



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

Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*

Rafael Lopes e Oliveira

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Melchionna Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior

Manaus - AM

2010

Rafael Lopes e Oliveira

Isolamento e Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos
Endofíticos de *Piper hispidum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Melchionna Albuquerque

Co-orientador:

Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior

Manaus - AM

2010

*“Os vencedores jamais desistem, os
que desistem jamais vencem”*

*“Quanto mais me aprofundo no
conhecimento da ciência, maior é minha
crença de que Deus é Perfeito”*

Lucivana Mourão

"In Memoriam"

*A minha querida Avó, Maria,
A pessoa mais sábia que conheci,
pela dedicação e tempo que esteve
comigo.*

A quem sempre amarei.

Dedico

*A minha Mãe,
que me ensinou a valorizar a Vida e a Natureza, despertou em
mim a paixão pela Ciência e a busca pelo Conhecimento, o
respeito pelas pessoas e o temor a Deus.
Te amo....*

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que me ajudaram a galgar esse caminho, sobretudo aqueles que partilharam comigo os momentos difíceis e divertidos da vida acadêmica. A alegria da vitória não nos faz esquecer quão difícil é a tarefa de desbravar as veredas do conhecimento. O sofrimento, as incertezas e o desânimo que vez por outra pareciam tomar conta, eram superados pelas palavras de incentivo dos colegas e dos professores que nos presenteavam com seus conhecimentos e nos incentivavam a seguir o caminho. Guardo essas boas lembranças em um lugar especial no meu coração. A superação dos obstáculos e a alegria dessa conquista devo àqueles que sempre estiveram comigo, me apoiaram e acreditaram que isso seria possível:

- Agradeço a Deus por tudo que tem me proporcionado ao longo da minha vida...
- Aos meus Pais, Firmo Neto & Graça pelo amor, companheirismo, afeto e paciência. Além dos sacrifícios que tinham que fazer para que me proporcionassem uma formação digna...
- Aos meus Irmãos Renan e Renato que torcem por mim...
- À minha avó Magui e a todos os meus tios, tias, primos e primas que me apóiam e acreditam no meu sucesso...
- À minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Patrícia Albuquerque e Meu Co-orientador Dr. Sergio Duvoisin Jr., por toda a paciência, incentivo, carinho, atenção e amizade...
- À Celina, Renah, Sandro e **Aimée** pela amizade, paciência e por estarem sempre dispostos a me ajudar sem medir esforço e incansavelmente na realização deste trabalho...
- Aos meus amigos que sempre me apoiaram e confiaram em mim e me proporcionaram grandes alegrias: André Felipe, André Luiz, Andrey Barreto, Carlos Flávio, Carole Barauna, Cristiany Apolinário, Daniely Pinheiro, Douglas Reis,

Gabriel Lima, Gracinha Menezes, Hananda Gabrielle, Jairo Jr, Karen Luana, Layse Brasil, Leandro Prestes, Luiz Fernando, Marcelo Daou, Mauricio Encarnação, Mel Naice, Paulinha Figliuolo, Pe. Ronaípe, Pedro Donadio, **Priscila Aguiar**, Polyana Cabral, Rodrigo Lima e Thaísa Sabino

- A Prof^a. Dr^a Mayra Kassawara Martins, Prof. Dr. João Lucio, Prof. Dr. Rudi, MsC. Clarice, Ingrid pela amizade, apoio, suporte e auxílio na realização deste trabalho...
- Ao Prof. Dr. Tetsuo Yamane, Prof. Dr. André Willerding e Prof. Dr. Cleber Bastos pela estrutura disponibilizada para realização de uma parte deste trabalho...
- Ao Prof. Dr. Ricardo Serudo e sua Aluna Diorgia Amoedo de Oliveira da Escola Superior de Tecnologia da UEA – EST.
- Aos Professores e técnicos do laboratório de Biorgânica do MBT: Dr^a. Ana Hilda, Dr. Aldo Procópio, Dr. Luciano Fernandes, Dr^a. Luciana de Boer, Dr^a. Sandra Zanotto.
- A Universidade do Estado do Amazonas (UEA).
- Aos professores e a Coordenação do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, da Universidade do Estado do Amazonas - UEA que ajudaram na minha formação ao longo destes dois anos...
- A Dra. Cristina Maki (UFAM) pelas sugestões e a disponibilidade em me ajudar a melhorar este trabalho...
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação para o Amparo a Pesquisa no Amazonas (FAPEAM) por me proporcionarem auxílio financeiro durante a realização deste trabalho...
- E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

