

Seleção e produção de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da amazônia para o uso em odontologia**Selection and production of exo and/or polysaccharides of microbial origin from the amazon for use in dentistry**

DOI:10.34117/bjdv6n9-743

Recebimento dos originais: 30/08/2020

Aceitação para publicação: 30/09/2020

Rachid Pinto Zacarias FilhoDoutorando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
BIONORTEInstituição: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas -UFAM
Endereço: Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 1200, Campus da UFAM, Coroado I,
Manaus -AM, Brasil
E-mail: rachidfilho@hotmail.com**Afonso Duarte Leão de Souza**

Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Curso de Química da Universidade Federal do Amazonas-UFAM
Endereço: Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, Campus da UFAM, Coroado I,
Manaus -AM, Brasil
E-mail: souzadq@ufam.edu.br**Simone Assayag Hanan**Doutora em Odontopediatria pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho /
Faculdade de Odontologia de AraraquaraInstituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM
Endereço: Av. Ministro Waldemar Pedrosa, 1539 -Praça 14 de Janeiro, Manaus -AM, Brasil
E-mail: simonehanan@yahoo.com.br**Antonia Queiroz Lima de Souza**

Doutora em Genética e Evolução pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE -
UFAMEndereço: Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 1200, Campus da UFAM, Coroado I,
Manaus -AM, Brasil
E-mail: antoniaqlsouza@gmail.com**RESUMO**

Nos últimos anos, vem sendo dada importância aos metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos, em razão de suas diferentes aplicações biotecnológicas. Dentre os polissacarídeos microbianos, destacam-se os exopolissacarídeos, por serem biocompatíveis e muitos apresentarem atividade antibiótica. Com o objetivo de produzir um cimento experimental a partir de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia para o uso em Odontologia e avaliar a atividade antimicrobiana de seus extratos frente aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *C. tropicalis*, foram selecionadas e cultivadas 21 linhagens de fungos endofíticos e aquáticos, dos gêneros *Trichoderma*,

Colletotrichum, *Aspergillus*, *Paecilomices*, *Xylaria*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis*, em meio de cultura batata-dextrose, acrescido de 0,2% de extrato de levedura, a $24 \pm 1^\circ \text{C}$ por 21 a 28 dias. O micélio foi separado por filtração a vácuo e os constituintes fixos extracelulares (meio de cultura fermentado) e intracelulares (micélio) foram extraídos com metanol sob refrigeração a 4°C . Os ensaios para determinação da atividade antimicrobiana foram realizados em placas de ELISA de 96 poços. As amostras foram divididas em 6 grupos: GC - cimento de agregado trióxido mineral branco (MTA) Angelus® e G2 a G6 - parte do pó de MTA foi substituído, em diferentes concentrações (5%, 10%, 15%, 20%, 25%), pela fração extraída do cultivo do fungo endofítico *P. microspora*. O gênero *Pestalotiopsis* mostrou-se mais efetivo nos testes antimicrobianos, especificamente o *P. microspora*, com a concentração inibitória mínima de 0,125 para *E. faecalis*, 0,25 para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e 0,5 para *C. tropicalis*. Na avaliação da atividade antimicrobiana do cimento experimental, houve atividade para o *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* nos grupos GC, G5 (MTA + 20%) e G6 (MTA + 25%). O G6 apresentou os maiores valores e não houve diferença significativa entre os grupos de *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*. A adição do extrato de polissacarídeos intracelulares do *P. microspora* melhorou a atividade antimicrobiana do MTA, constituindo-se em uma alternativa promissora para o uso odontológico.

Palavras-chave: endófitos, polissacarídeos fúngicos, MTA, biomateriais, odontologia.

ABSTRACT

In recent years, importance has been given to metabolites produced by endophytic microorganisms, due to their different biotechnological applications. Among the microbial polysaccharides, the exopolysaccharides stand out, as they are biocompatible and many have antibiotic activity. In order to produce an experimental cement from exo and/or polysaccharides of microbial origin from the Amazon for use in Dentistry and to evaluate the antimicrobial activity of its extracts against the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* and *C. tropicalis*, 21 strains of endophytic and aquatic fungi, of the genera *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Paecilomices*, *Xylaria*, *Phomopsis* and *Pestalotiopsis*, were selected and cultivated in a potato-dextrose culture, plus 0.2% of extract yeast, at $24 \pm 1^\circ \text{C}$ for 21 to 28 days. The mycelium was separated by vacuum filtration and the fixed extracellular (fermented culture medium) and intracellular (mycelium) constituents were extracted with methanol under refrigeration at 4°C . Assays for determining antimicrobial activity were performed on 96-well ELISA plates. The samples were divided into 6 groups: GC - white mineral trioxide aggregate cement (MTA) Angelus® and G2 to G6 - part of the MTA powder was replaced, in different concentrations (5%, 10%, 15%, 20%, 25%), by the fraction extracted from the cultivation of the endophytic fungus *P. microspora*. The genus *Pestalotiopsis* proved to be more effective in antimicrobial tests, specifically *P. microspora*, with a minimum inhibitory concentration of 0.125 for *E. faecalis*, 0.25 for *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* and 0.5 for *C. tropicalis*. In the evaluation of the antimicrobial activity of the experimental cement, there was activity for *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* in the groups GC, G5 (MTA + 20%) and G6 (MTA + 25%). G6 had the highest values and there was no significant difference between the groups of *E. coli*, *S. aureus* and *E. faecalis*. The addition of intracellular polysaccharide extract from *P. microspora* improved the antimicrobial activity of MTA, constituting a promising alternative for dental use.

Keywords: endophytes, fungal polysaccharides, MTA, biomaterials, dentistry.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial principalmente, na floresta Amazônica, a maior floresta tropical úmida do planeta e fonte inestimável de matérias primas para os mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus organismos e suas interações com outros seres (Souza et al., 2004).

Nos últimos anos, uma importância maior vem sendo dada aos microrganismos associados às plantas, principalmente os endófitos, como fungos e bactérias. Embora tenham sido investigados a partir do século passado, estes microrganismos só receberam uma maior atenção há pouco mais de vinte anos, quando verificou-se que eles podem desempenhar funções importantes no processo de adaptação da planta, na proteção do hospedeiro contra herbívoros e patógenos, além de produzir uma infinidade de metabólitos de interesse econômico, tanto primários quanto secundários, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos e outros) (Teiten et al., 2013; Mapperson et al., 2014).

Fungos endofíticos são micro-organismos que vivem nos espaços intra e intercelulares dos tecidos vegetais sem causar efeitos adversos aparentes à planta hospedeira. Podem estar em interações variadas com seus hospedeiros, e podem afetar significativamente diferentes graus de desempenho dos mesmos. Em alguns casos, podem aumentar a capacidade das plantas de tolerar estresses abióticos e bióticos (Pamphile et al., 2017).

