg	2+	1+	neg	neg	2+	neg
<i>Penicillium</i> sp.S15	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Penicillium</i> sp.S30	neg	2+	2+	1+	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
3H-não identificado	neg	1+	2+	1+	neg	Neg	2+	1+	neg	neg	2+	1+
5H-não identificado	neg	neg	1+	neg	neg	Neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg
7H-não identificado	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8H-não identificado	neg	neg	1+	neg	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	2+	2+
<i>Trichoderma</i> sp. 17H	neg	1+	2+	neg	neg	1+	1+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp.H18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Paecilomyces</i> sp. H22	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	1+	neg
<i>Aspergillus</i> sp.H22b	neg	neg	1+	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	1+	neg
<i>Oidiodendron</i> sp.H24	neg	neg	2+	neg	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Fusarium</i> sp. H30	--	--	--	--	neg	1+	2+	2+	neg	neg	2+	2+
<i>Paecilomyces</i> sp. H36	neg	1+	2+	1+	neg	Neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp.H37	neg	neg	1+	neg	neg	1+	2+	1+	neg	neg	neg	neg
<i>Fusarium</i> sp. H54	--	--	--	--	--	--	--	--	neg	neg	1+	neg
<i>Paecilomyces saturatus</i> H59	neg	1+	3+	1+	neg	Neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Aspergillus fumigatus</i> H63	neg	neg	neg	neg	neg	1+	3+	2+	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp. H64	neg	neg	neg	neg	neg	Neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Fusarium solani</i> H64B	neg	neg	2+	neg	neg	Neg	3+	neg	--	--	--	--

CC = campo claro – leitura tradicional

FS02; FS06; FS15 = Filtros para leitura em fluorescência

neg = negativo (nenhum bacilo encontrado na lâmina)

(--) = leitura baciloscóptica não realizada

Controle Negativo = esfregaço de cepa clínica – *M. tuberculosis* H37Rv lavado em água corrente.

Controle positivo = esfregaço de cepa clínica – *M. tuberculosis* H37Rv corado pelo método Ziehl Neelsen - baciloscopia positiva 3+.

De acordo com os dados da Tab. 3 e considerando o resultado de baciloscopia 3+ das lâminas de controle positivo, podemos inferir filtrados de cultivos de *Fusariumsolani* C1 (BD);

Aspergillus 15P (SAB); *Paecilomyces saturatus* H59 (BD); *Aspergillus fumigatus* H63 (SAB) e *Fusarium solani* H64B (SAB), como promissores para coloração de *M. tuberculosis* por permitir leitura baciloscópica positiva igual ao controle.

Constatou-se que os resultados das leituras baciloscópicas de 2+ e 3+ foram mais frequentes (25%) em colorações realizadas com os filtrados fúngicos cultivados em caldo Sabouraud Tab. 3.

Dos filtros utilizados nas leituras em fluorescência, o filtro FS06-470 λ /nm (verde) permitiu a melhor visualização e maior quantificação dos bacilos Tab. 3. Na Fig. 2 está a ilustração das UFC de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, coradas pelo filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1 (BD), observadas em microscopia de luz ultravioleta fluorescência (filtro FS06).



Fig. 2. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cultivado em meio líquido middlebrock, corados pelo filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1 e observado em microscópio de fluorescência – Filtro FS06, aumento 100x
Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/CSAS/INPA

Os cinco filtrados de cultivo que permitiram esfregaços 3+ (*Fusarium solani* C1 - BD; *Aspergillus* 15P - SAB; *Paecilomyces saturatus* H59 - BD; *Aspergillus fumigatus* H63 - SAB e *Fusarium solani* H64B - SAB) foram selecionados para uma análise quantitativa do potencial de

coloração sobre o *M. tuberculosis* H37Rv. Na Fig. 3 estão expostas as leituras baciloscópicas, realizadas em quintuplicadas, do controle positivo corado pelo método de Ziehl Neelsen e das lâminas coradas pelos filtrados de cultivo selecionados.

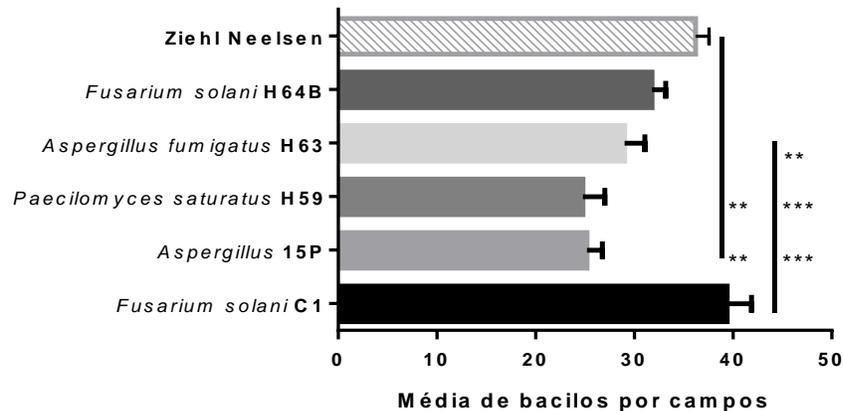


Fig. 3. Comparação entre as Médias de bacilos por campo, contagem após coloração pelos filtrados de cultivo e método de Ziehl Neelsen. Os dados foram representados com média \pm erro padrão. As análises estatísticas estão representadas por asteriscos, indicando que são estatisticamente significativas

Na análise dos resultados das leituras baciloscópicas, esfregaços corados pelo método de ZN e pelos filtrados de cultivo selecionados, o filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1 (BD) foi estatisticamente significativo quando comparado com os filtrados: *Aspergillus* P15 ($p=0,0003$); *Paecilomyces saturatus* H59 ($p=0,0002$) e *Aspergillus fumigatus* H63 ($p=0,0082$). O Ziehl Neelsen quando comparado com o *Aspergillus* 15P e o *Paecilomyces saturatus* H59, apresentou respectivamente, $p < 0,0048$ e $p < 0,0033$, respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as leituras baciloscópicas de esfregaços corados pelo método de ZN, filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1 (BD) e *Fusarium solani* H64B (SAB).

Os filtrados *Aspergillus fumigatus* H63 (SAB) e *Fusarium solani* H64B (SAB) permitiram a leitura média de 29 e 32 bacilos/campo, respectivamente. Os filtrados de cultivo *Aspergillus* P15 (SAB) e *Paecilomyces saturatus* H59 (BD) apresentaram os menores valores das leituras de esfregaços, média de 25 bacilos/campo.

3.4. Teste de coloração em outras espécies de microrganismos

No teste de coloração utilizando apenas os filtrados de cultivo selecionados (responsáveis pela leitura bacilosópica 3+) sobre os esfregaços de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 36232, ainda que com pouco brilho (*E. coli* e *S. aureus*), foi possível visualizar por microscopia de fluorescência as UFC dos microrganismos testados Fig. 4.

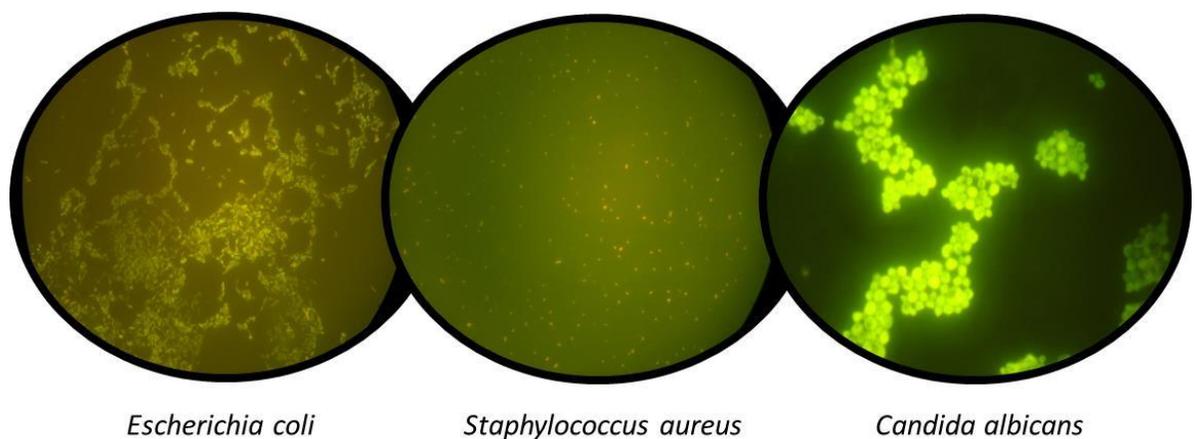


Fig.4. *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923e *Candida albicans* ATCC 36232 corados pelo filtrado de cultivo *Aspergillus* P15, observados em microscópio de fluorescência – Filtro FS06, aumento 100x

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/CSAS/INPA.

3.5. Caracterização química da substância fluorescente

A separação da substância fluorescente do filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1, em CCD, apresentou Rf 0,75. Essa substância conferiu coloração ao *M. tuberculosis* H37Rv, confirmando o isolamento de seu respectivo filtrado de cultivo. Em teste para detecção de proteínas (Método de Bradford), foi observada a reação do corante comassie blue G-250 com as cadeias laterais básicas ou aromáticas da substância fluorescente. Na análise em espectrômetro de massa, foram constatados 5 picos majoritários, sendo o pico predominante de 2465,125 g/mol. A compilação dessas informações sugere que a substância fluorescente seja peptídeo/proteína.

3.6. Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de substâncias fluorescentes

A Tab. 4 apresenta a avaliação da influência das fontes de carbono e nitrogênio na concentração de proteínas e na capacidade de coloração ao *M. tuberculosis* H37Rv do filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1. As fontes de carbono que se destacaram nesse ensaio foram a Ramnose e a Manose, enquanto que, a fonte nitrogênio que se destacou foi a peptona. Como esperado, foi observada correlação positiva ($R^2 = 0,81$) entre a concentração de proteínas extracelulares produzidas por *Fusarium solani* C1 e a capacidade do filtrado de cultivo *Fusarium solani* C1 em corar unidades bacilares de *M. tuberculosis* H37Rv.

Tab. 4. Influência das fontes de carbono e nitrogênio na concentração de proteínas e na capacidade de coloração de *M. tuberculosis* H37Rv do filtrado de cultivo de *Fusarium solani* C1.

Fontes de carbono	Proteína extracelular (mg/L)	Bacilos por campo	Fontes de nitrogênio	Proteína extracelular (mg/L)	Bacilos por campo
Glicose	222±5	36 ±9	KNO ₃	158±3	26± 1
Ramnose	283±4	56 ±7	NaNO ₃	195±4	21 ±2
Sacarose	124±3	20 ±9	Malte	155±5	14 ±2
Manose	270±4	52 ±3	Ext. Lev.	170±4	26 ±1
Xilose	224±5	37 ±6	Peptona	207±3	44 ±4

4. Discussão

A identificação dos fungos endofíticos corroborou com a literatura em nível de gênero, pois alguns desses fungos como *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, já foram citados em outros estudos apresentando capacidade de produzir substâncias coloridas e são considerados como potenciais produtores de corantes devido sua capacidade na produção de uma variedade de cores e alta estabilidade química [7,22,23,24,25,26].

Os fungos endofíticos produziram substâncias coloridas, *Fusarium* sp. (Amarelo), *Aspergillus* sp. (amarelo; Marrom; vermelho), *Paecilomyces* sp. (Amarelo; Verde), *Penicillium* sp. (Amarelo), *Trichoderma* sp. (Amarelo) e *Oidiodendron* sp. (Amarelo; Marrom). Na literatura, substâncias coloridas produzidas por fungos com coloração amarela já foram classificados como ankaflavina e monascina, e com cor vermelha como rubropunctamina e monascorrubramina [27,28]. De acordo com Mapari [24] e Pastre [29] a maior parte dessas substâncias coloridas faz parte de dois grupos químicos: carotenoides e policetídeos, nesse último estão as quinonas (antraquinonas, hidroxiantraquinonas e naftoquinonas), flavonoides, melaninas e azafilonas [22,24].

Fungos do mesmo gênero que os estudados na presente pesquisa, porém produzindo substâncias coloridas distintas, são frequentemente citados na literatura como microrganismo de interesse biotecnológico. O fungo endofítico *Penicillium purpurogenum* produziu uma substância colorida, vermelho intenso, com potencial para indústria alimentícia [6]. A espécie *Fusarium verticillioides* foi citada por Boonyapranai [30], produzindo uma substância colorida lilás, naftoquinona, composto orgânico explorado por sua atividade antimicrobiana. Outras espécies de *Fusarium* já foram citadas pela produção de fusarisetina A e de azafilona fusarona [31]. Espécies do gênero *Trichoderma* são habitantes do solo e são capazes de produzir substâncias

coloridas de diversas tonalidades, que podem variar de amarela-esverdeada a vermelha, cujo interesse biotecnológico esta na capacidade antifúngica desse metabolito [26].