Obrigado.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	3
2.2 FUNGOS: BIODIVERSIDADE, CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA	7
2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	12
2.3.1 <i>Controle biológico</i>	12
2.3.2 <i>Produção de fármacos</i>	13
2.3.3 <i>Produção de enzimas hidrolíticas</i>	15
2.3.4 <i>Produção de compostos antioxidantes</i>	19
2.4 FAMÍLIA PIPERACEAE	21
2.4.1 <i>Gênero Piper</i>	22
2.4.2 <i>Piper hispidum</i>	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1 COLETA DA PLANTA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS	26
4.2 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	27
4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	28
4.4 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	28
4.5 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	29
4.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	29
4.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	30
4.7.1 <i>Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos com difenil-picril-hidrazina (DPPH)</i>	30
4.7.2 <i>Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos usando Fe³⁺ como agente oxidante</i>	30
4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	31
4.9 ENSAIOS QUALITATIVOS PARA A VALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS	32
4.10 ENSAIOS BIOCATALÍTICOS DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES	32
4.11 EXTRAÇÃO DE DNA DOS ISOLADOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	34
4.12 SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA	34
4.12.1 <i>Batata dextrose ágar (BDA)</i>	34
4.12.2 <i>Tampão de extração de DNA de fungos filamentosos</i>	34_Toc265482169

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	35
5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	37
5.3 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS	39
5.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	44
5.5 ENSAIOS BIOCATALÍTICOS	48
5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	51
5.7 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	59
5.7.1 <i>Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos com difenil-picril-hidrazina (DPPH)</i>	60
5.7.2 <i>Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos usando Fe³⁺ como agente oxidante</i>	62
6. CONCLUSÕES.....	65
7. PERSPECTIVAS.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de micotoxinas: aflatoxina B ₂ , ocratoxina A e citreoviridina.....	10
Figura 2 - Antibióticos de origem fúngica: penicilina F e cefalosporina C.	11
Figura 3 - Estrutura química do taxol.....	13
Figura 4 - Estruturas químicas de compostos antioxidantes.....	19
Figura 5 - Estruturas químicas de óleos essenciais produzidos por plantas do gênero <i>Piper</i>	23
Figura 6 - Planta da espécie <i>Piper hispidum</i>	24
Figura 7 - Foto de satélite dos locais de coleta.....	26
Figura 8 - Estruturas químicas dos terpenos analisados.....	31
Figura 9 - Reação biocatalítica padrão.	33
Figura 10 - Diversidade morfológica de fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i>	37
Figura 11 - Distribuição percentual dos isolados fúngicos em possíveis gêneros.....	39
Figura 12 - Inibição do crescimento de <i>S. sonnei</i> (A) e <i>S. aureus</i> (B) por líquidos metabólicos de fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i>	39
Figura 13 - Perfis cromatográficos da amoxicilina comercial e dos extratos metabólicos de isolados endofíticos de <i>P. hispidum</i>	42
Figura 14 - Perfis cromatográficos da cefaloxina comercial e dos extratos metabólicos de isolados endofíticos de <i>P. hispidum</i>	43
Figura 15 - Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extratos dos isolados PH-F 41, PH-C 23, PH-C 24, PH-C 28, PH-C 33 e PH-R 20.....	43
Figura 16 - Halo indicativo da produção de (A) amilase e (B) protease	44
Figura 17 - Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i> . .	44
Figura 18 - Cromatogramas das alíquotas da reação de esterificação mediada pelo micélio do isolado PH-C 21 e da reação controle (branco).....	49
Figura 19 - Cromatogramas sobrepostos das alíquotas das reação mediada pelo isolado PH-C 21 e da reação controle (branco)... ..	49
Figura 20 - Cromatograma das alíquotas da reação de esterificação mediada pela enzima comercial Novozym 435 e da reação controle (branco).....	50
Figura 21 - Cromatogramas dos terpenos safrol e α -pineno e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.	52