O potencial biotecnológico de fungos endofíticos é enfatizado pela quantidade de investigações científicas nesta área, mostrando que esses microrganismos podem produzir um número muito grande de compostos, muitos dos quais têm atividades biológicas de interesse (Rajamanikyam et al., 2017). Dentre as biomoléculas secretadas pelos fungos endofíticos, destacam-se os polissacarídeos. A classificação dessas macromoléculas se dá conforme sua localização no organismo produtor, em polissacarídeos citosólicos (fontes de carbono e energia para a célula), polissacarídeos de parede celular, ligados ou não a proteínas, e polissacarídeos secretados para o meio extracelular, formando cápsulas ou biofilme, denominados exopolissacarídeos (EPS). Em destaque, os exopolissacarídeos produzidos por bactérias e fungos têm sido amplamente aplicados nas indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outras (Osemwegie, 2020).

Desta forma, tornam-se cada vez mais necessárias pesquisas científicas que contribuam para a elucidação de novos compostos fúngicos que tenham potenciais aplicações na indústria farmacêutica, tendo em vista que tais micro-organismos compreendem uma enorme diversidade de espécies, e a sua aplicação é mais vantajosa já que os processos operacionais são relativamente mais

simples. Em comparação com as plantas, os fungos possuem crescimento mais rápido, em menor tempo e ocupam menor espaço, além de ter um menor custo (Specian et al., 2014).

A perda dentária decorrente de comunicações do tecido pulpar com o periodonto, resultante de processos patológicos advindos de lesões cáries profundas, de mecanismos iatrogênicos durante as manobras da terapia endodôntica ou, ainda, de procedimentos restauradores protéticos, pode ser evitada por meio de materiais obturadores, que tenham como características serem reparadores, seladores, inertes, biocompatíveis, radiopacos e apresentem boa aderência à dentina. Dentre os materiais odontológicos, o que vem sendo largamente utilizado para o vedamento de tais perfurações dentais é o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), mas apesar de apresentar boas características, já relatadas na literatura, apresenta um custo elevado (Katsamakidis et al., 2013; Siew et al., 2015). Considerando a necessidade de um produto que atenda os requisitos necessários para utilização na reparação de perfurações endo-periodontais, bem como o vasto campo de materiais, que podem ser obtidos à base de exopolissacarídeos e/ou polissacarídeos de origem microbiana, faz-se necessária a busca de um material com a finalidade de selar tais perfurações, com propriedades semelhantes às aquelas disponíveis comercialmente para o uso odontológico, entretanto com menor custo, com igual ou superior qualidade e que portanto possa beneficiar os pacientes em geral.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi produzir um cimento experimental a partir de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia para o uso em Odontologia, bem como avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a microrganismos patógenos da cavidade oral.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DE LINHAGENS FÚNGICAS

Neste estudo, foram utilizadas 21 linhagens cujos aspectos morfológicos indicavam pertencerem aos gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Xylaria*, *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* (Tabela 1). As cepas dos fungos endofíticos e aquáticos utilizadas foram reativadas das coleções do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LaBMicra/UFAM), da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas e do Laboratório de Genética Aplicada à Saúde e à Biotecnologia, da Universidade do Estado do Amazonas. Todos os 21 gêneros de linhagens endofíticas e aquáticas foram cultivados em triplicata e tiveram seu gênero confirmado pela caracterização taxonômica por meio das análises de suas estruturas macro e micromorfológicas.

Tabela 1

Linhagens de fungos endofíticos e aquáticos selecionadas para o estudo		
Nº	Identificação coleção	Origem
264	1341	Endofítico
320	EjF1 2.2A	Endofítico
764	Me Fe 1.3	Endofítico
461	F40a	Endofítico
455	GhCg2 1.2	Endofítico
882	2.3 ISP2 T+I L1P3 COA18	Aquático
340	EJFlor 2 1.2A	Endofítico
84	Ansp Cg 1.1.3a	Endofítico
902	1.2 BDA A+TL2P1 COA26	Aquático
265	1598e	Endofítico
406	GhF1 1.2b	Endofítico
88	VrC 2.1.3 ISP2	Endofítico
334	EJFlor 2 1.2B	Endofítico
869	AJP 1.2.2 (1)	Endofítico
267	1334	Endofítico
590	Dfga 212 I+AT	Endofítico
341	EjC2 1.1B - F2	Endofítico
342	EjC2 1.1A - F1	Endofítico
345	EjC2 1.1A - F1B	Endofítico
314	EjC11.2-F1 BDA	Endofítico
325	EjC32.1B-F1	Endofítico

2.2 CULTIVO FÚNGICO

Para cada gênero, foram preparados 4 frascos de Erlenmeyers de 1L e preenchidos com 300 mL de meio de cultura BDA + L, sendo uma triplicata e um controle (meio de cultura sem inóculo). Todos os frascos contendo o meio foram autoclavados a 121°C e 1 atm, durante 15 minutos.

Uma placa de Petri, contendo cultura fúngica pura, foi dividida em 8 partes iguais e inoculada em um Erlenmeyer com meio BDL estéril, na proporção de 1 parte para cada 100 mL de meio, ou seja, cada frasco contendo 300 mL recebeu três partes do meio com fungo.

Os frascos foram acondicionados em armários, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, mantidos em modo estático durante a fase de crescimento fúngico. As amostras foram retiradas de acordo com o desenvolvimento fisiológico de cada microrganismo, variando de 21 a 28 dias, para que fossem retirados durante a fase estacionária de crescimento e se evitasse a fase de catálise.

2.3 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS FÚNGICOS

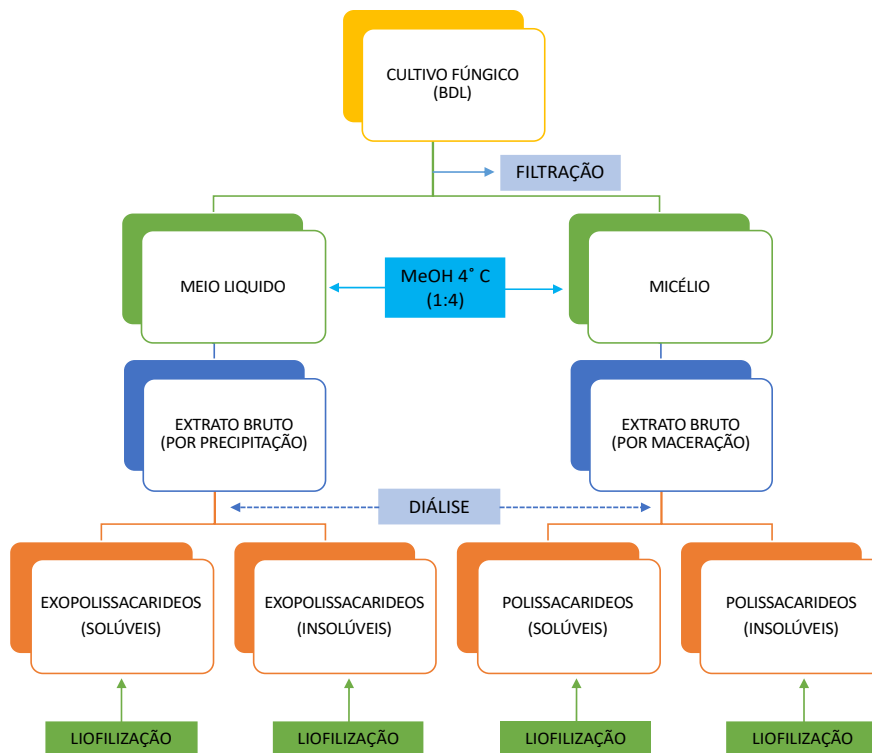
Decorrido o tempo necessário para o crescimento em meio líquido (BDL), o micélio foi separado por filtração a vácuo usando-se papel Whatman® n°4 (Sigma-Aldrich Co., Missouri - EUA) em conjunto com funil de Büchner (Indústria de Porcelana Técnica Chiarotti Ltda, Mauá - SP) e Kitassato (Laborglas, São Paulo - SP), em cabine de segurança biológica.