As substâncias fluorescentes presente em 79% dos filtrados de cultivo conferiram coloração fluorescente ao *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Conclui-se que os fungos endofíticos avaliados no presente estudo são produtores de substâncias fluorescentes com afinidade às micobactérias. Possivelmente, essas substâncias estão interagindo quimicamente nos ácidos micólicos ou mesmo esse seja um dos alvos de ligação, considerando que, de acordo com Laifangbam [32] os ácidos micólicos é o componente da célula bacteriana onde se liga a Auramina O, corante fluorescente padrão utilizado no diagnóstico da Tuberculose.

Relatos de substâncias fluorescentes produzidos por fungos já foram citados na literatura, Mayser [33] isolou um composto bisindolyl fluorocromo amarelo-esverdeado produzido pela levedura *Malassezia furfur* (CBS1878). No estudo de Hsu [34] os autores obtiveram um corante amarelo fluorescente, pertencente ao grupo das azofilonas denominado monapilol, sendo esse produzido por um fungo do gênero *Monascus*.

Na leitura microscópica em fluorescência, constatou-se que as unidades celulares de *E. coli*, *S.aureus* e *C. albicans* foram coradas pelos filtrados de cultivo, *Fusarium solani* C1; *Aspergillus* P15; *Paecilomyces saturatus* H59; *Aspergillus fumigatus* H63 e *Fusarium solani* H64B. Desta forma, podemos considerar que as substâncias fluorescentes presentes nos filtrados de cultivo interagem com vários alvos simultaneamente, sendo assim não contribui com especificidade no diagnóstico da tuberculose.

Por outro lado, a substância fluorescente avaliada no presente estudo apresentou características compatíveis com proteínas, nesse sentido, não se pode deixar de considerar que as descobertas de proteínas fluorescentes, destaque para as proteínas verdes, têm sido instrumento

para o avanço de pesquisas biomédicas [35,36,37]. Na medicina diagnóstica, essas proteínas ao se ligarem em alvos de interesse permitem a monitoração de células, tecidos e a interação entre proteínas [38].

Agradecimentos

Às Agências de Fomento FAPEAM (284/2003) e CNPq (553200/2005-4) e, ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do INPA pelo auxílio nos ensaios de sequenciamento de DNA.

Referências

- [1] Chast F. Les colorants, outils indispensables de la Révolution biologique et thérapeutique du XIXe siècle. *Revue d'histoire de la pharmacie* 2005; 93: 487-504.
- [2] WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control - WHO Report 2011. Available at: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Accessed: March 22, 2012.
- [3] BRASIL. Ministério da Saúde. Situação da Tuberculose no Brasil. Dia mundial de mobilização contra a Tuberculose. Secretaria de Vigilância em Saúde. Apresentação em PowerPoint. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- [4] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- [5] Merck. Fichas de Datos de Seguridad – conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión, 16/01/2006. Available at: <<http://www.chemdat.info>>. Accessed: May 5, 2012.
- [6] Qiu M, Ruisheng X, Shi Y, Chen H. Isolation and Identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 993-8.

- [7] Visalakchi S, Muthumary J. Antimicrobial activity of the new endophytic *Monodictys castaneae* SVJM139 pigment and its optimization. African Journal of Microbiology Research 2010; 4 (1): 38-44.
- [8] Ferrara MA. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias Bioativas. Revista Fitos 2006; 02 (01): 73-9.
- [9] Joseph B, Priya RM. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical Effect: A Review. American Journal of biotechnology and molecular biology 2011; 1 (3): 291-309.
- [10] Lima AM, Salem JI, Souza JVB, Cortez ACA, Carvalho CM, Chaves FC, Veiga Junior VF. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. Electronic Journal of Biotechnology 2011; 14 (4): 1-6.
- [11] Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araujo JM. Production and characterization of a thermos table -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. Bioresource Technology 2001; 76: 137-141.
- [12] Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araujo JM. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. Bioresource Technology 2002; 83: 105-109.
- [13] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection 2003; 5: 535-544.
- [14] Suto M, Takebayashi M, Salto K, Tanaka M, Yokota A, Tomita F. Endophytes as producers of xylanase. Journal of Bioscience and Bioengineering 2002; 93 (1): 88-90.
- [15] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4rd ed. APS Press, Minnesota, 1998.
- [16] Waite TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, 1990.
- [17] BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool - Base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website - <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>).
- [18] WHO - World Health Organization. Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part II Microscopy 1998.
- [19] ZEISS. Filter Assistant. Available at: <<https://www.micro-shop.zeiss.com/>>. Accessed: February 26, 2012.

- [20] Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyticalbiochemistry* 1976; 72: 248-254.
- [21] Remião JOR, Siqueira AJS, Azevedo AMP. *Bioquímica: guia de aulas práticas*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 87p..
- [22] Mapari SAS, Nielsen KF, Larsen TO, Jens CF, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Food biotechnology* 2005; 16: 231-238.
- [23] Mapari SAS, Meyer AS, Thrane ULF. Photostability of Natural Orange-Red and Yellow Fungal Pigments in Liquid Food Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2009; 57: 6253–6261.
- [24] Mapari SAS, Thrane ULF, Meyer AS. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology* 2010; 28 (6): 300-7.
- [25] Méndez A, Pérez C, Montañéz J, Martínez G, Aguilar C. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 2011, 12(12): 961-8.
- [26] Schuster A, Schomoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 87: 787–799.
- [27] Hamano PS, Kilikian BV. Production of red pigments by *Monascus Ruber* in culture media containing corn steep liquor. *Brazilian J. of Chemical Engineering* 2006; 23 (04): 443 - 449.
- [28] Kongruang J. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascuspurpureusin* a stirred tank bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38: 93–99.
- [29] Pastre, R; MARINHO, A; RODRIGUES-FILHO, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Química Nova* 2007; 30 (8): 1867-1871.
- [30] Boonyapranai K, Tungpradit R, Lhieochaiphant S, Phutrakul S. Optimization of Submerged Culture for the Production of Naphthoquinones Pigment by *Fusarium verticillioides*. *Chiang Mai J. Sci* 2008; 35(3): 457-466.
- [31] Yang SX, Gao JM, Hartmut L, Tian JM, Gennaro P. Absolute Configuration of Fusarone, A New Azaphilone from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. Isolated from *Melia azedarach*, and of Related Azaphilones. *Chirality* 2012; 24: 621-7.
- [32] Laifangbam S, Singh HL, Singh NB, Devi KM, Singh NT. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of

- pulmonary tuberculosis. Kathmandu University Medical Journal 2009; 7 (3): 226-230.
- [33] Mayser P, Stapelkamp H, Hans-Joachim K, Podobinska M, Wallbott W, Irlinger B, Steglich W. Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. Antonie van Leeuwenhoek 2003; 84: 185–191.
- [34] Hsu YM, Hsu YC, Liang YH, Kuo YH, Pan TM, Jalmi P, Bodke P, Wahidullah S, Raghukumar S. New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-Fermented Dioscorea The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2011; 28 (2): 505-512.
- [35] Kendall J, Badminton M. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. Tibtech 1998; 16: 216-224.
- [36] Griesbeck o. Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. Current Opinion in Neurobiology 2004; 14: 636–641.
- [37] Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi T, Shimogori T, Miyawaki A. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. Cell 2013; 153: 1602–1611.
- [38] Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov SA. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imagen. Trends in Biotechnology 2005; 23 (12): 605-613.

Artigo 2 – Revista: Word Journal of Microbiology and Biotechnology

“Produção de naftoquinonas por *Fusarium solani*, um endofítico de *Copaifera multijuga* Hayne”

Alita Moura de Lima, Jessyca dos Reis Celestino, João Vicente Braga de Souza, Julia Ignez Salem

Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Resumo O fungo *Fusarium solani* possui a capacidade de produzir substâncias da classe das naftoquinonas, compostos bioativos de importância médica. A utilização de bioprocessos com fungos apresenta-se como uma alternativa para obtenção de substâncias com atividade biológica ou ainda compostos úteis para síntese, em larga escala, de compostos com atividade biológica da mesma classe. No entanto, poucos são os estudos sobre os fatores que influenciam na produção de naftoquinonas por fungos. Diante disso, o presente estudo investigou a produção de naftoquinonas por *Fusarium solani* C1, um endofítico de *Copaifera multijuga* Hayne. Inicialmente, foi realizado um experimento univariado visando a seleção de fontes de carbono e nitrogênio para produção das naftoquinonas. Em seguida, um experimento multivariado (planejamento fatorial 2³), foi realizado visando avaliar a influência das fontes de carbono, nitrogênio e pH. Como resultados, observou-se que, a manose e o extrato de levedura foram as fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, mais adequadas para a produção das naftoquinonas. Os resultados do planejamento fatorial demonstram que altas concentrações de manose (>30 g/L) inibiram a produção da substância, enquanto que, os níveis mais altos dos fatores pH (7,38) e nitrogênio (4,78 g/L), isoladamente e em associação, promoveram a melhor produção dessas substâncias. Os níveis ótimos para a máxima produção das naftoquinonas (364 mM) foram: Manose 12,15 g/L, extrato de levedura 4,78 g/L e pH 7,38.

Palavras-chaves *Fusarium solani*; naftoquinonas; fonte de carbono; fonte de nitrogênio

1. Introdução

O fungo *Fusarium solani*, que pode ser isolado de solo e vegetais, possui capacidade de produzir naftoquinonas, um grupo de compostos químicos coloridos que por décadas vêm sendo

isolados e estudados quanto as suas atividades biológicas (Kurobane et al. 1980; Baker and Tatum 1983; Baker et al. 1990; Riffel et al. 2002; Zhang et al. 2006; Park et al. 2012). Gerber e Ammar (1979) isolaram três naftoquinonas produzidas por *Fusarium solani*: O-ethylfusarubin, hydroxydihydrofusarubin e O-ethylhydroxydihydrofusarubin. Ammar et al. (1979) descreveram a ação antibacteriana e antifúngica de Anhydrofusarubin (Fusarubin), uma substância produzida por *F. solani*. Em 1990, Baker e colaboradores isolaram vinte e duas naftoquinonas produzidas por *F. solani* e *Fusarium oxysporum*. A maior parte desses compostos (68%) apresentaram ação antagônica às bactérias, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* e um composto (naphyhopyrán) inibiu o crescimento de *Phytophthora parasitica*, um organismo fitopatogênico.

A atividade biológica das naftoquinonas está relacionada com as diferentes formas isoméricas desse composto, conforme posição das carbonilas em anel naftaleno. Atualmente, rotas sintéticas podem ser utilizadas para modificar as estruturas das naftoquinonas como estratégia de obter compostos bioativos análogos e/ou que ofereçam atividades aprimoradas. Como exemplo, tem-se β -lapachona, uma substância bioativa contra o *Trypanosoma cruzi*, que é obtida após modificação estrutural carbonílica do seu isômero natural, α -lapachona (Silva et al. 2003; Ferreira et al. 2010).

Portanto, ainda que uma naftoquinona produzida por um bioprocessamento com fungos não apresente atividade biológica, essa apresenta-se como composto inicial alternativo para síntese química. Devendo-se lembrar de que os bioprocessamentos com fungos podem ser realizados em laboratórios, de forma padronizada e permitem a obtenção de bioativos em larga escala (Fabre et al. 1993; Hao and Igbal 1997; Guarati and Zanoni 2000; Hamano and Kilikian 2006; Tomankova et al. 2011; Cabral et al. 2011; Fuck et al. 2011).

Em bioprocessamentos para produção de substâncias por fungos devem ser considerados fatores como: composição do meio, pH, temperatura, luz, disponibilidade de água e aeração (Pradeep et al. 2013). De acordo com Barros Neto et al. (1995), a influência de fatores pode ser analisada individualmente e em associação utilizando planejamentos fatoriais. Esses últimos permitem a realização de um número menor de experimentos, análise estatística e a obtenção de modelos matemáticos, sendo atualmente amplamente utilizados em ensaios de otimização de bioprocessamentos (Barros Neto et al. 1995).