Figura 22 - Cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citronelol e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.....	52
Figura 23 - Ampliação dos cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citronelol e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.....	53
Figura 24 - Cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (<i>R</i>)-carvona e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.....	54
Figura 25 - Ampliação dos cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (<i>R</i>)-carvona e do extrato do isolado endofítico PH-F 52	54
Figura 26 - Cromatogramas dos terpenos safrol e α -pineno e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A), e PH-C 34 (B).....	55
Figura 27 - Cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citronelol e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A) e PH-C 34 (B).....	56
Figura 28 – Ampliação dos cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citronelol e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A) e PH-C 34 (B).....	56
Figura 29 - Cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (<i>R</i>)-carvona e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 e PH-C 34.....	57
Figura 30 - Ampliação dos cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (<i>R</i>)-carvona e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A) e PH-C 34 (B).....	58
Figura 31 - Curva analítica da absorvância obtida no ensaio de atividade antioxidante utilizando DPPH para diferentes concentrações de ácido ascórbico.....	60
Figura 32 - Concentração equivalente de ácido ascórbico presente nos extratos fúngicos, obtida nos ensaios com DPPH.....	61
Figura 33 - Curva analítica da concentração de Fe^{2+} obtida no ensaio de atividade antioxidante utilizando Fe^{3+} para diferentes concentrações de ácido ascórbico	63
Figura 34 - Concentração equivalente de ácido ascórbico para os extratos fúngicos nos ensaios com Fe^{3+}	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de fragmentos coletados, número de fungos encontrados, número de fungos isolados e taxa de colonização dos espécimes cultivados.....	35
Tabela 2 - Descrição das características morfológicas dos grupos obtidos no isolamento de fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i>	38
Tabela 3 - Teste de antagonismo entre os isolados fúngicos endofíticos de <i>P. hispidum</i> e as bactérias-teste patogênicas.	40
Tabela 4 – Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i> isolados de folhas.	46
Tabela 5 - Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i> isolados de caule.....	47
Tabela 6 - Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de <i>P. hispidum</i> isolados de raiz.	47

Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*

RESUMO - A espécie *Piper hispidum* (Piperaceae), conhecida popularmente como pimenta de macaco, ocorre naturalmente na Amazônia e possui grande potencial para o desenvolvimento econômico devido à produção de safrol, óleo essencial de comprovada atividade inseticida e antimicrobiana, com baixos níveis de toxicidade. Visando minimizar o extrativismo de algumas espécies vegetais (por exemplo, *P. hispidum*), uma estratégia seria a utilização de microrganismos endofíticos, uma vez que estes podem produzir compostos presentes nas plantas. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo isolar fungos endofíticos de *P. hispidum* e verificar as potencialidades biotecnológicas dos isolados, tais como atividade antimicrobiana, capacidade de produção de enzimas hidrolíticas de interesse comercial, produção de terpenos, de compostos antioxidantes e a capacidade biocatalítica de dois isolados selecionados como produtores de lipases. Foram avaliados dois exemplares de *P. hispidum* coletados em dois pontos da cidade de Manaus-AM, onde 58 isolados fúngicos foram obtidos. Os isolados foram distribuídos em nove grupos morfológicos. Desses isolados, 15 (25,9%) produziram compostos com atividade antimicrobiana frente bactérias patogênicas e 23 (39,7%) produziram enzimas hidrolíticas de interesse comercial (amilase, celulase, xilanase, lipase, pectinase e protease). Os fungos isolados produtores de lipase mostraram-se pouco eficientes como biocatalisadores em reações de esterificação. Nos extratos brutos dos fungos endofíticos de *P. hispidum* avaliados neste trabalho não foi detectada a presença de safrol, citronelol; (*R*)-carvona e α -pineno. A produção de terpinoleno e β -cariofileno por dois isolados não foi confirmada. Quanto à atividade antioxidante, os extratos fúngicos brutos apresentaram atividade antioxidante baixa, quando comparados ao ácido ascórbico. Em síntese, é importante ressaltar que os estudos aqui realizados mostram que a investigação da diversidade de fungos de hospedeiros tropicais aponta claramente para novas perspectivas sobre o potencial que os fungos endofíticos representam para a biotecnologia.