O caldo do cultivo de cada triplicata foi transferido para frascos âmbar estéreis e adicionado metanol resfriado a 4° C na proporção de 1:4 (v/v), sendo em seguida, mantido por 48h sob refrigeração, para precipitação dos exopolissacarídeos (EPS).

Ao micélio resultante da filtração que ficou no Erlenmeyer, foi adicionado metanol até cobri-lo, sendo deixado para macerar por um período de 48 h em temperatura ambiente. Posteriormente, foi filtrado a vácuo e guardado em frascos estéreis. Após a primeira filtração do macerado do micélio, foi adicionado mais metanol ao Erlenmeyer e repetida a filtração após 24h. Ao final, os filtrados correspondentes a cada fungo foram reunidos em um único frasco, sendo adicionado metanol na proporção de 1:4 (meio líquido/metanol) e armazenado sob refrigeração. Em todos os meios de cultura, procedeu-se o mesmo protocolo.

Em seguida, foram acondicionados em frascos plásticos estéreis e centrifugados a 12.000 rotações por 10 minutos. Após cada centrifugação, os frascos foram levados à cabine de segurança biológica, para filtração a vácuo, utilizando o sistema de membrana de polietersulfônica (PES), com tamanho de poro de 0,22 µm, a fim de separar os paletes (parte insolúvel) do sobrenadante. Cada sobrenadante foi recentrifugado por duas a três vezes e novamente filtrado. As partes solúvel e insolúvel resultantes foram separadas e congeladas para ensaios posteriores (Figura 1).

Figura 1: Protocolo de extração dos exo e polissacarídeos.



Os extratos restantes foram submetidos a rotaevaporador, com pressão reduzida, à temperatura de 40°C e permaneceram em um dessecador até a completa eliminação do solvente. Em seguida, foram pesados e armazenados a - 4°C para a realização dos testes antimicrobianos.

3 ENSAIOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

3.1 REATIVAÇÃO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS TESTE

Os microrganismos testados foram cepas adquiridas da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Staphylococcus aureus* (S007), *Escherichia coli* (E004), *Pseudomonas aeruginosa* (P004), *Enterococcus faecalis* (E002), *Candida albicans* (CC001) e *Candida tropicalis* (CC002). As bactérias foram reativadas em Brain Heart Infusion (BHI) Ágar (HIMEDIA®) e as leveduras em Sabouraud (SB) Ágar (HIMEDIA®), mantidas a 30 °C por 24 h e 48 h, respectivamente.

Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo BHI para bactérias e caldo SB para levedura; ambos foram mantidos a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo as bactérias por 24 h e as leveduras por 48 h. A concentração de colônias utilizada no teste foi correspondente a 10^7 UFC.mL⁻¹ para bactérias e 2×10^5 UFC.mL⁻¹ para leveduras, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003).

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram pesadas e solubilizadas na concentração de 2 mg/mL (solução-mãe) em dimetilsufóxido (DMSO) 10 % + água destilada autoclavada 90 %.

3.3 PREPARO DOS CONTROLES

O controle negativo foi realizado com a mesma solução, na qual as amostras foram solubilizadas, DMSO 10 %. O controle positivo foi realizado com tetraciclina 2 mg/mL para *E. coli* e *P. aeruginosa*; ampicilina 2 mg/mL para *S. aureus* e *E. feacalis*; e fluconazol 2 mg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

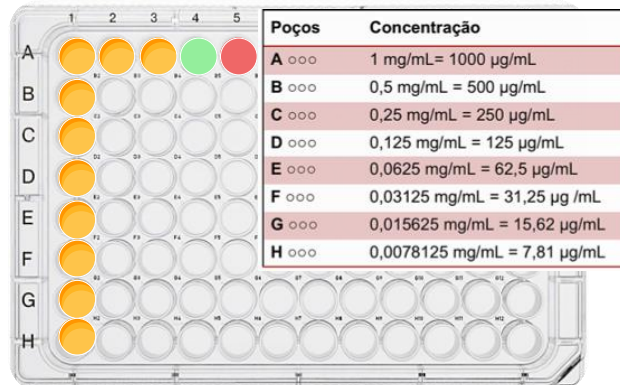
3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA – ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO

Realizou-se uma triagem (*screening*) das amostras, para determinação da atividade antimicrobiana em placas de Elisa (96 poços). Foram adicionados em triplicata, 100 µL do meio de cultura com concentração dobrada (2X), 100 µL da solução-mãe da amostra preparada (2 mg/mL) e 10 µL da suspensão de células do patógeno testado, de acordo com a metodologia descrita por Souza (2006). Por fim, as placas de Elisa ficaram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 h.

Após 24 h, colocou-se 10 µL do revelador TTC (2,3,5 - cloreto de 2,3,5 -trifeniltetrazólio) a 2% nos poços com inóculo bacteriano. Havendo crescimento microbiano, o revelador muda a cor da solução, a qual torna-se vermelha.

Com os resultados positivos do *screening*, realizou-se o teste de diluições sucessivas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Na placa de Elisa, adicionou-se 100 µL da amostra nos primeiros poços em triplicata (A1, A2, A3) e 100 µL do meio de cultura 2x. O primeiro poço foi homogeneizado com a própria pipeta; deste retirou-se 100 µL e inseriu-se no poço seguinte (B1, B2, B3), realizando-se sucessivamente as diluições em cada poço. Para os controles positivo e negativo, realizou-se o mesmo procedimento de diluição (Figura 2).

Figura 2: Esquema das concentrações das diluições sucessivas nos poços



Fonte: SOUZA (2006)

Acrescentou-se em todos os poços 10 µL do patógeno nas concentrações de células citadas no item 1. O experimento foi incubado a 36 ± 1 °C por 24 h. Em seguida, foi adicionado 10 µL do revelador NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1% nos poços com inóculo leveduriforme e 10 µL de revelador TTC (2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) a 1 % nos poços com inóculo bacteriano. A leitura foi realizada visualmente, observando-se a alteração de cor proporcionada pela solução. Quando houve crescimento microbiano, o revelador NBT mudou a cor da solução para azul escuro e o TTC para a cor vermelha.