O presente estudo investigou a produção de naftoquinonas por *Fusarium solani*C1, um endofítico de *Copaifera multijuga* Hayne. Como estratégia, inicialmente um experimento

univariado foi realizado para selecionar de fontes de carbono e nitrogênio para produção das naftoquinonas. Em seguida, um experimento multivariado (planejamento fatorial) foi realizado visando avaliar influência das fontes de carbono, nitrogênio e pH.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismo e preparação de inóculo

No presentes estudo foi utilizado o fungo endofítico *Fusarium solani* C1, umfungo isolado da espécie vegetal *Copaifera multijuga* e que pertence à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Para obtenção do seu inóculo, esse fungo foi cultivado em tubo contendo meio ágar Sabouraud, por cinco dias a 30 °C. Após esse período, foi acrescentado aos tubos 5 mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão de esporos. Alíquotas de 200 µL da suspensão de esporos (10^4 células/mL) foram utilizadas para inocular os experimentos descritos a seguir.

2.2. Seleção das fontes de carbono e nitrogênio para produção dos naftoquinonas

Com o intuito de selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para produção das naftoquinonas, foram preparados meios de cultivo utilizando K_2HPO_4 1g/L, $MnSO_4$ 0,5g/L, KCl 0,5g/L, $FeSO_4$ 0,01g/L, diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. As fontes de carbono (30 g/L) investigadas foram: sacarose, glicose, manose, lactose, xilose e ramnose e as fontes de nitrogênio (3 g/L) foram: nitrato de sódio; peptona de carne; extrato de levedura; extrato de malte e nitrato de potássio. Os erlemeyers (125 mL), contendo o meio de cultivo (50 mL), foram inoculados e incubados, por 14 dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, os cultivos foram filtrados sequencialmente em papel filtro de celulose (Whatman n.4) e membrana de éster celulose de 0,22 µm (Millipore). O filtrado da cultura foi analisado quanto à concentração das naftoquinonas.

2.3. Avaliação da influência da concentração das fontes de carbono, nitrogênio e do pH na produção das naftoquinonas

As fontes de carbono e nitrogênio que permitiram a obtenção das maiores concentrações de naftoquinonas foram selecionadas para um ensaio multivariado. Um planejamento experimental 2^3 com quatro repetições no ponto central foi utilizado com o intuito de avaliar a influência das concentrações da manose, concentração do extrato de levedura e o pH do meio na produção das naftoquinonas (Barros Neto et al., 1995). Os fatores, níveis e variável estudada são mostrados na Tab. 1. As condições experimentais e a obtenção do filtrado da cultura foram similares às apresentadas no item 2.2.

Tabela 1 Níveis utilizados para concentração de manose, extrato de levedura e pH no planejamento experimental

Níveis		-1	0	+1
Fonte de Carbono	X1 (g/L)	12,15	30	47,85
Fonte de Nitrogênio	X2 (g/L)	1,22	3	4,78
pH	X3	2,68	5,03	7,38

Foram realizados 8 experimentos (Tab. 2) e quatro repetições no ponto central. Um modelo estatístico linear foi determinado e foi utilizado para construção de superfícies de resposta, como descrito por Barros Neto et al. (1995). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATGRAPHICS versão 6.0 e também no STATISTICA versão 5.0.

2.4. Determinação das naftoquinonas

Os filtrados dos cultivos foram investigados quanto sua absorvibilidade a 500 nm. O total de naftoquinonas foi calculado pela equação $A = \epsilon \cdot L \cdot \text{conc}^n$, sendo A absorvância de 500 nm, L o comprimento celular (1 cm), ϵ é absorvibilidade molar média do total de naftoquinonas (6,456 L/mol.cm²) e conc^n é a concentração de naftoquinonas (mol/L) (Unagul et al. 2005). A

confirmação da produção de naftoquinonas por *Fusarium solani* C1 foi realizada por métodos cromatográficos em experimentos preliminares.

3. Resultados

3.1. Seleção de fontes de carbono e nitrogênio para a produção de naftoquinonas

Os resultados dos experimentos realizados para seleção das fontes de carbono e nitrogênio para produção de naftoquinonas por *Fusarium solani* C1 estão apresentados na Figura 1. Nas condições experimentais, Manose e Extrato de levedura foram as melhores fontes de C e N, respectivamente, para a produção das naftoquinonas.

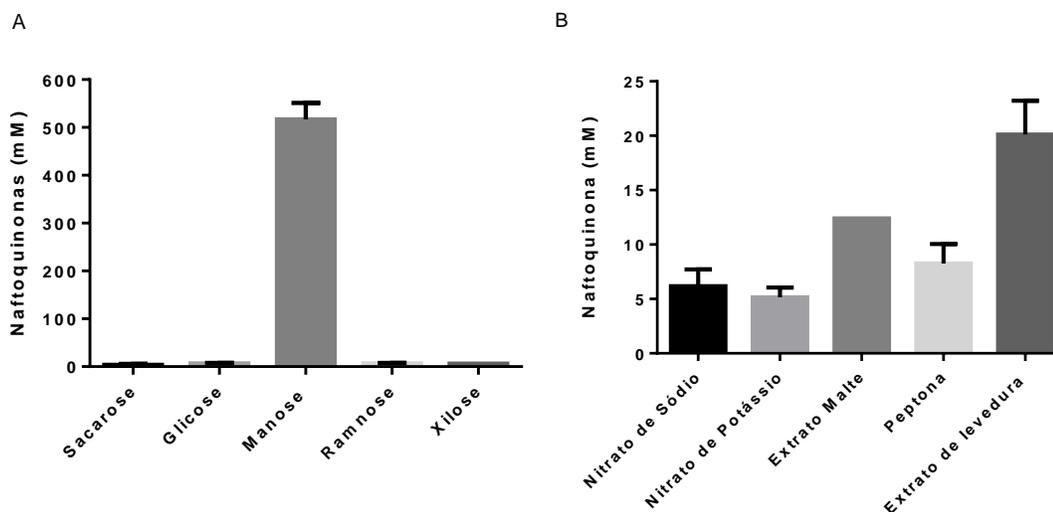


Fig. 1 Concentração das naftoquinonas produzidas por *Fusarium solani* C1 utilizando diferentes fontes de carbono (A) e nitrogênio (B). Nos experimentos de investigação da fonte de carbono, nitrato de sódio (3 g/L) foi utilizado como fonte de nitrogênio. Nos experimentos de investigação da fonte de nitrogênio, sacarose (30 g/L) foi utilizada como fonte de carbono

3.2. A influência das fontes de carbono, nitrogênio e pH na produção de naftoquinonas

As influências da concentração de manose, concentração do extrato de levedura e do pH para a produção de naftoquinonas (mM) foram investigadas a partir de um planejamento experimental 2^3 . A Tab. 2 apresenta os níveis dos fatores empregados nos experimentos e, ainda, os respectivos resultados de concentração das naftoquinonas.

De acordo com os resultados apresentados na Tab. 2, as concentrações obtidas variaram entre 1,5 e 402 mM.

Tab. 2 Influência da [manose], [extrato levedura] e pH na produção de naftoquinonas por *F. solani* C1 em experimentos realizados de acordo com um planejamento fatorial 2³

Experimento	Manose g/L	Extrato de levedura g/L	pH	Naftoquinonas mM
1	47,85	4,78	2,68	13,9
2	12,15	1,22	7,38	52,7
3	47,85	1,22	2,68	3,1
4	12,15	4,78	7,38	402,7
5	30	3	5,03	46,5
6	30	3	5,03	40,3
7	12,15	1,22	2,68	1,5
8	12,15	4,78	2,68	13,9
9	30	3	5,03	55,8
10	30	3	5,03	65,1
11	47,85	1,22	7,38	46,5
12	47,85	4,78	7,38	187,4

Os efeitos principais e suas respectivas interações, calculados a partir dos dados da Tab. 1 são apresentados na Tab. 3. Podemos verificar que todos os fatores investigados influenciaram de forma significativa a produção das naftoquinonas. A análise de efeitos estimados das variáveis permitiu verificar que a manose apresentou efeito inibitório na produção de naftoquinonas, enquanto que, as variáveis pH e nitrogênio, isoladas ou em associação promoveram a obtenção das maiores concentrações de naftoquinonas (Tab. 3).

Tab. 3 Efeito das variáveis testadas para produção de naftoquinonas por *F. solani* C1, calculados a partir dos dados apresentados na Tab.1

Efeitos estimados	
Média	= 77 ± 3*
A: Fonte de carbono	= -55 ± 8*
B: Fonte de nitrogênio	= 129 ± 8*
C: pH	= 164 ± 8*
AB	= -53 ± 8*
AC	= -56 ± 8*
BC	= 117 ± 8*

Os erros padrão em um erro puro com 3 graus de liberdade

A partir dos resultados dos efeitos foram calculados e estimados os erros padrão dos efeitos (σ) por meio das quatro repetições do ponto central (Tab. 4). Segundo Barros Neto et al. (1995), ao nível de 95% de confiança, somente são considerados significativos os efeitos, em módulo, cujos valores forem maiores que “ $t_v \times \sigma$ ”, onde t_v é o valor do teste t para v graus de liberdade. O valor do teste t para 3 graus de liberdade (t_2), ao nível de 95% de confiança é 4,303. Todos os efeitos estudados foram significativos ao nível de 95% de confiança.

Considerando-se os efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tab. 3 e esse é descrito a seguir:

$$[\text{Naftoquinonas mM}] = -124 + 4 * [\text{Manose g/L}] - 9,3 * [\text{Extrato de Levedura g/L}] + 12,9 * \text{pH} - 0,82 * [\text{Manose g/L}] * [\text{Extrato de Levedura g/L}] - 0,66 * [\text{Manose g/L}] * \text{pH} + 13,9 * [\text{Extrato de Levedura g/L}] * \text{pH}.$$

Pode-se observar na Tab. 4 que as variáveis do modelo eram significativas, que a regressão apresentada pelo modelo matemático utilizado foi significativa ($R^2 = 93\%$) e que, no entanto, o modelo apresentou falta de ajuste provavelmente devido à existência de efeitos quadráticos.

Tab. 4 Análise de variância para avaliar a significância estatística do modelo para produção de naftoquinonas por *F. solani* C1

Variáveis	Soma do quadrado	Grau de liberdade	Média do quadrado	F-Ratio	p-valor
A: Carbono	6044,5	1	6044,5	51,35	0,0056
B: Nitrogênio	33037,4	1	33037,4	280,64	0,0005
C: pH	53939,7	1	53939,7	458,19	0,0002
AB	5549,31	1	5549,31	47,14	0,0063
AC	6221,7	1	6221,7	52,85	0,0054
BC	27342,9	1	27342,9	232,27	0,0006
Teste da Falta de Ajuste	9291,19	2	4645,59	39,46	0,0070
Erro puro	353,167	3	117,722		
Total (corr.)	141780	11			

$$R^2 = 93,2 \%$$

Para representar a estimativa para produção de naftoquinonas pelo fungo *Fusarium solani* C1 foram feitas superfícies de resposta Fig. 2 a partir dos dados gerados pelo modelo avaliado. As superfícies de respostas construídas demonstraram que as concentrações ótimas para a máxima produção das naftoquinonas (364 mM) foram Manose 12,15 g/L, extrato de levedura 4,78 g/L e pH 7,38.