Palavras chaves: Piperaceae, Fungos Endofíticos, CLAE, Atividade Biológica.

Evaluation of the Biotechnological Potential of Endophytic Fungi from *Piper hispidum*

ABSTRACT - The species *Piper hispidum* (Piperaceae), known popularly as pepper-jack, occurs naturally in the Amazon and has high potential for economic development due to production of safrole, essential oil of proven insecticidal and antimicrobial activity with low toxicity. In order to minimize the extraction of some plant species (ex, *P. hispidum*), an interesting strategy is the use of endophytic microorganisms, since microorganisms associated with plants can produce compounds present in their hosts. Therefore, this study aimed to evaluate endophytic fungi isolated from *P. hispidum* and verify the biotechnological potential of the isolates, such as the antimicrobial activity, the ability to produce hydrolytic enzymes of commercial interest, the production of terpenes, antioxidant compounds and biocatalytic ability of two lipase producing isolates. Two specimens of *P. hispidum* from two spots of Manaus-AM were evaluated, where 58 fungal isolates were obtained. The isolates were distributed into nine morphological groups. Of these, 15 (25.9%) isolates produced compounds with antimicrobial activity against pathogenic bacteria, and 23 (39.2%) produced hydrolytic enzymes of industrial interest (amylase, cellulase, xylanase, lipase, pectinase and protease). The lipase producing fungi shown to be ineffective as biocatalyst mediating a esterification reaction. Within the crude extracts obtained from *P. hispidum* isolates evaluated in this study it was not detected the presence of safrole, citronellol; (*R*)-carvone and α -pinene. The production of terpinolene and β -cariofilene by two isolated could not be confirmed. The fungi crude extracts present lower antioxidant activity than ascorbic acid. In summary, it is important to note that the studies performed here showed that the investigation of the fungi diversity from tropical hosts clearly points out to new perspectives concerning the endophytic fungi potential.

Keywords: Piperaceae, Endophytic Fungi, HPLC, Biological Activity.

1. INTRODUÇÃO

Considerando a diversidade total estimada de espécies animais e vegetais, e as propriedades biomedicinais a elas associadas, muito pouco é conhecido. Isso significa que, devido à alta biodiversidade existente em regiões tropicais, possivelmente há inúmeras espécies de plantas, animais e microrganismos ainda por serem descobertas.

Nos últimos anos, uma importância maior vem sendo dada aos microrganismos associados às plantas, principalmente os endófitos, que são aqueles que habitam o interior de diferentes tecidos das plantas sem causar danos ao seu hospedeiro. Embora tenham sido descritos a partir do século passado, microrganismos endofíticos só receberam uma maior atenção há pouco mais de 20 anos, quando foi verificado que eles podem desempenhar funções importantes no processo de adaptação da planta e podem produzir uma infinidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos), o que representa um mercado de dezenas de bilhões de dólares em todo o mundo (AZEVEDO e ARAÚJO, 2005).

Os trabalhos relacionados a microrganismos endofíticos isolados de plantas tropicais vem crescendo nas últimas décadas, sendo que algumas pesquisas são restritas a determinadas espécies do Brasil e da Índia, países nos quais poucos grupos de pesquisadores têm se empenhado na busca de novos microrganismos com propriedades de interesse biotecnológico.

Dentre as espécies tropicais, a *Piper hispidum* L. ou pimenta de macaco, que ocorre naturalmente na Amazônia, tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido à produção de um óleo essencial, o safrol, que apresenta uma ação eficaz no controle de fitopatógenos tradicionais, como fungos e bactérias, além de comprovada ação analgésica e antiinflamatória com baixos níveis de toxicidade (MAIA et al., 1988; MONTEIRO et al., 2001; FONTES JUNIOR et al., 2002).