Como contra-prova, plaqueou-se 10 µL do experimento em meio sólido, somente para aqueles que mostraram ausência de crescimento microbiano.

4 PERFIL QUÍMICO E METABÓLICO DO *P. microspora*

Com base nos resultados de atividade biológica, foi realizada a avaliação do perfil químico *P. microspora*. Inóculos com 20 µL da suspensão de conídios na concentração de 15×10^8 cels/mL⁻¹ (McFarland 5) foram aplicados em 21 erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio BDL. Em seguida, os frascos foram acondicionados em armários, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, e mantidos em modo estático durante a fase de crescimento fúngico.

A cada cinco dias, do 5° ao 30° dia, foram retiradas as triplicatas correspondentes, os meios cultivados foram filtrados como descrito anteriormente e os micélios secos e pesados. Ao meio líquido cultivado, foi adicionado MeOH, rotaevaporado, seco e pesado.

Durante esse período, todas as amostras do meio cultivado foram avaliadas quanto à concentração de açúcar e pH. Esses parâmetros foram utilizados para avaliar as etapas de crescimento da linhagem e produção de metabólitos secundários, em comparação à produção micelial.

Para a análise dos extratos por espectrometria de massas, cada amostra foi solubilizada em MeOH na concentração de 1,0 mg/mL⁻¹ (solução-mãe), e dessa solução 20 µL foram diluídos em 1,0

mL de MeOH (solução de análise). Foi utilizado espectrômetro tipo *Ion-trap*, modelo LCQ fleet (Thermo Scientific), com *scan* de 100 a 500 m/z em modo positivo.

5 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA DO CIMENTO EXPERIMENTAL

Para o preparo do cimento experimental, foi utilizado o cimento Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco 1g (Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina - PR). A composição do MTA Branco e a função de cada componente estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2
Agregado de Trióxido Mineral - MTA Branco – Composição e Função

COMPONENTE	FÓRMULA QUÍMICA	FUNÇÃO
Silicato Tricálcico	3CaO.SiO ₂	Resistência inicial e presa
Silicato Dicálcico	2CaO.SiO ₂	Resistência tardia
Aluminato Tricálcico	3CaO.Al ₂ O ₂	Resistência inicial e presa
Cal livre	CaO	Expansão e liberação de íons Ca ⁺
Óxido de bismuto	Bi ₂ O ₃	Radiopacidade

Fonte: Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos Ltda.

A proporção recomendada pelo fabricante para a manipulação do material é de uma gota para uma colher-medida de pó. Com vistas à padronização do peso e volume, inicialmente foram aferidas as quantidades de pó e líquido, e obtivemos o resultado aproximado: 1 colher-medida contém 150 mg e uma gota, 50 µL.

Foram confeccionados 6 grupos de corpos de prova. No grupo 1 (Grupo Controle - GC), o MTA foi manipulado segundo a recomendação do fabricante, na proporção de 1:1 (150 mg de pó com 50 µL de água destilada estéril).

Nos grupos 2 a 6, parte do pó de MTA foi substituído em diferentes concentrações (G2 - 5%, G3 - 10%, G4 - 15%, G5 - 20% e G6 - 25%), pela fração extraída do cultivo do fungo *Pestalotiopsis microspora* (*Pm*), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3
Materiais e composição dos corpos de prova.

Grupos	Composição	Quantidade pó	Quantidade líquido
1 (G1)	MTA Branco Angelus®	150 mg MTA	50 µL
2 (G2)	MTA + 5 %	142,5 mg MTA + 7,5 mg <i>Pm</i>	50 µL
3 (G3)	MTA + 10 %	135 mg MTA + 15,0 mg <i>Pm</i>	50 µL
4 (G4)	MTA + 15 %	127,5 mg MTA + 22,5 mg <i>Pm</i>	50 µL
5 (G5)	MTA + 20 %	120 mg MTA + 30 mg <i>Pm</i>	50 µL
6 (G6)	MTA + 25 %	112,5 mg MTA + 37,5 mg <i>Pm</i>	50 µL

Com a finalidade de padronizar todos os corpos de prova (CPs), o pó foi pesado em balança analítica (Adventurer AR2140 - Ohaus - Barueri – SP) e para o volume da água destilada, foi usada a micropipeta. O pó e o líquido foram dispostos em placa de vidro estéril e manipulados com espátula de aço estéril por 30 segundos. Em seguida, a mistura foi inserida em um dispositivo estéril, desenvolvido especialmente para obter CPs com as dimensões 4 mm de diâmetro por 2 mm de espessura. Todas as etapas de manipulação e confecção dos CPs foram realizadas em cabine de segurança biológica.

Após a inserção do material manipulado, a matriz ficou por 15 minutos em estufa umidificada tipo BOD a 37 ± 1 °C, até a presa final do cimento. Em seguida, os CPs foram removidos, em cabine de segurança biológica, acondicionados em tubos Falcon estéreis e estocados à temperatura ambiente por 24 h para que fosse atingida a resistência mecânica de 40 Mpa (Torabinejad et al., 1995), sendo passível de ser manipulado.

6 ENSAIOS DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS - CORPOS DE PROVA

Para o teste microbiológico, a reativação e o cultivo das cepas dos microrganismos testados foram realizados de acordo com o descrito no item 2.1.

Para a realização do teste de difusão, foram usadas placas de Petri estéreis com meio sólido ágar Müller-Hinton e ágar Sabouraud, estriadas com os microrganismos para posterior colocação dos materiais a serem testados. Em cabine de segurança biológica, os CPs de cada grupo foram retirados dos tubos com pinças estéreis e dispostos em sentido horário nas placas, em triplicata. Em seguida, foram incubados a 37 ± 1 °C por 48 h.

Com auxílio de um paquímetro digital (Mytutoyo Sul Americana Ltda., Suzano - SP), realizou-se a medição do diâmetro dos halos de inibição, tendo como referência os dois pontos mais

externos do halo formado ao redor de cada poço. Todas as placas foram avaliadas em lupa estereoscópica binocular a fim de avaliar ausência de crescimento microbiano na região correspondente aos halos.

Os dados referentes à atividade antimicrobiana do cimento experimental foram expressos por medianas e de acordo com o padrão de normalidade. A comparação entre os grupos foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Mann-Whitney. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 RENDIMENTO FÚNGICO

O rendimento dos extratos fúngicos encontra-se expresso na Tabela 4.

Tabela 4
Rendimentos dos extratos de fungos endofíticos e aquáticos.