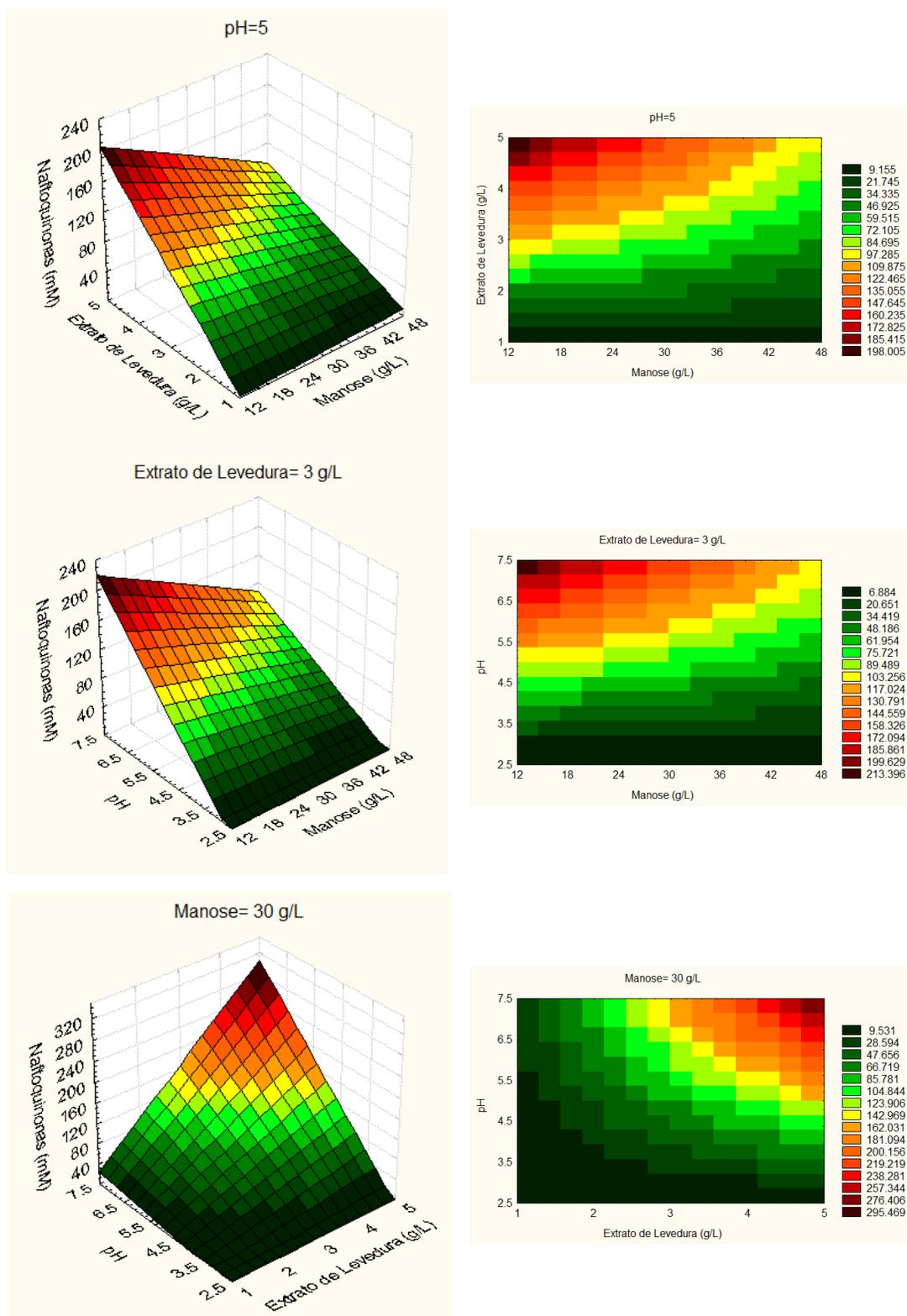


Fig. 2 Efeito das concentrações de manose, extrato de levedura e do pH na biossíntese das naftoquinonas

4. Discussão

Naftoquinonas produzidas pela espécie *Fusarium solani* representa uma alternativa para obtenção de novos fármacos considerando as atividades antimicrobianas (Geber and Ammar et al. 1979; Ammar et al. 1979; Baker et al. 1990). Deve ser lembrado ainda que, essa espécie apresenta potencial para ser produtora em larga escala de compostos dessa classe e que podem ser utilizados em síntese química. No entanto, poucos estudos foram realizados visando investigar quais os fatores favorecem a biossíntese dessa classe de compostos por essa espécie.

O conhecimento das exigências nutricionais dos fungos é importante para o cultivo desses microrganismos em laboratório e para o sucesso na otimização dos bioprocessos (Ajdari, et al. 2011). É bem conhecido que o tipo e concentração de carbono e fontes de nitrogênio, bem como a relação C/N desempenham papéis importantes em crescimento fúngico, na esporulação e produção de metabólitos (Boonyapranai et al. 2008; Pisavera and Kujumdzieva 2010). A manipulação nutricional é a mais simples e eficaz maneira de melhorar a produção de um metabolito de origem fúngica. No presente estudo manose e extrato de levedura apresentaram-se como as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, para a produção de naftoquinonas.

A manose é um monossacarídeo que contribui para o metabolismo dos fungos, além de ser polimerizada como mananas fazendo parte da parede celular desses microrganismos (Borges 2006). Ademais, no presente estudo a manose foi a melhor fonte de carbono para a produção de naftoquinonas (515,76 mM). No estudo de Boonyapranai et al. (2008) os pesquisadores realizaram um estudo de otimização para produção de naftoquinonas pelo *Fusarium verticillioides* e identificaram a manose como segunda fonte de carbono que mais favoreceu na produção das naftoquinonas (429,06 µM/g).

Fontes de nitrogênio possuem grande importância na produção de substâncias em bioprocessos com fungos (Carels et al. 1977; Lin and Demain 1991). No presente estudo, o extrato de levedura foi a fonte de nitrogênio mais apropriada para a produção de naftoquinonas. Esse achado também foi observado no estudo de Pradeep et al. (2013), no qual autores obtiveram as maiores concentrações de um pigmento vermelho produzido pelo fungo *Fusarium moniliforme* KUMBF1201, quando cultivado em meio cuja fonte de nitrogênio foi extrato de levedura. Desta forma, podemos sugerir que o extrato de levedura é adequado para produção de pigmentos pela

espécie *Fusarium solani* C1 e *Fusarium moniliforme* KUMBF1201. Isso pode ser explicado pelo fato do extrato de levedura ser uma fonte orgânica de nitrogênio, possuir teor de proteína entre 30 a 70%, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), minerais, e macro e microelementos (Guimarães et al. 2009).

No presente estudo, as diferentes concentrações obtidas das naftoquinonas (1,5 e 364 mM) confirmam a importância de analisar as associações entre C/N e pH.

A concentração média de naftoquinonas produzidas no presente estudo foi de 77,45 mM (Tab.3), podendo ser considerado uma quantidade promissora quando comparada com o estudo de Premalatha et al. (2012), os pesquisadores obtiveram produção máxima de 124 mM por *Fusarium moniliforme* MTCC6985, em experimento realizado com diferentes fontes de carbono, nitrogênio, metais, minerais e pH.

Quando avaliados nos ensaios univariados, os fatores manose e extrato de levedura isoladamente favoreceram a produção de naftoquinonas, no entanto, o experimento univariado (planejamento experimental 2³) permitiu estimar os efeitos (Tab. 3) desses fatores em associação. Desta forma, constatou-se que, quando utilizados juntos, apenas o extrato de levedura favoreceu a produção das naftoquinonas e a manose apresentou uma influência repressora. Possivelmente, a presença conjunta de manose e uma fonte de nitrogênio orgânica causou repressão metabólica no fungo (Bernhardt e Likens, 2002).

No presente estudo, o pH foi a variável mais importante na biossíntese das naftoquinonas. Da mesma forma que Boonyaprainai et al. (2008) o pH próximo à neutralidade (7,2-7,3) apresentou-se como adequado para a produção das naftoquinonas.

O fungo endofítico *Fusarium solani* C1 pode ser considerado uma fonte Amazônica promissora para produção das naftoquinonas, sendo que estudos para avaliar as atividades biológicas dessas devem ser realizados.

Agradecimentos

Às Agências de Fomento FAPEAM (284/2003) e CNPq (553200/2005-4).

Referências

- Ammar MS, Garber NN, Mcdanie LE (1979) New antibiotic pigments related to fusarubin from *Fusarium solani* (Mart.) Sacc I. fermentation, isolation, and antimicrobial activities. J Antibio 32: 679-684.
- Ajdari Z, Ebrahimipour A, Manan MA, Hamid M, Mohamad R, Ariff AB (2011) Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. Journal of Biomedicine and Biotechnology 1:1-9. doi:10.1155/2011/487329
- Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE (1995) Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora Unicamp, Campinas - SP, 278.
- Baker RA, Tatum JH, Nemeč SJr (1990) Antimicrobial activity of naphthoquinones from Fusaria. Mycopathologia 111: 9-15.
- Bernhardt ES, Likens GE (2002) Dissolved organic carbon enrichment alters nitrogen dynamics in a forest stream. Ecology 83:1689–1700.
- Boonyapranai K, Tungradit R, Lhieochaiphant S, Phutrakul S (2008) Optimization of Submerged Culture for the Production of Naphthoquinones Pigment by *Fusarium verticillioides*. Chiang Mai J. Sci 35(3): 457-466.
- Borges JN (2006) Isolamento e caracterização de polissacarídeos da parede celular da levedura *Phaffia rhodozyma*. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.
- Cabral MMS, Cence K, Zeni J, Tsai SM, Durrer A, Foltran LL, Toniazzo G, Valduga E, Treiche (2011) Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. Eur Food Res Technol 233:159–166.
- Carels M, Shepherd D (1977) The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture. J Microbiol 23:1360-1372.
- Fabre CE, Santerre AL, Loret MO, Baberian R, Pareilleux A, Goma G, Blanc P (1993) Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. Journal of Food Science 58:1099–1102.
- Ferreira SB, Gonzaga DTG, Santos WC, Araújo KGL, Ferreira VF (2010) β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. Rev. Virtual Quim 2(2):140-160.
- Fuck WF, Gutterres M, Jesus MA (2011) Desenvolvimento de biocorantes aplicados na produção de couros X Oktoberforum – PPGEQ – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Gerber NN, Ammar MS (1979) The journal of antibiotics new antibiotic pigments related to fusarubin from *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. The Journal of antibiotics 32(7):685-688.
- Guaratini CCI, Zanoni MVB (2000) Corantes têxteis. Química Nova 23.
- Guimarães LB, Santos VZR, Covizzi LG, Gracia-Cruz CH (2009) Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum* var. caulivora. Braz. J. Food Technol 91-99.
- Hamano PS, Kilikian BV (2006) Production Of Red Pigments By *Monascus Ruber* In Culture Media Containing Corn Steep Liquor. Brazilian Journal of Chemical Engineering 23 (04): 443-449.
- Hao Z, Iqbal A (1997) Some aspects of organic pigments. Chemical Society Reviews 26:203-213.
- Kurobane I, Vining LC, McInnes AG, Gerber NN (1980) Metabolites of *Fusarium solani* related to dihydrofusarubin. The journal of antibiotics Notes 1375-1379.
- Lin TF, Demain AL (1991) Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. Appl Microbiol Biotechnol 36: 70-75.
- Park YH, Lee SG, Ahn DJ, Kwon TR, Park SU, Lim HS, Bae H (2012) Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer Cultivated in Korea. J Ginseng Res 36(2): 211-217. doi.org/10.5142/jgr.2012.36.2.211
- Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M, Pradeep BV (2013) Influence of Culture Media on Growth and Pigment Production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 Isolated from Paddy Field Soil. World Applied Sciences Journal 22 (1): 70-77. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265
- Premalatha B, Stanly PF, Pradeep BV, Palaniswamy, M (2012) Production and characterization of naphthoquinone Pigment from *Fusarium moniliforme* MTCC6985. World Journal of Pharmaceutical research 1(4):1126-1142.
- Pisareva I, Kujumdzieva AV (2010) Influence of carbon and nitrogen sources on growth and pigment production by *Monascus pilosus* C1 strain. Biotechnol. & Biotechnol 24:501-506.
- Riffel A, Medina LF, Stefani V, Santos RC, Bizani D, Brandelli A (2002) In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35:811-818.
- Silva MN, Ferreira VF, Souza MCBV (2003) Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. Quim. Nova 26(3): 407-416.
- Tatum JH, Baker RA (1983) Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from

citrus. *Phytochemistry* 22(2):543-547.

Tomankova k,Kejlova k, Binder S, Daskova A, Zapletalova j, Bendova H, Kolarova D, Jirova D (2011) In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicology in Vitro*25:1242–1250.

Unagul P, Wongsa P, Kittakoop P,Intamas S, Srikitikulcha PI, Tantichareon M (2005) Production of redpigment by insect pathogenic fungus. *J. Ind. Microbil. Biotechnol* 32: 135-140.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM (2006) Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment.*Journal of Clinical Microbiology* 44 (6):2186–2190. doi:10.1128/JCM.00120-06

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS TESE

ALIEVA, N. O.; KONZEN, K; A.; FIELD, S. F.; MELESHKEVITCH, E. A.; HUNT, M. E.; BELTRAN-RAMIREZ, V.; MILLER, D. J.; WIEDENMANN, J.; SALIH, A.; MATZ, M. V. Diversity and Evolution of Coral Fluorescent Proteins. **Plos One**, v.3, n.7, p. 1-12, 2008.

AMMAR, M.S.; GARBER, N.N.; MCDANIE, L.E. New antibiotic pigments related to fusarubin from *Fusarium solani* (Mart.) Sacc I. fermentation, isolation, and antimicrobial activities. **J Antibio**.V.32, p. 679-684, 1970.

ARAÚJO, M. E. **Corantes naturais têxteis – da antiguidade aos tempos modernos**. Texto de apoio ao Curso de Mestrado em Química Aplicada ao Patrimônio Cultural, DQB, FCUL, 2005.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (Eds.). Ecologia Microbiana. Jaguariúna: **EMBRAPA-CNPMA**, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biociencia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

BA, F.; RIEDER H. L. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 3, n. 12, p. 1101–1105, 1999.

BAIPONG, S.; PINTHONG, R. Production of red pigment and citrinin by *Monascus purpureus* (Thai). **Journal of Agriculture**.v. 202, p. 4–6, 2003.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B., 1998. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**, 4a.ed. APS Press, Minnesota.