Além do safrol, existem diversos trabalhos na literatura relacionados com a potencialidade do óleo dilapiol produzido por *P. hispidum* em uma quantidade reduzida, utilizado na medicina popular, em função das propriedades antimicrobianas exibidas pelos constituintes deste óleo (FACUNDO et al., 2008). Entretanto, trabalhos envolvendo a microbiota endofítica existente nesta planta ainda são incipientes ou

inexistentes. Desta forma, há necessidade de desenvolver trabalhos, cujo objetivo seja investigar a microbiota endofítica de *P. hispidum*, uma vez que existem relatos na literatura de que microrganismos endofíticos podem gerar os mesmos compostos produzidos pela planta hospedeira, havendo assim a possibilidade de descobrir novos compostos de valor comercial interessante, além dos já produzidos pela própria planta (MESQUITA, 2005; FACUNDO et al., 2008).

A Amazônia possui a mais rica variedade de espécies vegetais e animais do mundo e, com a tendência mundial para revalorização dos produtos de origem natural, que substituam os sintéticos, ela representa um foco de manejo equilibrado da biodiversidade, permitindo um desenvolvimento sustentável para a região (SILVÉRIO, 2004).

Do ponto de vista ecológico, é extremamente importante elucidar interações entre possíveis simbioses como são os endófitos e essas plantas, minimizando assim, o perigo de extinção de algumas espécies vegetais. Dessa forma, a utilização de microrganismos endofíticos representa uma perspectiva de suma importância, garantindo a preservação destas espécies, ao mesmo tempo em que mantém a produção de compostos produzidos pela planta hospedeira. Além disso, existe a possibilidade de que novos compostos de valor econômico sejam descobertos, como novos antibióticos, antifúngicos, agentes terapêuticos, enzimas, entre outros.

Portanto, o presente trabalho visa isolar fungos endofíticos de *P. hispidum* coletadas na cidade de Manaus-AM e verificar as potencialidades biotecnológicas dos isolados. Além de verificar a atividade antimicrobiana, pretende-se avaliar a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas de interesse comercial, bem como verificar a produção de óleos essenciais e de compostos antioxidantes. Paralelamente, foi verificada a capacidade biocatalítica de dois isolados selecionados como produtores de lipases, visando avaliar o potencial destes fungos como biocatalisadores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microrganismos Endofíticos

Apesar dos microrganismos endofíticos terem sido mencionados pela primeira vez no início do século XIX, quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas foi Bary, em 1866. E foi apenas no século XX, no fim da década de 70, que os microrganismos endofíticos começaram a adquirir importância científica, quando foi verificado que eles apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (AZEVEDO et al., 2002).

Microrganismos endofíticos foram inicialmente considerados quaisquer microrganismos que, em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais aéreos sem causar danos aparentes à planta hospedeira (CARROLL, 1986; PETRINI et al., 1991). A definição de que endófitos eram considerados microrganismos que são isolados de tecidos vegetais desinfectados superficialmente ou do interior destes, e que não causam danos aparentes à planta hospedeira, foi então proposta por Hallmann em 1997. Apesar desta definição englobar os microrganismos endofíticos que habitam internamente as partes subterrâneas da planta, ainda não era uma definição completa, por excluir ou simplesmente omitir as populações microbianas não cultiváveis difíceis de sobreviver em condições de laboratório, e portanto pouco estudadas (ARAÚJO et al., 2002). As bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos e demais microrganismos que habitam o interior das raízes, não eram considerados endófitos, sendo tratados separadamente (AZEVEDO et al., 2002; GUIMARÃES, 2005). Ainda, os endófitos foram definidos como microrganismos que habitam tecidos internos da planta sem causar nenhum efeito negativo imediato (STONE et al., 2000; FIRAKOVÁ et al., 2007). A mais ampla e atual definição de endófitos diz que: "endófitos são todos microrganismos cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar mal ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas, excluindo desta maneira bactérias nodulantes e fungos micorrízicos (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006).