Nº	Código	Identificação morfológica	Rendimento	
			Micélio*	Meio Líquido*
264	1341	<i>Trichoderma</i> sp.	0,832	0,350
320	EjF1 2.2A	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,734	0,119
764	Me Fe 1.3	Sem identificação	0,650	0,138
461	F40a	<i>Aspergillus</i> sp.	0,656	0,072
455	GhCg2 1.2	<i>Aspergillus</i> sp.	0,621	0,147
882	2.3 ISP2 T+I L1P3 COA 18	Sem identificação	0,523	0,114
340	EJFlor 2 1.2A	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,623	0,072
84	Ansp Cg 1.1.3a	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0,880	0,457
902	1.2 BDA A+TL2P1 COA 26	Sem identificação	0,754	0,164
265	1598e	<i>Trichoderma</i> sp.	0,298	0,066
406	GhF1 1.2b	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,549	0,219
88	VrC 2.1.3 ISP2	<i>Trichoderma</i> sp.	0,655	0,228
334	EJFlor 2 1.2B	<i>Colletotrichum</i> sp.	0,607	0,156
869	AJP 1.2.2 (1)	<i>Trichoderma</i> sp.	0,882	0,374
267	1334	<i>Trichoderma</i> sp.	0,457	0,031
590	Dfga 212 I+AT	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,734	0,362
341	EjC2 1.1B - F2	<i>Phomopsis</i> sp.	0,619	0,119

342	EjC2 1.1A - F1	<i>Phomopsis</i> sp.	0,496	0,088
345	EjC2 1.1A - F1B	<i>Phomopsis</i> sp.	0,447	0,103
314	EjC11.2-F1 BDA	<i>Xylaria</i> sp.	0,517	0,076
325	EjC32.1B-F1	<i>Xylaria</i> sp.	0,484	0,158

* Valores expressos em mg/mL de meio cultivado.

Pode-se observar que o rendimento do micélio é maior que o do meio líquido, tendo em vista a grande quantidade de polissacarídeos, ácidos graxos e outros metabólitos excretados da parede celular do fungo, durante seu crescimento. Os extratos que obtiveram melhor rendimento foram as cepas 869, 84, 264, 902, 320 e 590.

A baixa quantidade de material obtido no meio líquido pode ter sido influenciada pelo meio de cultura utilizado para o cultivo (BDA+L), bem como a forma de cultivo (pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação) e o método de extração. Nem sempre as condições utilizadas geram resultados desejados; portanto, aperfeiçoar o processo é essencial para que o rendimento seja favorável à sua aplicação (Mahapatra e Banerjee, 2013).

Deve-se considerar, também, que o tipo de hospedeiro pode influenciar no metabolismo (presença de metabólitos secundários) de seu endófito, bem como o ambiente onde a planta se encontra, pois a especificidade de um endófito em relação a uma espécie vegetal pode ser influenciada pelas condições ambientais (Wali et al., 2008; Rosa et al., 2009). Portanto, a escolha adequada do hospedeiro pode ser um fator importante para o isolamento de linhagens com potencial biotecnológico, fato este que poderá nortear novas linhas de pesquisa relacionadas a esses fatores (Strobel et al., 1996; Spiteller, Kusari e Hertweck, 2012).

7.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos frente aos microrganismos patógenos estão apresentados na Tabela 5. Os extratos que tiveram ação antimicrobiana foram: 84, 265 e 334 contra o patógeno *S. aureus*; 461, 84, 590 e 342 contra *P. aeruginosa*; 84 e 590 obtiveram resultados frente *E. faecalis*; 882, 345, 314, 325, 264 e 84 contra *C. albicans*; 902 e 84 apresentaram atividade contra *C. tropicalis*.

Tabela 5
Atividade antimicrobiana dos extratos frente aos patógenos.

Código fungo	Gênero	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
264	T ¹	-	-	-	-	A	-
320	C ²	-	-	-	-	-	-
764	IP ⁵	-	-	-	-	-	-
461	A ³	-	-	A	-	-	-
455	A ³	-	-	-	-	-	-
882	IP ⁵	-	-	-	-	A	-
340	C ²	-	-	-	-	-	-
84	P ⁴	A	-	A	A	A	A
902	IP ⁵	-	-	-	-	-	A
265	T ¹	A	-	-	-	-	-
406	C ²	-	-	-	-	-	-
88	T ¹	-	-	-	-	-	-
334	C ²	A	-	-	-	-	-
869	T ¹	-	-	-	-	-	-
267	T ¹	-	-	-	-	-	-
590	Pa ⁶	-	-	A	A	-	-
341	Ph ⁷	-	-	-	-	-	-
342	Ph ⁷	-	-	A	-	-	-
345	Ph ⁷	-	-	-	-	A	-
314	X ⁸	-	-	-	-	A	-
325	X ⁸	-	-	-	-	A	-

¹Trichoderma; ²Colletotrichum ³Aspergillus; ⁴Pestalotiopsis; ⁵Identificação pendente; ⁶Paecilomices; ⁷Phomopsis; ⁸Xylaria; ^ACom atividade.

7.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Com base nos resultados da atividade biológica apresentados pelo extrato 84, foi selecionada esta linhagem para dar continuidade ao estudo em questão e, em seguida, realizou-se o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), na concentração de 2 mg/mL, contra *E. faecalis*, *P. aureoginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

O extrato testado teve ação fungicida contra *C. albicans* nos primeiros e segundos poços (A e B) e fungistático no poço C. Com relação à *C. tropicalis*, só houve atividade fungicida na primeira diluição (poço A) e foi fungistático na segunda (poço B).

O menor valor de CIM obtido dos extratos foi de 0,125 mg.mL⁻¹, contra o patógeno *E. faecalis*; já o antibiótico usado (ampicilina), apresentou ação na concentração de 0,052 mg.mL⁻¹. Quanto ao *S. aureus* e à *P. aureoginosa*, os extratos tiveram resultados semelhantes (0,25 mg.mL⁻¹), bem como para os antibióticos ampicilina e tetraciclina (0,125 mg.mL⁻¹). Já com os patógenos leveduriformes, os resultados foram diferentes, *C. albicans* com CIM de 0,25 mg.mL⁻¹ e *C. tropicalis* com 0,5 mg.mL⁻¹, acima dos valores da nistatina que foi de 0,125 mg.mL⁻¹

A cepa endofítica utilizada neste estudo (código AnspCg 1.1.3a) foi isolada da planta *Rollinia sp.*, pertencente à família Annonaceae, que teve sua identificação confirmada por Banhos (2016) através da biologia molecular como *Pestalotiopsis microspora*, com 97% de similaridade, utilizando as sequências nucleotídicas depositadas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

O *Pestalotiopsis microspora* é comumente isolado de várias espécies vegetais, tanto de clima tropical quanto de temperado. A possibilidade de o hospedeiro influenciar no metabolismo de seu endófito é fonte de discussões e observações de estudos na área, havendo inclusive dados conclusivos de que a escolha adequada do hospedeiro é fundamental para o isolamento de linhagens com potencial biotecnológico (Strobel et al., 1996; Banhos et al., 2014). Já foram isoladas de vários compostos propriedades bioativas derivadas desta espécie, como ácido torreianico (anticancerígeno), ácido ambuico (antifúngico), pestacina e isopestacina (atividade antimicrobiana e antioxidante), jesterona e hidroxigesterona (antimicrobiano) (Silva et al., 2006; Silva, 2014).