BLANC, P.; LORET, M.; GOMA, G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. **Biotechnology Letters**.v.17, n. 3, p. 291–294, 1995.

BRADFORD M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram

Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry** v.72, p. 248-254,1976.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA A SAÚDE. Coordenação nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. **Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial - Baciloscopia**, série TELELAB, Brasília, p.72, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância epidemiológica**. 6 ed., Série A. Normas e Manuais Técnicos, p. 27, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3 ed. Edição comemorativa Rio de Janeiro, p. 240, 2005(b).

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação da Tuberculose no Brasil. Dia mundial de mobilização contra a Tuberculose**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Apresentação em PowerPoint. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRIGLIA, M. F. S. **Escarro Induzido: uma opção na investigação da tuberculose provável** Dissertação (Mestrado em patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1999.

CABRAL, M. M. S.; CENCE, K.; ZENI, J.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN L. L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; TREICHE, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **Eur Food Res Technol**, v.233, p.159–166, 2011.

CARVALHO, C. M. **Recursos naturais amazônicos com perspectivas de uso biotecnológico sobre o *Mycobacterium tuberculosis***. São Paulo: USP, 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, 2005.

CHALFIE, M.; YUAN, T.; EUSKIRCHEN, C.; WARD, W. W.; PRASHERF, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. **Science**, v. 263, p. 802-804, 1994.

CHAST, F. Les colorants, outils indispensables de la Révolution biologique et thérapeutique du XIXe siècle. **Revue d'histoire de la pharmacie**, v. 93, n. 348, pp. 487-504.2005.

- CHUDAKOV, D.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K. A. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. **TRENDS in Biotechnology**, v.23,n. 12, p.605-613, 2005.
- CUNHA, F. G. **Estudo da Extração Mecânica de Bixina das Sementes de Urucum em Leito de Jorro**. Uberlândia: UFU, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- DUFOSSÉ L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technol. Biotechnol**,v. 44, n.3, p.313–321,2006.
- DANIEL, T.M. Rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. **Journal of Laboratory Clinical Medical**, v. 116, p. 277-282, 1990.
- FABRE, C.E.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; BABERIAN, R.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G.; BLANC, P. Production and food applications of the red pigments of *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**. v. 58, p. 1099–1102, 1993. J.
- FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias Bioativas. **Revista Fitos**. v. 02, n. 01, p. 73-79, 2006.
- GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. A simple and rapid method for the determination of taxol produced by fungal endophytes from medicinal plants using high performance thin layer chromatography. **Chinese Journal Of Chromatography**, v. 26, n.1, p. 50-55, 2008.
- GITHUI, W.; KITTUI, E. S.; JUMA, D. O.; MWAI, J.; KWAMANGA, D. A. Comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **East African Medical Journal**, v. 70, p. 263-266, 1993.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v.23, 2000.
- GRIESBECK O. Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. **Current Opinion in Neurobiology**. V.14, p.636–641, 2004.
- HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; LORET, M. O.; TZE'DAKIS, T.; GOMA, G.; BLANC, P. Production and Identification of *N*-Glucosylrubropunctamine and *N*-Glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and Occurrence of Electron Donor-Acceptor Complexes in These Red Pigments. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2671–2678, 1997.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J-L; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 619-625, 2000.
- HAMANO, P. S.; KILIKIAN, B. V. Production Of Red Pigments By *Monascus Ruber* In Culture Media Containing Corn Steep Liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 04, p. 443 - 449, 2006.

HAO Z.; IQBAL, A. Some aspects of organic pigments. **Chemical Society Reviews**, v. 26 p. 203-213, 1997.

HESSELTINE, C. A millennium of fungi, food and fermentation. **Mycologia**. 57, p.149–197, 1965.

H-KITTIKUN, A.; V-CHARERN, M.; PINTHONG, R. Factors affecting red rice production by *Monascus purpureus*. **Journal of Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 122–132, 1988.

HSU Y. M.; HSU Y. C.; LIANG Y. H.; KUO Y. H.; PAN T. M.; JALMI P., BODKE P.; WAHIDULLAH S.; RAGHUKUMAR S. New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-Fermented Dioscorea The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, n.2, p.505-512, 2011.

KENDALL, J.; BADMINTON, M. *Aequorea victoriabioluminescence* moves into an exciting new era. **Tibtech**. V. 16, p. 216-224, 1998

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; SURENDRA, K.; GOND, A. S.; DONALD, S. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat. Prod. Rep.** v.28, p. 1208-1228, 2011.

KUMAGAI, A.; ANDO, R.; MIYATAKE, H.; GREIMEL, P.; KOBAYASHI, T.; HIRABAYASHI, T.; SHIMOGORI, T.; MIYAWAKI A. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. **Cell**. v.153, p. 1602–1611, 2013.

LAIFANGBAM, S.; SINGH, H. L.; SINGH, N. B.; DEVI, K. M.; SINGH, N. T. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 7, n. 3, p. 226-230, 2009.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Biofluorescence: the making of a new technology. *Glow in the dark: The revolutionary science of biofluorescence* By Vincent Pieribone and David Gruber. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 11, p.1212, 2006.

LIMA, A. M.; SALEM, J. I.; SOUZA, J. V. B.; CORTEZ, A. C. A.; CARVALHO, C. M.; CHAVES, F. C., VEIGA JUNIOR, V. F. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, 2011.

LIU, J. J.; CHEN, S. J.; GONG, H. X. Study on Endophytic fungi producing Orange Pigment isolated from *Ginkgo biloba* L. disponível em: <http://www.paper.edu.cn>: p.1-9. Acesso em: novembro de 2012.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; JENS, C. F.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Food biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MAPARI, S. A. S., MEYER, A. S.; THRANE, U. L. F. Photostability of Natural Orange-Red and Yellow Fungal Pigments in Liquid Food Model Systems. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 57, p. 6253–6261, 2009.

MAPARI, S. A. S.; THRANE, U. L. F.; MEYE, A. N. N. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, 2010.

MAYSER P., STAPELKAMP H., HANS-JOACHIM K., PODOBINSKA M., WALLBOTT W., IRLINGER B., STEGLICH W. Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 84, p.185–191, 2003.

MEINICKE, R. M. **Estudo da produção de pigmentos por *monascus ruber* cct 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

MERCK. **Fichas de Datos de Seguridad** – conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión, 16/01/2006. Disponível em: <<http://www.chemdat.info>>. Acesso em: 05 maio de 2012.

MITCHISON, D. A.. The Diagnosis and therapy of tuberculosis during the past 100 years. **American journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 699-706, 2005.

OLIVEIRA, J. S. R. L. **Estudo da *Caesalpinia ferrea* Martius na obtenção de Bioativos Antagônicos aos agentes da Tuberculose e Candidíase**. Manaus: UFAM, 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2008.

PASTRANA, L.; BLANC, P. J.; SANTERRE. A. L.; LORET, M. O.; GOMA, G. Production of Red Pigments by *Monascus mber* in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source. **Process Biochemistry**, v. 30, No. 4. pp. 333-341, 1995.

PATTANAGUL, P. **Using of vegetable oil, Angkak, soy protein isolate and tapioca starch to improve the quality of sausages (Thai)**. Thesis for Master of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. 2002.

PATTANAGUL, P.; PINTHONG, R.; PHIANMONGKHOL, A.; THARATHA, S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus sp.* **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 20–23, 2008.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, L. J.; ARAÚJO, W. L.. Microrganismos Endofítico. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PINTHONG, R.; PATTANAGUL, P. Effect of angkak and tapioca starch on quality of sausages containing vegetable oil (Thai). **Khon Kaen Agriculture Journal**. v. 32, n. 2, p. 120–127, 2004.

PRADEEP, F.S.; BEGAM, M.S.; PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B.V. Influence of Culture Media on Growth and Pigment Production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 Isolated from

Paddy Field Soil. **World Applied Sciences Journal**.V. 22, n.1, p.70-77, 2013. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265.

QIU M., RUIHENG X, SHI Y., CHEN H. Isolation and Identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. **World J Microbiol Biotechnol**; v.26, p. 993-8. 2010

REMIÃO J. O. R,SIQUEIRAA.J.S.;AZEVEDO AMP. Bioquímica: **guia de aulas práticas**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 87p..

REVILLA, J. **Corantes Naturais**. Manaus: SEBRAE: INPA, 2004.

RUFFINO NETTO, A. **Tuberculose MDR**.MÉDICOS HC-FMUSP. Doenças Emergentes e Reemergentes.São Paulo, Ano 1, n. 3, p. 38 , 1998.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L.E.S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 6-24, 2007.

SES/AM – GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS / SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DE SAÚDE. C.R.E.P.S Cardoso Fontes. **Relatório de Avaliação Anual do Programa de Controle do Amazonas**. Manaus: PCT/SUSAM – Série Histórica de TB, 2002.

SIDRIM, C. J. J; MOREIRA, B. J. L. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SHIMOMURA, O. Discovery of Green Fluorescent Protein, GFP **Nobel Lecture**, p. 117-129, 2008.

SOARES, P. P. A Dama Branca e suas Faces: A Representação iconográfica da Tuberculose. **História Ciências Saúde**, v. 1, n. 1, p. 1, 1994.

SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **TrendsBiotechnology**, v. 6, p. 283–288, 1988.

STAMFORD, T.L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T.L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

STEINGART, K.R.; HENRY, M.; NG, V.; HOPEWELL, P.C.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M.; AZIZ, M.A.; PAI, M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 570-581, 2006.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1315-1324, 1995.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p.535-544.2003.

STROBEL, G.; BRYN, D. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology And Molecular Biology**, v.67, n.4, p. 491–502, 2003.

STROBEL,G.; BRYN, D.; CASTILLO,U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **J. Nat. Prod**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SALTO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n.1, p. 88-90, 2002.

TOFFOLI, D. J.; COURROL, L. C.; TARELHO, L. V. G.; GOMES, L.; VIEIRA JUNIOR, N. D.. Estudo do Complexo Hipericina:Európio para uso em diagnóstico clínico. **Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo**, v. 20, p. 32-34, 2006.

TOMAN, K. **Toman`s Tuberculosis**: Case detection, treatmaent, and monitoring. Question and Answers. Second Edition. Geneva: World Health Organization, p. 332, 2004.

TOMANKOVA, K.; KEJLOVA, K.; BINDER, S.; DASKOVA , A.; ZAPLETALOVA, J.; BENDOVA, H.; KOLAROVA, D.; JIROVA, D.. In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. **Toxicology in Vitro**. v. 25, p.1242–1250, 2011.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção De Carotenoides: Microrganismos Como Fonte De Pigmentos Naturais. **Química Nova**, v. 32, v. 9, p. 2429-2436, 2009.

VIEIRA, F.D.; SALEM, J.I; RUFFINO-NETO, A.; CAMARGO, S.A.; SILVA, R.R.F.; MOURA, L.C.C.; SILVA, J.V. Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para diagnóstico da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 5, p. 304-311, 2008.

VISALAKCHI, S.; MUTHUMARY, J. Antimicrobial activity of the new endophytic *Monodictyscastaneae* SVJM139 pigment and its optimization. **African Journal of Microbiology Research**. V. 4, n. 1, p. 38-44, 2010.

VOLP, A. C. P.; REHNE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos Naturais Bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WAITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal

ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990.

WENT, F. A. F. C. *Monascus purpureus* le champignon de l' ang-quacune nouvelle thelebole. **Annales des Sciences Naturelles Botanique**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 1895.

WHO - World Health Organization. **Laboratory Services in Tuberculosis Control**. Part II Microscopy 1998.

WHO- World Health Organization. **Fluorescence microscopy for disease diagnosis and environmental monitoring**. Regional Publications, Eastern Mediterranean Series; 28, 2005.

WHO - World Health Organization. **Global Tuberculosis Control - WHO Report 2011**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: 22 março 2012.

ZEISS. **Filter Assistant**. Disponível em: <<https://www.microshop.zeiss.com/>>. Acesso em: 26 fevereiro 2012.

ZUMLA, A.; RAVIGLIONE, M.; HAFNER, R.; REYN, F. V. current concepts Tuberculosis. **The new england journal of medicine**. p. 745-755, 2013.

APÊNDICE

Title and authors: “*Potential of coloured and florescent substances, produced by Amazonian endophytic fungi, for bascilloscopic diagnosis of Tuberculosis*”.