Fungos endofíticos vêm sendo estudados principalmente em plantas de regiões temperadas, e apenas a partir da última década em plantas das regiões tropicais

(AZEVEDO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2002). Os primeiros estudos sobre bactérias endofíticas foram feitos por Colombo em 1978, estudando algas. O pesquisador verificou a ocorrência de bactérias endofíticas em seu talo e supôs existir uma relação fisiológica equilibrada entre as bactérias e seu hospedeiro, sugerindo uma ligação dos endófitos com a atividade fotossintética da alga e sua provável dependência de oxigênio, pois estes se encontravam próximos aos cloroplastos e nas regiões mais jovens dos talos (COLOMBO, 1978).

Todas as espécies vegetais estudadas até o momento apresentaram microrganismos endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003; FIRAKOVÁ et al., 2007). Os estudos sobre endófitos se intensificaram na década de 80, pois apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessas interações ainda devem ser melhor esclarecidas. O conhecimento da diversidade desses organismos é de extrema importância, visto que os estudos referentes à sua presença, frequência e funções aumentam as informações sobre a microbiota endofítica, elucidando as bases biológicas existentes sobre essas interações (BARROS, 2003). Diversas espécies vegetais já possuem suas comunidades endofíticas isoladas e caracterizadas, tais como: *Citrus sp.* (ARAÚJO et al., 2001); *Triticum aestivum* (LARRAN et al., 2002); *Dicksonia sellwiana* (BARROS., 2003); *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (SOUZA et al., 2004); *Bactris gasipaes* (ALMEIDA et al., 2005); *Glycine max* (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005); *Citrus limon* (DURÁN et al., 2005).

A entrada de microrganismos endofíticos na planta é feita por várias vias, sendo uma das principais através das raízes, por ranhuras causadas pelo atrito com o solo durante o crescimento. Alguns fungos associados às plantas iniciam seu ciclo de vida com a germinação do esporo, seguido do crescimento da hifa na folha ou superfície da raiz, e da penetração destes fungos endofíticos na planta. Aberturas naturais do hospedeiro como estômatos e hidatódios também podem favorecer a entrada dos fungos (WAGNER e LEWIS, 2000). *Piriformospora indica* é um fungo endofítico que pode emitir apressórios que favorecem a penetração nos tecidos da planta hospedeira (VARMA et al., 1999). Entretanto, outros fungos como *Beauveria bassiana* não utilizam apressórios para penetrar na planta hospedeira; seus esporos germinam sobre a planta de milho e crescem de forma aleatória nesta superfície, onde posteriormente podem penetrar via estômatos ou por entre as células da epiderme através da cutícula,

por ação enzimática. Após a penetração, o endófito pode se movimentar de forma passiva no interior no hospedeiro, por meio do xilema (WAGNER e LEWIS, 2000).

Os endófitos podem colonizar os tecidos vegetais ocupando espaços intercelulares, o interior de tecidos vasculares, ou mesmo intracelularmente. Segundo Araújo et al. (2002), os mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes, estruturas florais tais como pólen, ovários, anteras e estames podem ser colonizados. Entretanto, fungos e bactérias endofíticos parecem apresentar diferentes preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam. Fisher et al. (1992) isolaram bactérias e fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme, córtex do caule e folha) de plantas de milho sadias, e verificaram que as partes das plantas mais próximas do solo eram mais colonizadas por bactérias do que a parte superior. Já os fungos endofíticos parecem colonizar preferencialmente as partes aéreas da planta hospedeira e os espaços intercelulares (AZEVEDO, 2001).

O processo de isolamento de microrganismos endofíticos é de suma importância para a caracterização da comunidade endofítica de determinada planta e deve ser realizado criteriosamente de modo que não seja obtido um perfil irreal das comunidades microbianas endofíticas que habitam a planta a ser estudada. Portanto, a avaliação de vários fatores deverá preceder o isolamento de microrganismos endofíticos. Segundo Araújo (2002) é importante a escolha certa do material vegetal, pois espera-se obter linhagens que colonizem naturalmente a planta e que possam conferir características desejadas ao hospedeiro; a idade da planta, os órgãos e tecidos utilizados para o isolamento, o local e a época da coleta também devem ser considerados.