Estudos para a busca dos micro-organismos endofíticos relacionados à família Annonaceae, suas aplicações biotecnológicas e a pesquisa de moléculas bioativas, levaram ao isolamento de espécies de fungos endofíticos que vivem em associação com estas plantas, dentre eles o *Pestalotiopsis spp.* (Silva et al., 2006; Souza et al., 2012).

A resistência aos antimicrobianos é um grande problema de saúde pública nesses tempos modernos, principalmente no que se refere às opções de tratamento medicamentoso e ao controle de infecções. Estudos de endófitos fúngicos, isolados de espécies de plantas nativas, relataram propriedades químicas e bioquímicas potencialmente úteis, que podem gerar novos compostos com aplicações práticas em uma variedade de áreas biotecnológicas, com inúmeras drogas úteis como importantes opções terapêuticas para inúmeras doenças (Gliênke et al., 2012).

Existe uma grande variedade de metabólitos endofíticos bioativos, mas a descoberta dessas substâncias está em declínio, sendo necessária a bioprospecção de novas fontes, em regiões ou habitats menos explorados. Um único endófito é capaz de produzir várias substâncias bioativas; entretanto, não têm sido completamente explorado quanto às suas propriedades terapêuticas (Specian et al., 2014).

Guimarães et al. (2009), avaliando a espécie *P. guepinii*, isolada de *Cladocolea micrantha* (Loranthaceae), testaram-na *in vitro* contra os micro-organismos patogênicos *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *Mycobacterium tuberculosis*. Os três primeiros tiveram o crescimento inibido entre 77 – 88% e o crescimento de *E. faecalis* foi moderadamente inibido (22 – 42%), o que corrobora com os achados deste estudo com relação aos resultados frente *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*, enfatizando a capacidade antimicrobiana do gênero sobre os patógenos.

Gomes-Figueiredo et al. (2007) testaram as propriedades antimicrobianas de treze cepas endofíticas do gênero *Pestalotiopsis* isoladas da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss ("espinheira santa") frente à *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), e dois isolados pertencentes à espécie *P. microspora* (6JAES e 29SES), os quais tiveram sucesso em inibir o crescimento dos microrganismos testados, achados estes que estão em acordo com os resultados encontrados neste estudo.

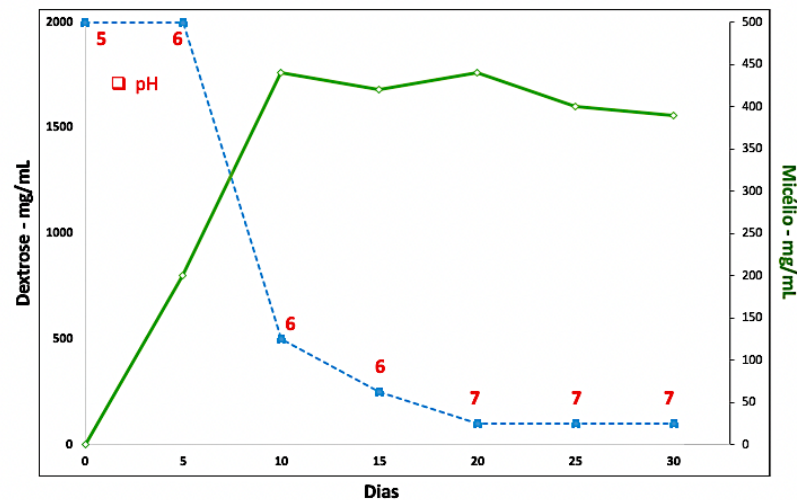
Maria et al. (2005) avaliaram o potencial antimicrobiano de 14 fungos endofíticos isolados de *Acanthus ilicifolius* e *Acrostichum aureum* e os testaram frente a bactérias (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*) e fungos (*Candida albicans* e *Trichophyton metagrophytes*). Extratos etílicos brutos de quatro endófitos derivados de fermentação submersa mostraram resultados positivos. A cepa do *Pestalotiopsis microspora*, obtida da raiz da *Acanthus ilicifolius*, mostrou considerável inibição contra *P. aeruginosa* ($14,2 \pm 1,4$), *S. aureus* ($10,5 \pm 0,7$) e *Candida albicans* ($8,3 \pm 0,2$). O resultado deste trabalho coincide, em parte, com os nossos achados quanto à atividade do *P. microspora* frente à *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*.

7.4 PERFIL METABÓLICO DO *P. Microspora*

O consumo de açúcar, o pH e o crescimento micelial do fungo *P. microspora* encontra-se expresso na figura 3.

Na fase inicial, chamada de fase lag, o fungo está se adaptando ao meio em que está crescendo, o que pode ser constatado nos primeiros 5 dias, onde a concentração de açúcar manteve-se constante, com um pequeno crescimento do pH de 5 para 6.

A fase de crescimento exponencial, ou fase log, iniciou-se a partir do 5º e manteve-se até o 10º dia, onde houve um acentuado decréscimo da concentração de açúcar e um aumento do pH, chegando a 7 no 20º dia e mantendo-se estável até o final do cultivo. Neste período, ocorreu o maior crescimento micelial, atingindo o ápice no 20º dia e ficou constante até o período final de cultivo (fase estacionária), onde foi interrompido o cultivo a fim de evitar a fase de catálise.

Figura 3: Consumo de açúcar, pH e crescimento micelial do fungo *P. microspora*.

A avaliação da concentração do açúcar, em paralelo ao crescimento micelial, se mostrou bom parâmetro avaliativo, demonstrando as fases fisiológicas pelas quais a linhagem passa, principalmente o fim da fase log e o início da fase estacionária, sendo este o melhor período para isolamento de compostos bioativos (Banhos et al., 2016).

No início da fase estacionária, ocorre a produção de metabólitos secundários, mas a produção de compostos bioativos ainda estaria em baixas concentrações, o que pode ser deduzido pela mudança do pH inicial, ao longo do crescimento, de 5 para 7, pois o pH inicial de cultivo de fungos está entre 5 e 6, onde as principais enzimas envolvidas no metabolismo primário atuam melhor nessa faixa de pH. Contudo, a alteração do meio de cultivo para neutro pode ser indício de que um ambiente menos favorável favoreça as enzimas relacionadas às funções bioquímicas envolvidas com o metabolismo secundário, atingindo o ápice da produção de metabólitos por volta do 30º dia (Strobel et al., 1996; Selim et al., 2012; Kruschewsky, Luz e Bezerra, 2014).

7.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CIMENTO EXPERIMENTAL

Os valores das medianas, assim como os valores mínimo e máximo dos diâmetros dos halos de inibição de cada material estão representados na Tabela 6.

Tabela 6
Diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos de acordo com o microrganismo e os grupos estudados.