Alita Moura de Lima, Ana Claudia Alves Cortez, João Vicente Braga de Souza, Julia Ignez Salem

Coordenação de Sociedade Ambiente e Saúde, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Abstract

Global Tuberculosis Control Programmes use bascilloscopies (microscopic detection of bacilli) as their first choice in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. However, carbolfucsina, the dye solution used in this method is a toxic carcinogenic compound which contaminates water and endagers human health. In order to verify the potential of coloured substances produced by fungi endophytic filamentous to replace carbolfucsina, endophytes derived from vegetables *H. succuba*, *C. multijuga*, *P. aduncum* and *S. reticulata* were analyzed. From 75 isolates, 30 were selected with capacity to produce coloured diffusible substances in solid medium. The culture filtrates were tested in for their ability to stain smears prepared from the standard strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Analysis of the staining was performed by bright field and fluorescence microscopy. Fluorescence substances identified as proteins by the Bradford technique, present in 78% of the culture filtrates, enabled the visualization of *M. tuberculosis* H37Rv. When the culture filtrates were tested with other microorganisms (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and *C. albicans* ATCC 36232) they were found to be nonspecific for *M. tuberculosis*. Despite the negative result of the proposed objective, there is potential for fluorescent proteins to be used in monitoring cell, tissue and protein interactions.

Keywords: Endophytic fungi; pigments; tuberculosis diagnosis

1. Introduction

The use of dyes in diagnostic laboratory activities has contributed to the development of different scientific fields, such as Microbiology and Pathology [1]. These dye solutions enable research of several different microorganisms. The affinity of

pigments in specific microbial structures is essential for the identification and classification of microorganisms. Among these groups, Mycobacteria stand out because their cell walls present acid-resistance, retaining carbolfucsina even after decolourisation with acid-alcohol solutions [2]. These bacteria are known as acid-fast bacilli (AFB), among which *Mycobacterium tuberculosis* is identified as the main causative agent of human tuberculosis (TB) [2].

According to the World Health Organization TB is still a major cause of death worldwide, in 2011 there were 1.1 million deaths recorded. This fact is even more troubling because in the same year, 10 million children were orphaned as a result of the death of their parents from TB [2]. The incidence rate of TB is considered critical in 22 countries, including Brazil, where in 2011 there were approximately 36 new cases per 100,000 people [3]. To diagnose this disease, global programs for disease control opt for AFB research in smears of broncho-pulmonary secretion, with the aid of bright-field microscopes. The smear staining technique, in use since 1883, is that of Ziehl-Neelsen [4]. However, substances and dyes used in this technique cause harm to human health and the environment; they are considered toxic, carcinogenic and contaminate water [5]. In this sense, the search for new dyes derived from natural sources could contribute to reducing these damages.

Endophytic fungi are presented as an alternative natural source for obtaining dyes [6;7]. Studies on endophytic fungi, especially those related to the discovery of new substances, appear relevant for use in the biological control of pests and diseases, and for application in the chemical, biochemical, pharmaceutical and food industries. Some bioactive molecules are currently being used to produce numerous commercial

products, for this multi-billion dollar industry[7;8;9;10;11;12;13;14].

In light of the biotechnical potential of fungi and the importance of diagnosing TB, this study aims to evaluate the use of coloured and fluorescent substances, produced by endophytic filamentous fungi isolated from Amazonian plant species (*Copaifera multijuga*, *Caesalpinia ferrea*, *Himatanthus sucuuba* and *aduncum*), in the diagnosis of bacillary tuberculosis.

2. Materials and Methods:

2.1 Microorganisms and Identification

A selection of 30 endophytic fungal isolates from the National Institute of Amazonian Research's "Microorganismos de Interesse Médico" collection were evaluated in this study.

The fungi were identified using the microcultural technique, by observing micromorphological and macromorphological aspects of vegetative and reproductive structures. The results were compared with taxonomic keys to determine the genus [15]. Identification by nucleotide sequencing of the ITS1 and ITS4 ribosomal DNA (rDNA) was performed. The DNA of the microorganisms was extracted using the commercial extraction kit "Qiagen" and the ITS1 and ITS4 regions of rDNA were then amplified by polymerase chain reaction (PCR). The amplified samples were then processed for the sequencing reaction, using the capillary sequencer 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) [16]. The genomic sequences provided by the sequencer were analyzed by the program BLASTn, comparing them with the National Center for Biotechnology

Information (NCBI) database [17]. Only genomic sequences which were identified to have 98% similarity or greater were accepted.

2.2 Bioprocess for obtaining dyes

The fungal isolates were grown in tubes containing Sabouraud agar for five days at 30°C. Following this, 5 mL of sterile distilled water was added to the tubes to obtain spore suspension. An aliquot of 200 µL of spore suspension (10^8 cells/mL) was transferred to Erlenmeyer flasks containing 30 mL of liquid medium (potato dextrose, Sabouraud and Czapek). The cultures were kept in a static state for 15 days at 30°C. The culture filtrates were obtained after two filtering processes. Firstly, using Whatman cellulose filter paper and secondly, using 0.22 micrometer Millipore filter membranes. The culture filtrates were stored in the freezer at -20 °C until they were used.

2.3 Smears preparation with standard Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv

Smears were prepared from *M. tuberculosis* H37Rv grown in Middlebrook 7H9GC. From the culture, a suspension was prepared with *M. tuberculosis* in distilled water, 3×10^{-1} cells/mL (equivalent to 3+ bacillus concentration) then 30 µL aliquots of the suspension were placed on slides previously degreased in 70% alcohol. All slides were fixed by quickly passing the underside of the slide over the flame of a Bunsen burner three times. The slides were stored in microscope slide storage boxes until the test procedure was undertaken.

2.4 Staining

Staining of *M. tuberculosis* H37Rv using fungal culture filtrates: after correctly positioning the smear slides into the metal holder above a sink, the smears were covered with 100 μ L of culture filtrates. After 10 minutes the slides were washed with a jet of low-pressure water until all the excess culture filtrate had been removed. The slides were subsequently covered with a 1% acid alcohol solution for 1 minute and washed again with a jet of low-pressure water. After drying at room temperature, microscopic reading of the slides was undertaken.

The Ziehl Neelsen technique (ZN) was used for quality control of the quantity and integrity of mycobacteria present in the smears according to International standards [18].

2.5 Microscopy

The smear readings were taken using a trinocular microscope, Zeiss Axioskop 40 - 50 HBO, on bright-field and (epi) fluorescence in-plane achromatic objective 100x (immersion) and three sets Zeiss fluorescence filters with the following characteristics [19]: FS02: excitation G 365, beam filter FT 395, and emission LP 420; FS06: excitation BP 436/10, beam filter FT 460, and emission LP 470; and FS15: excitation BP 546/12, beam filter FT 580, and emission LP 590. The *M. tuberculosis* smears that were stained conventionally, and that were stained using the culture filtrates, were described according to WHO guidelines [18].

2.6 Staining Tests with other microorganisms

The culture filtrates that showed the greatest ability to detect Colony Forming Units (CFU) of *M. tuberculosis* H37Rv underwent a specificity test with other microorganisms. Smears were made from *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram-negative bacteria), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (gram-positive bacteria) and *Candida albicans* ATCC 36232 (yeast-like fungi).

The *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* smears were covered with 100 μ L of culture filtrate for 10 minutes. Then discolouration and counterstaining, alone or combined was performed. These steps were performed in 6 different ways, as listed: 1. Discolouration by washing with low pressure water jet; 2. Discolouration using 1% acid alcohol solution for 1 minute; 3. Discolouration with 1% acid alcohol solution for 2 minutes; 4. Discolouration with 1% acid alcohol solution for 1 minute, followed by gently washing with a stream of low pressure water to eliminate the alcohol acid solution. Counterstaining was then performed using potassium permanganate (5M) for 1 minute; 5. Discolouration with 1% acid alcohol solution for 1 minute, followed by gently washing with a stream of low pressure water to eliminate the alcohol acid solution. Counterstaining was then performed using India ink for 1 minute; 6. Discolouration with 1% acid alcohol solution for 1 minute, followed by gently washing with a stream of low pressure water to eliminate the alcohol acid solution. Counterstaining was then performed using 0.3 % methylene blue for 1 minute.

After procedures 2 through 6, the slides were washed with a jet of low pressure water until all traces of the acid alcohol and counterstain solutions had been removed. All slides were dried at room temperature.

2.7 Chemical characterization of the florescent substance

The culture filtrate selected for the greatest ability to detect CFU of *M. tuberculosis*H37Rv was subjected to thin-layer chromatography - fixed phase preparative CCD(1.05553 DC- Alufolien Kieselgel 60/Schichtdicke 0,2 mm)in order to separate the fluorescent substances. Next, the chromatographic plates were visualized using a fluorescent lamp (366 nm) in order to observe the elution of the fluorescent substance and to calculate the retention factor (*rf*). Using a spatula, the fluorescent spot was transferred to an Eppendorf tube (1.5 mL). The material was suspended in 200 μ L of MiliQ sterile water. This suspension separated four aliquots: The first aliquot was used to stain the bacillus *M. tuberculosis* and confirm the isolation of the fluorescent substance. The Bradford method [20], using the coomassie brilliant blue G250 dye (Sigma), was applied to the second aliquot to identify proteins. The third aliquot underwent a protein precipitation technique using saturated ammonium sulfate [21]. The supernatant from the precipitation technique was analyzed using the Bradford technique in order to confirm a lack of protein. The fourth aliquot was subjected to mass spectrometer using Bruker's MALD-TOFF Autoflex II in accordance with manufacture instructions (RP_700-3500) and peptide detection analysis using the matrix alpha-cyano.

2.8. Influence of carbon and nitrogen sources

Assays were undertaken in order to evaluate the influence of carbon and nitrogen sources in the production of fluorescent substances in the chosen fungi. The assays were conducted using Czapeck culture medium substituting the carbon (sucrose) and nitrogen (sodium nitrate) sources. The carbon sources glucose, mannose, lactose, rhamnose and xylose were evaluated, each in concentrations of 30 g/L. The nitrogen

sources meat peptone, yeast extract, malt extract and potassium nitrate were evaluated in concentrations of 3 g/L. Erlenmeyer flasks (125 ml) each containing 50 mL of culture medium receive fungal inoculum (10⁸ cells/ml) and then kept). The cultures were kept in a static state for 14 days at room temperature and away from light. The cultures were filtered firstly, using Whatman cellulose filter paper and secondly, using 0.22 micrometer Millipore filter membranes. The culture filtrates underwent the Bradford technique [20] to detect proteins and underwent staining tests of *M. tuberculosis* H37Rv as described in section 2.4.

2.9 Analysis of results

The dyes considered promising stained the clinical *M. tuberculosis* H37Rv isolates and showed greatest average bacilli per field when examined by Bascilloscopy.

The staining results obtained with the ZN standard technique were used as a base reference for staining substances being tested.

The average bacilli per field obtained with the selected staining substances and with the ZN standard technique were analyzed with Factor 1 Variance (One-way ANOVA). Bartlett's test was applied to evaluate the normality of the data. The level of significance was $\alpha = 0.05$. All tests were two-tailed. The Turkey range test with a confidence interval of 95% was undertaken. The p values were represented by ***p<0.001; **p <0.01. All analyzes were performed with GraphPadprism 6.0.

3. Results

3.1 Identification of endophytic fungi

Of the 30 pigment producing endophytic fungi, 17 originate from *Himatanthus sucuuba*, 6 from *Copaifera multijuga*, 4 from *Piper aduncum* and 3 from *Senna reticulata*. The identified isolates belong to the Phylum Ascomycota and the genera: *Fusarium* (9), *Aspergillus* (7), *Paecilomyces* (4), *Penicillium* (4), *Trichoderma* (1) and *Oidiodendron* (1) (Tab. 1). Identification code, the plant and plant part from which they were isolated and fungal identification are presented in Tab. 1.

Tab. 1. Identification code of endophytic fungi producing dye, the plant and the plant part from which they were isolated and the fungal identification.