A produção de metabólitos de interesse biotecnológico pela planta pode ser um fator relevante na escolha do hospedeiro, devido à possibilidade do endófito ter adquirido geneticamente a capacidade para produzi-los durante sua co-evolução com o hospedeiro. Esta possibilidade é bastante vantajosa, pois, segundo Azevedo (1999), a capacidade que os endófitos possuem de produzir compostos bioativos originalmente produzidos pela planta, facilita a produção da substância de interesse pelo microrganismo por fermentação industrial, protegendo desta maneira, plantas de crescimento lento. Bactérias do gênero *Erwinia*, por exemplo, ocorrem no interior da soja e produzem metabólitos que protegem a planta contra o ataque do fitopatógeno *Pseudomonas syringae pr. glycinea* (VOLTSCHE et al., 1992).

Bactérias endofíticas vêm sendo extensamente utilizadas na promoção de crescimento vegetal. *Bacillus pumilus*, isolado endofiticamente de cultura *in vitro* de *Vitis vinifera*, apresentou potencial na promoção de crescimento de brotos e raízes de uva (THOMAS, 2004). Rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) colonizam raízes, realçando a emergência de brotos e estimulando o crescimento da planta, pela produção de hormônios vegetais, melhorando a obtenção de nutrientes (LAZOROVITS e NOWAK, 1997; NOWAK et al., 1998). A bactéria endofítica *Pseudomonas* sp. amostra PsJN, isolada de raízes de cebola (NOWAK, 1998) proporciona aumento do crescimento de batata (LAZOROVITS e NOWAK, 1997; NOWAK et al., 1998), tomate e pimentão (NOWAK, 1998) sob condições gnotobióticas. Comunidades bacterianas endofíticas isoladas de mudas de batata crescendo em campo apresentaram habilidades na promoção do crescimento vegetal onde foi verificada a produção de ácido 1,3-indol-acético, um hormônio de crescimento vegetal, em alta concentração (SESSITSCH et al., 2004).

A realização de várias coletas e repetições é importante para a diferenciação dos reais endófitos daqueles microrganismos epifíticos que eventualmente possam ser isolados, e até mesmo de contaminantes, dependendo da metodologia utilizada no isolamento. Testes de controle para verificação da eficácia da desinfecção superficial dos tecidos vegetais a serem submetidos aos isolamentos devem ser feitos a cada processo de desinfecção (BARROS, 2003).

Segundo Bernstein e Carroll (1977), o emprego da microscopia ótica e eletrônica auxilia na detecção de microrganismos endofíticos, mas não descarta a necessidade de isolamento destes.

A etapa de isolamento deve ser cuidadosamente realizada a fim de eliminar a microbiota epifítica existente na planta em estudo, sem, entretanto alterar a endofítica. Esta fase refere-se à lavagem dos tecidos vegetais utilizando agentes desinfectantes (PEREIRA et al., 1993; DONG et al., 1994; FISHER et al., 1995; ARAÚJO et al. 2002; SCHULZ e BOYLE, 2005). O tempo de imersão do material vegetal nos agentes desinfectantes e a própria concentração destes pode variar de acordo com a textura do tecido vegetal em estudo (PEREIRA et al., 1993).

Geralmente as técnicas utilizadas para isolar os endófitos baseiam-se na ruptura ou fragmentação do tecido vegetal, seguida de sua inoculação sobre meios específicos para o tipo de microrganismo que se deseja isolar (ARAÚJO et al., 2002). Dessa forma,

é possível monitorar organismos específicos no ambiente, através do isolamento seletivo de determinados endófitos utilizando meios seletivos (MELO, 1999).

A purificação dos microrganismos isolados e a estocagem dos mesmos, empregando o processo de preservação apropriado entre os vários disponíveis, são as etapas subseqüentes do processo de isolamento (DIAS et al., 2009). Fases estas, imprescindíveis, pois uma colônia isolada aparentando ser constituída por uma única espécie microbiana pode constituir uma mistura de espécies (ARAÚJO et al., 2002).