Microrganismo	Grupos					
	G1 MTA Branco Angelus [®]	G2 MTA + 5 %	G3 MTA + 10 %	G4 MTA + 15 %	G5 MTA + 20 %	G6 MTA + 25 %
<i>S. aureus</i>	9,1 (7,8 - 10,4)	-	-	-	9,4 (8,2 - 10,6)	10,2 (7,9 - 12,5)
<i>E. coli</i>	9,2 (8,7 - 9,7)	-	-	-	9,3 (8,9 - 9,7)	9,3 (8,7 - 9,9)
<i>P. aeruginosa</i>	8,9 (7,6 - 10,2)	-	-	-	9 (7,7 - 10,3)	9,2 (7,9 - 10,5)
<i>E. faecalis</i>	8,5 (7,1 - 9,9)	-	-	-	8,8 (7,2 - 10,4)	8,9 (7,2 - 10,6)
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-

Comparando-se as diferentes concentrações nos corpos de prova para cada micro-organismo usado no estudo, pôde-se observar que houve atividade para o *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, predominantes na microbiota endodôntica diante de infecções, apenas nos grupos G1, G5 e G6. O grupo G6 (MTA + 25 %) promoveu o maior halo de inibição em relação aos demais grupos, inclusive quando comparado com o grupo G1 (MTA Branco Angelus[®]).

Os halos de inibição para o *S. aureus* foram maiores do que aqueles apresentados pelos demais microrganismos, sendo o grupo G6 o que apresentou maior halo entre os grupos testados ($p < 0,05$), mas os G5 e G1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

Para *E. coli*, não houve diferenças estatísticas significantes entre si, em relação aos diâmetros dos halos dos grupos G1, G5 e G6 ($p > 0,05$).

Para *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, os grupos G5 e G6 também apresentaram diâmetros maiores do que o grupo G1 ($p < 0,05$), sugerindo uma possível ação antimicrobiana do fungo endofítico *P. microspora*; entretanto, os grupos G5 e G6 não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si ($p > 0,05$), demonstrando que a incorporação de *Pm* (em pó), em concentração igual ou superior a 20%, é capaz de potencializar a atividade antimicrobiana do MTA, reduzindo a quantidade de pó deste último na manipulação do cimento, e, portanto, o seu custo. O *E. faecalis* constitui-se num importante elemento associado aos casos de infecção persistente ou secundária e dor, chegando a uma prevalência de 90% dos casos, e sendo nove vezes mais comum em infecção persistente/secundária do que em casos de infecção primária. A alta prevalência provavelmente esteja relacionada com algumas das propriedades do *E. faecalis* como sua excelente capacidade

de adaptação a condições adversas; a capacidade de crescimento na forma de biofilme ou colônia única; a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e de resistir ao efeito do hidróxido de cálcio (Siqueira e Rôças, 2014; Singh et al., 2020).

A comparação do diâmetro dos halos de inibição de cada corpo de prova em relação aos diferentes microrganismos mostrou que nos grupos G1, G5 e G6, os halos de inibição observados para o *S. aureus* foram semelhantes àqueles da *E. coli* ($p>0,05$) e maiores do que os apresentados pelo *P. aeruginosa* e *E. faecalis* ($p<0,05$).

Com relação às cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, apesar de terem sido constatadas atividades contra estes patógenos nos testes anteriores, não foi reproduzida esta característica no teste em questão, pois não houve formações de halos de inibição significantes e por isso não foram considerados.

O agregado trióxido mineral (MTA) é um material usado na Odontologia, de fácil manipulação e com apreciáveis características físicas, químicas e biológicas. Sua atuação principal é na indução da dentinogênese, cementogênese e osteogênese. Possui vantagens em relação a outros materiais, pois promove selamento marginal próximo ao ideal, apresenta compatibilidade biológica, não induzindo efeitos lesivos ao organismo, é desprovido de potencial mutagênico, de citotoxicidade e induz à formação de tecido mineralizado (Torabinejad e Parirokh, 2010; Costa, 2012).

O estudo da atividade antimicrobiana dos cimentos Portland (CP), associado a diferentes concentrações de óxido de cálcio, MTA, CP cinza e CP acrescido de óxido de cálcio nas concentrações de 1%, 2%, 5% e 10%, contra os micro-organismos *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. Subtilis* e *C. albicans*, demonstrou que nenhum grupo testado apresentou eficácia antimicrobiana, com ausência de halos de inibição (Siqueira et al., 2017).

O MTA, associado às substâncias hipoclorito de sódio gel a 1%, clorexidina gel a 2%, água destilada associada a 10% de propilenoglicol, KY gel, solução salina e água destilada, foi submetido ao teste antimicrobiano frente ao *S. mutans*, *L. casei*, *E. faecalis* e *C. albicans*, por meio do método de contato direto, e apresentou maior propriedade inibitória do que bactericida, sendo a clorexidina gel a 2%, o único veículo que proporcionou alguma melhora no efeito antimicrobiano (Andrade et al., 2015).

Nos últimos anos, na busca por novas substâncias com potencial farmacológico e biocompatíveis, aumentou o número de estudos sobre o uso de produtos naturais na Odontologia e alternativas para o manejo de doenças bucais, especialmente a cárie dentária e suas sequelas (Abrão et al., 2018).

O mercado de novos compostos de atividade antimicrobiana a partir de endofíticos no Brasil é promissor, principalmente na Amazônia, onde existe grande diversidade de plantas e

micro-organismos ainda não estudados, o que inspira a necessidade de pesquisas adicionais na busca de novas substâncias antimicrobianas produtoras.

8 CONCLUSÃO

- Das linhagens usadas, tiveram atividade antimicrobiana os gêneros *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Paecilomyces*, *Phomopsis* e *Xylaria*;
- O gênero *Pestalotiopsis* mostrou-se mais efetivo nos testes antimicrobianos, especificamente o *P. microspora*, sendo seus compostos bioativos produzidos a partir do 20° até o 30°, na fase estacionária, período adequado para o isolamento de substâncias;
- Na avaliação da atividade antimicrobiana do cimento experimental, houve atividade para o *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* nos grupos GC, G5 (MTA + 20%) e G6 (MTA + 25%); entretanto, o G6 (MTA + 25%) apresentou maiores valores em todos os grupos;
- A adição do extrato de polissacarídeo do *P. microspora* melhorou a atividade antimicrobiana do MTA, constituindo-se numa alternativa promissora para a produção de um cimento experimental de uso odontológico.

AGRADECIMENTO

À CAPES pelo financiamento desta pesquisa no projeto Pró-Amazônia.