ID CODE	SOURCE		IDENTIFICATION
	PLANT	PLANT PART	
C1	<i>Copaifera multijuga</i>	Stem	<i>Fusarium solani</i>
C2	<i>Copaifera multijuga</i>	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.
C9	<i>Copaifera multijuga</i>	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.
C10	<i>Copaifera multijuga</i>	Twig	<i>Fusarium</i> sp.
C11	<i>Copaifera multijuga</i>	Twig	<i>Paecilomyces</i> sp.
C12	<i>Copaifera multijuga</i>	Twig	<i>Penicillium</i> sp.
15P	<i>Piper aduncum</i>	Leaf	<i>Aspergillus</i> sp.
16P	<i>Piper aduncum</i>	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.
P11	<i>Piper aduncum</i>	Stem	<i>Fusarium</i> sp.
P16	<i>Piper aduncum</i>	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.
S09	<i>Senna reticulata</i>	Leaf	<i>Aspergillus</i> sp.
S15	<i>Senna reticulata</i>	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.
S30	<i>Senna reticulata</i>	Leaf	<i>Penicillium</i> sp.
3H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Leaf	unidentified
5H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Stem	unidentified
7H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	unidentified
8H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Leaf	unidentified
17H	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	<i>Trichoderma</i> sp.
H18	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	<i>Aspergillus</i> sp.
H22	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Stem	<i>Paecilomyces</i> sp.
H22b	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Stem	<i>Aspergillus</i> sp.
H24	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	<i>Oidiodendron</i> sp.
H30	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.
H36	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Stem	<i>Paecilomyces</i> sp.
H37	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	<i>Aspergillus</i> sp.
H54	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Leaf	<i>Fusarium</i> sp.
H59	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	<i>Paecilomyces saturatus</i>

H63	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Leaf	<i>Aspergillus fumigatus</i>
H64	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Twig	<i>Aspergillus</i> sp.
H64B	<i>Himatanthus sucuuba</i>	Leaf	<i>Fusarium solani</i>

ID CODE= Identification code

3.2 Pigments produced from endophytic fungi

Each strain was grown in three different liquid culture media, 90 pigmented culture filtrates were generated, 4 were considered lost due to contamination in the culture medium, (*Aspergillus* sp. H18 – cultivated in PD; SAB; CZ and *Penicillium* sp. C12 – cultivated in PD). Culture filtrates were predominantly yellow (84%) followed by brown (8%) and red (7%). The C11 strain (when grown in PD) showed green pigment, distinct from the other strains as shown in Tab. 2. Fig. 1 illustrates the tones of the coloured substances.

Tab. 2. Colour pigments produced by endophytic fungi and wavelengths corresponding to the liquid culture media used

ISOLATED	POTATO DEXTROSE (PD)	λ_{max} nm	SABORAUD (SAB)	λ_{max} nm	CZAPEK (CZ)	λ_{max} nm
<i>Fusarium solani</i> C1	Red	518	Yellow	341	Yellow	341
<i>Fusarium</i> sp. C2	Yellow	342	Yellow	341	Yellow	341
<i>Fusarium</i> sp. C9	Yellow	341	Yellow	342	Yellow	341
<i>Fusarium</i> sp. C10	Yellow	342	Yellow	342	Yellow	341
<i>Paecilomyces</i> sp. C11	Green	536	Yellow	341	Yellow	342
<i>Penicillium</i> sp. C12	--		Yellow	342	Yellow	342
<i>Aspergillus</i> sp.15P	Yellow	343	Yellow	347	Brown	351
<i>Penicillium</i> sp.16P	Yellow	342	Yellow	341	Yellow	342
<i>Fusarium</i> sp. P11	Yellow	341	Yellow	342	Yellow	342
<i>Fusarium</i> sp. P16	Yellow	341	Yellow	342	Yellow	342
<i>Aspergillus</i> sp.S09	Yellow	342	Yellow	297	Yellow	343
<i>Penicillium</i> sp.S15	Yellow	261	Yellow	272	Yellow	536
<i>Penicillium</i> sp.S30	Yellow	341	Yellow	341	Yellow	341
3H-non-identified	Yellow	343	Brown	341	Yellow	341
5H- non-identified	Yellow	343	Brown	342	Brown	342
7H- non-identified	Yellow	344	Yellow	341	Yellow	342
8H- non-identified	Yellow	235	Yellow	341	Red	344
<i>Trichoderma</i> sp. 17H	Yellow	342	Yellow	342	Yellow	342

<i>Aspergillus</i> sp.H18	--	--	--		
<i>Paecilomyces</i> sp. H22	Yellow	445	Yellow	444	Yellow 343
<i>Aspergillus</i> sp.H22b	Yellow	274	Yellow	347	Red 226
<i>Oidiodendron</i> sp.H24	Brown	353	Yellow	343	Yellow 343
<i>Fusarium</i> sp. H30	Yellow	341	Yellow	344	Red 328
<i>Paecilomyces</i> sp H36	Yellow	341	Yellow	300	Yellow 343
<i>Aspergillus</i> sp.H37	Yellow	342	Yellow	444	Red 354
<i>Fusarium</i> sp. H54	Yellow	342	Yellow	343	Red 344
<i>Paecilomyces saturatus</i> H59	Yellow	341	Yellow	444	Brown 341
<i>Aspergillus fumigatus</i> H63	Yellow	341	Yellow	344	Brown 344
<i>Aspergillus</i> sp. H64	Yellow	--	Yellow	--	Yellow --
<i>Fusarium solani</i> H64B	Yellow	279	Yellow	365	Yellow 341

(--) = Spectrophotometric scanning not undertaken.



Fig. 1. Culture filtrates, left to right: *Trichoderma longibrachiatum* 17H grown in Sabouraud broth; *Paecilomyces* C11 cultivated in Potato Dextrose broth; *Fusarium* H54 grown in Czapek broth; and *Aspergillus* H22B grown in Czapek broth.

3.4. Staining smears from *M. tuberculosis* H37Rv cultures

To assess the ability of culture filtrates to stain mycobacteria, staining tests were performed on smears of *M. tuberculosis* H37Rv grown in a liquid medium. None of the cultures enabled the visualization of AFB smear reading using bright-field microscopy. In

contrast, 28 isolates produced substances that conferred fluorescence to *M. tuberculosis* when observed with

fluorescence microscopy Filters FS02-420 nm, FS06-470 nm and FS15-590 nm as shown in Tab.3.

The bascilloscopic results are presented in Tab. 3 in accordance with WHO classifications [17].

Tab. 3. Bascilloscopy results of *M. tuberculosis* H37Rv, stained with endophytic fungi culture filtrates corresponding with growth media used and type of reading (bright-field and fluorescence microscopy)

ISOLATE	POTATO-DEXTROSE (PD)				SABOURAUD (SAB)				CZAPEK (CZ)			
	Visible	Fluorescence			Visible	Fluorescence			Visible	Fluorescence		
	BF	FS02	FS06	FS15	BF	FS02	FS06	FS15	BF	FS02	FS06	FS15
<i>Fusarium solani</i> C1	neg	2+	3+	2+	neg	neg	neg	2+	neg	1+	2+	2+
<i>Fusarium</i> sp. C2	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	1+	neg
<i>Fusarium</i> sp. C9	neg	1+	2+	1+	neg	1+	2+	1+	neg	neg	2+	neg
<i>Fusarium</i> sp. C10	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Paecilomyces</i> sp. C11	neg	1+	2+	neg	neg	neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Penicillium</i> sp. C12	--	--	--	--	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp.15P	neg	neg	2+	neg	neg	neg	3+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Penicillium</i> sp.16P	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	1+	neg
<i>Fusarium</i> sp. P11	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Fusarium</i> sp. P16	neg	neg	neg	neg	neg	1+	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp. S09	neg	1+	2+	1+	neg	neg	2+	1+	neg	neg	2+	neg
<i>Penicillium</i> sp. S15	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Penicillium</i> sp.S30	neg	2+	2+	1+	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
3H- unidentified	neg	1+	2+	1+	neg	neg	2+	1+	neg	neg	2+	1+
5H- unidentified	neg	neg	1+	neg	neg	neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg
7H- unidentified	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8H- unidentified	neg	neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	2+
<i>Trichoderma</i> sp. 17H	neg	1+	2+	neg	neg	1+	1+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp. H18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Paecilomyces</i> sp. H22	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	1+	neg
<i>Aspergillus</i> sp. H22b	neg	neg	1+	neg	neg	1+	1+	1+	neg	neg	1+	neg
<i>Oidiodendron</i> sp. H24	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg	neg	neg	2+	neg
<i>Fusarium</i> sp. H30	--	--	--	--	neg	1+	2+	2+	neg	neg	2+	2+
<i>Paecilomyces</i> sp. H36	neg	1+	2+	1+	neg	neg	1+	neg	neg	neg	2+	neg

<i>Aspergillus</i> sp. H37	neg	neg	1+	neg	neg	1+	2+	1+	neg	neg	neg	neg
<i>Fusarium</i> sp. H54	--	--	--	--	--	--	--	--	neg	neg	1+	neg
<i>Paecilomyces saturatus</i> H59	neg	1+	3+	1+	neg	neg	2+	neg	neg	neg	neg	neg
<i>Aspergillus fumigatus</i> H63	neg	neg	neg	neg	neg	1+	3+	2+	neg	neg	2+	neg
<i>Aspergillus</i> sp. H64	neg											
<i>Fusarium solani</i> H64B	neg	neg	2+	neg	neg	neg	3+	neg	--	--	--	--

BF = bright-field– traditionalreading

FS02; FS06; FS15 = Filtersfor readingfluorescence

neg = negative (nobacillifound)

(--) = Bacteriologicalreading not done

Negative control = clinicalstrain smear– *M. tuberculosis* H37Rv washedin running water.

Positive control = clinicalstrain smear – *M. tuberculosis* H37Rv stained byZiehlNeelsen-smear-positive 3+.

As the data demonstrate in Tab.3 , the culture filtrates *Fusarium solani* C1(PD), *Aspergillus* 15P(SAB); *Paecilomyces saturatus* H59(PD), *Aspergillus fumigatus* H63(SAB) and *Fusarium solani* H64B(SAB), showed the best ability to colour *M. tuberculosis* as they enabled positive smear readings equal to the smear 3+ of the positive control slides. The bacilloscopy results of 2+ and 3+ were more frequent (25%) in colourations made with the fungal filtrates grown in Sabouraud broth. Of the filters used in fluorescence readings, the FS06-470 nm (green) filter allowed better visualization and greater quantification of bacilli.

Fig. 2 illustrates the Colony Forming Units (CFU) of *M. tuberculosis* H37Rv grown in a liquid medium, stained by *Fusarium solani* C1 culture filtrate (PD) and observed with a fluorescence microscope, using filter FS06.



Fig. 2. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv grown in liquid medium, stained by *Fusarium solani* C1 culture filtrate and observed with a fluorescence microscope - Filter FS06, magnified 100x.

Source: Laboratório de Micobacteriologia/CSAS/INPA.

Considering only the results of bacilloscopy 3+, a quantitative analysis was performed, analyzing the potential of *Fusarium solani* C1 (PD), *Aspergillus* 15P (SAB); *Paecilomyces saturatus* H59 (PD), *Aspergillus fumigatus* H63 (SAB) and *Fusarium solani* H64B (SAB) to stain *M. tuberculosis*. Fig. 3 shows mycobacterial smear readings of control slides stained by the ZN method and slides stained by the selected culture filtrates. All tests were quintuplicated.

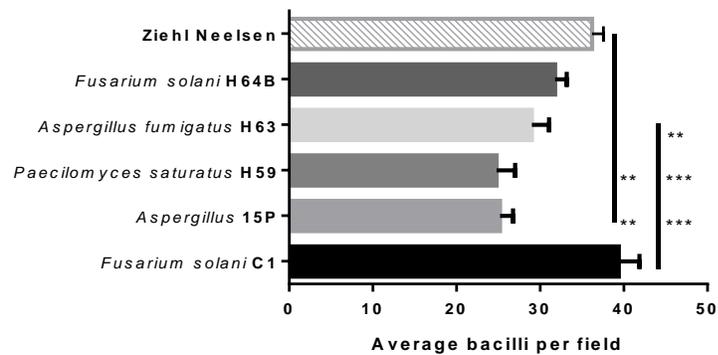


Fig. 3. Average bacilli per field, counted after staining with selected

culture filtrates and the Ziehl Neelsen method.

This test showed while comparing mycobacteria smear readings coloured by the ZN method and mycobacteria smear readings coloured by selected filtrates, the culture filtrate *Fusariumsolani* C01 (PD) resulted in bacteriological readings significantly superior compared to *Aspergillus* P15 ($p = 0.0003$); *Paecilomyces saturatus* H59 ($p = 0.0002$) and *Aspergillus fumigatus* H63 ($p = 0.0082$).

There was no significant difference observed between the mycobacteria smear readings coloured by the ZN method and mycobacteria smear readings coloured by *Fusarium solani* C01 (PD) and *Fusarium solani* H64B (SAB).

The culture filtrates *Aspergillus fumigatus* H63 (SAB) and *Fusarium solani* H64B (SAB) showed 29 and 32 bacilli/field respectively. The culture filtrates *Aspergillus* P15 (SAB) and *Paecilomycessaturatus* H59 (PD) had the lowest values averaging 25 bacilli/field.

3.5 Staining Tests with other microorganisms

Staining tests were undertaken with 3+ selected culture filtrates on *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida albicans* ATCC 36232 smears resulting in visualization by fluorescence microscopy of the CFU microorganisms as shown in Fig. 4.