REFERÊNCIAS

- Abrão F., Alves J.A., Andrade G., de Oliveira P.F., Ambrósio S.R., Veneziani R.C.S., Tavares D.C., Bastos J.K., Martins C.H.G., 2018. Antibacterial effect of *copaifera duckyi* oleoresin and its main diterpenes against oral pathogens and their cytotoxic effect. *Front. Microbiol.* 9, 201-231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00201>.
- Andrade F.B., Alcalde M.P., Guimarães B.M., Beleze Neto P., Arias M.P.C; Bramante C.M., Moraes I.G., Duarte M.A.H., 2015. Efeitos de diferentes aditivos sobre as propriedades antimicrobianas, físicas e químicas do agregado trióxido mineral (MTA). *Dental Press Endod.* 5(1),19-29.
- Banhos E.F., Souza A.Q.L de, Andrade J.C. de, Souza A.D.L. de, Koolen H.H.F, Albuquerque P.M., 2014. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. *Braz J Microbiol.* 45(1), 153-161. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000027>

Banhos E.F., 2016. Análises moleculares de linhagens selvagens e mutantes de *Pestalotiopsis* spp. associadas a basidiomicetos e plantas da Amazônia brasileira. PhD Thesis, Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard -tenth edition. 35(2), 1-35.

Costa D.D., 2012. Agregado de trióxido mineral – uma revisão da sua composição, mecanismo de ação e indicações clínicas. *Rev Saúde Com.* 8(2), 24-33.

Glienke C., Tonial F., Gomes-Figueiredo J., Savi S., Vicente V.A., Sales-Maia B.H.L.N., Possiede Y.M., 2012. Antimicrobial activity of endophytes from Brazilian medicinal plants. In: *Antimicrobial agents*. InTech, 239-254. doi: 10.5772/32199

Gomes-Figueiredo J., Pimentel I.C., Vicente V.A., Pie M.R., Kava-Cordeiro V., Galli-Terasawa L., Pereira J. O., de Souza A.Q., Glienke C., 2007. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. *Can J Microbiol.* 53(10), 1123-1132. doi:10.1139/W07-078

Guimarães A.C., Kuster R.M., Neves Jr. I., Lourenço M.C.S., Sarquis M.I., 2009. Investigação preliminar da composição micelial e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da erva-de-passarinho amazônica *Cladocolea micrantha* (Eichler) Kuijt (Loranthaceae). *Fitos.* 4(2), 90-101.

Katsamakis S., Slot D.E., Van Der Sluis L.W.M., Van der Weijden F., 2013. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 40(4), 334–344. doi: <https://doi.org/10.1111/jcpe.12058>

Kruschewsky M.C., Luz E.D.M.N., Bezerra J.L., 2014. O gênero *Pestalotiopsis* (Ascomycota, ‘Coelomycetes’) no Brasil. *Agrotropica* 26 (2), 89 –98.

Mahapatra S., Banerjee D., 2013. Fungal exopolysaccharide: production, composition and applications. *Microbiol Insights.* 6, 1-16.

Mapperson R.R., Kotiw M., Davis R.A., Dearnaley J.D.W., 2014. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from australian dry rainforests. *Curr Microbiol.* 68, 30–37. doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0415-5>

Maria G.L., Sridhar K.R., Raviraja N.S., 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *J Agr Sci Tech*, 1, 67-80.

Osemwegie O.O., Adetunji C.O., Ayeni E.A., Adejobi O.I., Arise R.O., Nwonumag C.O., Oghenekaro A.O., 2020. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status and perspectives in Africa. *Helyion*. 6(6), e04205. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04205>

Pamphile J.A., Costa A.T., Rosseto P., Polonio J.C., Pereira J.O., Azevedo J.L., 2017. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. *Rev UNINGÁ*. 53(1), 113-119.

Rajamanikyam M., Vadlapudi V., Amanchy R., Upadhyayula, S.M., 2017. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. *Braz Arch Biol Technol*. 60, e17160542. doi:<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160542>

Rosa L.H., Vaz A.B.M., Caligiorne R.B., Campolina S., Rosa C.A., 2009. Endophytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia Antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biol*. 32, 161-167. doi:10.1007/s00300-008-0515-z

Selim K.A., El-Beih A.A., AbdEl-Rahman T.M., El-Diwany A.I., 2012. Biology of endophytic fungi. *Curr Res Environ Appl Mycol*. 2(1), 31–82. doi: 0.5943/cream/2/1/3

Siew K., Lee A.H.C., Cheung A.S.P., 2015. Treatment outcome of repaired root perforation: a systematic review and meta-analysis. *J End*. 41(11), 1795-1804. doi: 10.1016/j.joen.2015.07.007

Silva M.L.C., Martinez P.F., Izeli N.L., Silva I.R., Vasconcelos A.F.D., Cardoso M.S., Stelutti R.M., Giese E.C., Barbosa A.M., 2006. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Quim Nova*. 29(1), 85-92. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000100017>

Silva I.P da., 2014. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. *Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer*. 10(18), 3888-3905.

Singh K.K., Kumar P., Das P., Marandi M., Panda S., Mahajan A., Kumar D., 2020. Association of specific microorganisms with endodontic signs and symptoms. A comparative study. *J Family Med Prim Care*. 9, 3965-3969.

Siqueira Jr. J.F., Rôças I.N., 2014. Present status and future directions in endo-dontic microbiology. *Endod Topics*. 30(1), 3-22.

Siqueira P.C., Borges K.G.T., Renovato S.R., Decurcio D.A., 2017. Propriedades antimicrobianas e físico-químicas do cimento Portland associado a diferentes concentrações de óxido de cálcio. *Rev Odontol Bras Central*. 26, 20-25.

Souza, A.Q.L. de, Souza A.D.L. de, Astolfi Filho S., Pinheiro M.L.B., Sarquis M.I.M., Pereira J.O., 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2), 185-195. doi: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006> 2004.

Souza A.Q.L. de, 2006. Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack). PhD Thesis, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Souza M.P., Nobre T.A., Almeida F.G.O., Souza A.Q.L., Forim M.R., Souza A.D.L., 2012. Isocromofilona VI isolada de *Penicillium sclerotiorum*: um fungo endofítico de *Duguetia stelechantha* (Annonaceae). *Anais 52º Congresso Brasileiro de Química*.

Specian V., Orlandelli R.C., Felber A.C., Azevedo J.L., Pamphil J.A., 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 16(4), 345-351.

Spiteller M., Kusari S., Hertweck C., 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chem Biol*. 19(17), 792-8.

Strobel G.A., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R.S., Hess W.M., 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. 142, 435–440. doi: 10.1099/13500872-142-2-435

Teiten M.H., Mack F., Debbab A., Aly A.H., Dicato M., Proksch P., Diederich M., 2013. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF-κB activity. *Bioorg Med Chem*. 21, 3850–8. doi: 10.1016/j.bmc.2013.04.024.

Torabinejad M., Hong C.U., Mc Donald F., Pitt Ford T.R., 1995. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 21, 349-353.

Torabinejad M., Parirokh M., 2010. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 36(1), 16-27.

Wali R.P., Helander M., Nissinen O., Lehtonen P., Saikkonen K., 2008. Endophyte infection, nutrient status of the soil and duration of snow cover influence the performance of meadow fescue in subarctic conditions. *Grass and For Sci.* 63, 324-330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2008.00639.x>