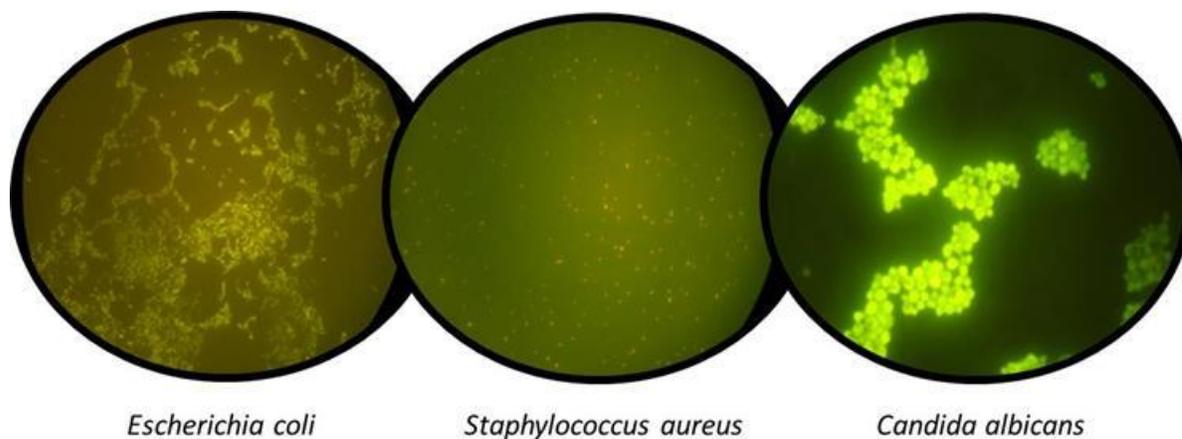


Fig. 4. *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; and *Candida albicans* ATCC3623 stained by *Aspergillus* P15 observed with a fluorescence microscope - Filter FS06, magnified 100x.

Source: Laboratory of Mycobacteriology/CSAS/INPA.

3.6 Chemical characterization of fluorescent substances

The separation of the fluorescent substance from the culture filtrate *Fusarium solani* C1 (PD) had Rf 0.75. The substance stained *M. tuberculosis* H37Rv, confirming the isolation of the respective culture filtrate. The Bradford method was used for protein detection, and the Coomassie blue G-250 dye reacted with the basic or aromatic side chains of the fluorescent substance. Analysis in the mass spectrometer showed 5 main peaks, the predominant peak being 2465.125 g/mol. This information suggests that the fluorescent substances are peptides/proteins.

3.6 Influence of carbon and nitrogen sources on the production of fluorescent substances

The Tab. 4 evaluates the influence of carbon and nitrogen sources in protein concentration and staining ability of *Fusarium solani* C1 culture filtrates on *M.*

tuberculosis H37Rv. The carbon sources that stood out in this trial were mannose, rhamnose and the nitrogen source that stood out was the peptone. As expected, there was a positive correlation ($R^2=0.81$) between the concentration of extracellular proteins produced by *Fusarium solani* C1 and the capacity of culture filtrate *Fusarium solani* C1 to stain bacilli units of *M.tuberculosis* H37Rv.

Tab. 4. Effect of carbon and nitrogen sources in protein concentration and the staining ability of *Fusarium solani* C1 culture filtrate on *M. tuberculosis* H37Rv.

Carbon sources	Extracelular protein (mg/L)	Bacilli per field	Nitrogen sources	Proteína Extracelular protein (mg/L)	Bacilli per field
Glucose	222±5	36 ±9	KNO₃	158±3	26± 1
Rhamnose	283±4	56 ±7	NaNO₃	195±4	21 ±2
Sucrose	124±3	20 ±9	Malt	155±5	14 ±2
Mannose	270±4	52 ±3	Yeast Ext.	170±4	26 ±1
Xylose	224±5	37 ±6	Peptone	207±3	44 ±4

4. Discussion

The identification of endophytic fungi corroborated with literature on the same genus level, confirming that fungi such as *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, that have been cited in other studies, show the ability to produce pigments and are considered potential producers of dyes due to their ability to produce a variety of colours that have high chemical stability [7;22;23;24;25;26].

In this study, the endophytic fungi produced dyes: *Fusarium* sp. (Yellow), *Aspergillus* sp. (yellow, brown, red), *Paecilomyces* sp. (Yellow, Green), *Penicillium* sp. (Yellow), *Trichoderma* sp. (Yellow) and *Oidiodendron* sp. (Yellow, Brown). In the

literature, yellow coloured pigments produced by fungi have been classified as ankaflavina and monascina, and red coloured pigments as rubropunctamina and monascorubramina [27;28]. According to Pastre et al. [29] and Mapari et al. [24], most of these pigments are part of two chemical groups, carotenoids and polyketides, and within the latter quinones (anthraquinones, naphthoquinones and hidroxiantraquinonas), flavonoids, melanins and azafilonas [22;24].

Fungi of the same genus as those studied in this research, which produce different pigments, are often cited in the literature as microorganisms of biotechnological interest. The endophytic fungus *Penicillium purpurogenum* produces a strong red pigment that has potential for the food industry [6]. The species *Fusarium verticillioides* was cited by Boonyapranai et al. [30] as producing a purple pigment rich in naphthoquinona and the organic compound has been explored for its antimicrobial activity. Other *Fusarium* species were cited for their production of fusarisetina A and azafilona fusarona pigments [31]. *Trichoderma* species live in soil and are able to produce different coloured pigments, varying from yellow-green to red, and the antifungal ability of the metabolite provides biotechnological interest [26].

Concerning the use of the pigments produced by endophytic fungi as a tool in the diagnosis of tuberculosis, none of the *M. tuberculosis* H37Rv appeared coloured when observed under the bright-field microscope. This means that the pigments have no affinity for the cellular structures of the bacillus or, that these substances did not have access to other cellular structures due to the activity of the *M. tuberculosis* structures.

In the production of fluorescent substances, 65 (78%) of the culture filtrates gave fluorescent yellowish-green stain to *M. tuberculosis* H37Rv when observed with a

fluorescence microscope equipped with filter FS06, excitation BP 436/10, beam filter FT 460, and emission LP 470. It is concluded that the endophytic fungi evaluated in this study are producers of fluorescent substances with an affinity to mycobacteria. These substances are potentially interacting chemically with the mycolic acids, given that, according to Laifangbam et al. [32], mycolic acid is the component of the bacterial cell where it binds to Auramine O, the standard fluorescent dye used in the diagnosis of tuberculosis.

Reports of fluorescent pigments produced by fungi have been cited in the literature. Mayser et al. [33] isolated a greenish-yellow bisindolyl fluorochrome compound produced by the yeast *Malassezia furfur* (CBS1878). In the study by Hsu et al. [34], the authors obtained a yellow fluorescent pigment of the azofilonas group called monapilol, produced by a fungus of the genus *Monascus*.

M. tuberculosis H37Rv smears stained by the culture filtrates, *Fusarium solani*C01; *Aspergillus* P15; *Paecilomyces satuaratus* H59, *Aspergillus fumigatus* H63 and *Fusarium solani* H64B were observed as yellowish-green on all components that were present in the smears including cells and other bacteria. Thus, we can consider that the fluorescent substances present in the culture filtrates interact with multiple targets simultaneously.

As the fluorescent substances evaluated in this study were characterized as proteins, it is important to consider that the findings of fluorescent proteins, especially green proteins, have been instrumental in furthering biomedical research [35;36;37]. In diagnostic medicine, these proteins bind to targets of interest allowing for the monitoring of cells, tissues and protein interactions [38].

References

- [1] Chast F. Les colorants, outils indispensables de la Révolution biologique et thérapeutique du XIXe siècle. *Revue d'histoire de la pharmacie* 2005; 93: 487-504.
- [2] WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Control - WHO Report 2011. Available at: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Accessed: March 22, 2012.
- [3] BRASIL. Ministério da Saúde. Situação da Tuberculose no Brasil. Dia mundial de mobilização contra a Tuberculose. Secretaria de Vigilância em Saúde. Apresentação em PowerPoint. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- [4] BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- [5] Merck. Fichas de Datos de Seguridad – conforme a la Directiva 91/155/CEE de la Comisión, 16/01/2006. Available at: <<http://www.chemdat.info>>. Accessed: May 5, 2012.
- [6] Qiu M, Ruisheng X, Shi Y, Chen H. Isolation and Identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 993-8.
- [7] Visalakchi S, Muthumary J. Antimicrobial activity of the new endophytic *Monodictys castaneae* SVJM139 pigment and its optimization. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (1): 38-44.
- [8] Ferrara MA. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias Bioativas. *Revista Fitos* 2006; 02 (01): 73-9.
- [9] Joseph B, Priya RM. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical Effect: A Review. *American Journal of biotechnology and molecular biology* 2011; 1 (3): 291-309.
- [10] Lima AM, Salem JI, Souza JVB, Cortez ACA, Carvalho CM, Chaves FC, Veiga Junior VF. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electronic Journal of Biotechnology* 2011; 14 (4): 1-6.
- [11] Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araujo JM. Production and characterization of a thermos table -amylase from *Nocardiosis* sp. endophyte of

- yam bean. *Bioresource Technology* 2001; 76: 137-141.
- [12] Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araujo JM. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology* 2002; 83: 105-109.
- [13] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 2003; 5: 535-544.
- [14] Suto M, Takebayashi M, Salto K, Tanaka M, Yokota A, Tomita F. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002; 93 (1): 88-90.
- [15] Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4rd ed. APS Press, Minnesota, 1998.
- [16] Waite TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 1990.
- [17] BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool - Base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
- [18] WHO - World Health Organization. *Laboratory Services in Tuberculosis Control. Part II Microscopy* 1998.
- [19] ZEISS. Filter Assistant. Available at: <https://www.micro-shop.zeiss.com/>. Accessed: February 26, 2012.
- [20] Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72: 248-254.
- [21] Remião JOR, Siqueira AJS, Azevedo AMP. *Bioquímica: guia de aulas práticas*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 87p..
- [22] Mapari SAS, Nielsen KF, Larsen TO, Jens CF, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Food biotechnology* 2005; 16: 231-238.
- [23] Mapari SAS , Meyer AS, Thrane ULF. Photostability of Natural Orange-Red and Yellow Fungal Pigments in Liquid Food Model Systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2009; 57: 6253–6261.

- [24] Mapari SAS, Thrane ULF, Meyer AS. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? Trends in Biotechnology 2010; 28 (6): 300-7.
- [25] Méndez A, Pérez C, Montañéz J, Martínez G, Aguilar C. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. Journal of Zhejiang University SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology) 2011, 12(12): 961-8.
- [26] Schuster A, Schomoll M. Biology and biotechnology of Trichoderma. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 87: 787–799.
- [27] Hamano PS, Kilikian BV. Production of red pigments by *Monascus Ruber* in culture media containing corn steep liquor. Brazilian J. of Chemical Engineering 2006; 23 (04): 443 - 449.
- [28] Kongruang J. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. J Ind Microbiol Biotechnol 2011; 38: 93–99.
- [29] Pastre, R; MARINHO, A; RODRIGUES-FILHO, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. Química Nova 2007; 30 (8): 1867-1871.
- [30] Boonyapranai K, Tungpradit R, Lhieochaiphant S, Phutrakul S. Optimization of Submerged Culture for the Production of Naphthoquinones Pigment by *Fusarium verticillioides*. Chiang Mai J. Sci 2008; 35(3): 457-466.
- [31] Yang SX, Gao JM, Hartmut L, Tian JM, Gennaro P. Absolute Configuration of Fusarone, A New Azaphilone from the Endophytic Fungus *Fusarium* sp. Isolated from *Melia azedarach*, and of Related Azaphilones. Chirality 2012; 24: 621-7.
- [32] Laifangbam S, Singh HL, Singh NB, Devi KM, Singh NT. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Kathmandu University Medical Journal 2009; 7 (3): 226-230.
- [33] Mayser P, Stapelkamp H, Hans-Joachim K, Podobinska M, Wallbott W, Irlinger B, Steglich W. Pityrialactone- a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. Antonie van Leeuwenhoek 2003; 84: 185–191.
- [34] Hsu YM, Hsu YC, Liang YH, Kuo YH, Pan TM, Jalmi P, Bodke P, Wahidullah S, Raghukumar S. New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-Fermented *Dioscorea* The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2011; 28 (2): 505-512.

- [35] Kendall J, Badminton M. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Tibtech* 1998; 16: 216-224.
- [36] Griesbeck o. Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Current Opinion in Neurobiology* 2004; 14: 636–641.
- [37] Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi T, Shimogori T, Miyawaki A. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle. *Cell* 2013; 153: 1602–1611.
- [38] Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov SA. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imagen. *Trends in Biotechnology* 2005; .23 (12): 605-613.