2.2 Fungos: Biodiversidade, Características e Importância

Atualmente estima-se que o reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhão de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (AZEVEDO, 2002). Ainda assim, atenção especial deve ser dispensada com relação à preservação destes microrganismos, pois segundo Cherfas (1991), tem se observado um grande declínio no número de espécies fúngicas, bem como na quantidade de indivíduos fúngicos na Europa, nos últimos tempos. Diante desta situação, e em vista da importância destes microrganismos, é urgente que estudos para catalogar fungos sejam realizados, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde esta situação ainda é mais grave, pelo risco de extinção de espécies antes mesmo de serem catalogadas.

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; têm parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos, dependendo das substâncias orgânicas disponíveis. Desprovidos de clorofila, são incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Pertencentes ao reino Fungi, são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de substâncias de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores dos componentes primários da madeira - lignina e celulose - o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MINAMI, 2003).

Os fungos apresentam grande diversidade entre si, porém possuem características em comum que os distinguem dos demais reinos (AZEVEDO, 2001). São organismos historicamente comparados às plantas, com destacada habilidade para

utilizar quase qualquer fonte de carbono como alimento. Realizam nutrição absorvativa liberando enzimas no meio em que habitam, quebrando macromoléculas presentes no meio, tais como carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis, facilitando sua absorção. Outra característica é sua fonte primária de reserva de carboidratos que é o glicogênio, ao contrário das plantas que têm o amido para desempenhar esta função (ALEXOPOULOS et al., 1996). As paredes celulares fúngicas, principalmente a dos fungos filamentosos, têm quitina em sua composição, tornando-as rijas e espessas. Existem fungos não filamentosos como a maioria das leveduras, por exemplo, que são unicelulares e reproduzem-se por brotamento. Outros ainda, formam estruturas macroscópicas como os cogumelos comestíveis (AZEVEDO, 2001).

Segundo Loguercio-Leite (2004), os fungos estão agrupados em quatro filós: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Do primeiro, fazem parte os fungos mais simples e com dimensões muito pequenas, que normalmente apresentam esporos flagelados. É considerada a linhagem mais primitiva de fungos. O filo Zygomycota apresenta duas classes: *Zygomycetes* e *Trichomycetes*. A classe *Zygomycetes* é distinguida pela produção de um esporo de resistência, de origem sexual, o zigosporo. Algumas espécies são utilizadas na fabricação de produtos industriais como amilases (*Mucor racemosus*), β -caroteno (*Blakeslea trispora*), ácido cítrico (*Mucor piriformes*), ácido fumárico (*Rhizopus oryzae*) e alguns alimentos. O filo Ascomycota possui o maior número de espécies até agora encontradas, e devido à variabilidade estrutural e numérica, ainda não existe uma delimitação mais precisa das suas categorias taxonômicas superiores. Existem cerca de nove classes de ascomicetos que continuam em discussões entres os especialistas. Por fim, o filo Basidiomycota onde a maioria das espécies produz estruturas protetoras macroscópicas. São utilizados como fonte de proteínas, sendo cultivados comercialmente. Outros são comestíveis, produtores de antibióticos ou podem ser tóxicos (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

Os fungos são encontrados em todos os ambientes, podendo infectar animais, incluindo humanos; parasitar plantas, causando doenças e morte das árvores ou se associar em simbiose, onde colaboram com a planta para a absorção de água e sais minerais, aumentando a resistência da mesma ao estresse biótico e abiótico em que está exposto (GUIMARÃES, 2005).

Como fonte de compostos químicos, incluindo vários antibióticos, os fungos são extremamente valiosos além de apresentarem grande potencial no controle biológico de pragas (HAWKSWORTH, 1991; AZEVEDO, 1998; STROBEL et al., 2008). Apesar dos efeitos indesejáveis dos fungos serem enfatizados pela população leiga, vários são os benefícios que estes microrganismos oferecem: antibióticos como a penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, as fermentações biológicas envolvendo fungos, utilizadas pelo ser humano há milênios na fabricação de pães e bebidas fermentadas, como o vinho e a cerveja (AZEVEDO, 2001).

Mais recentemente, o resveratrol, uma fitoalexina produzida pela videira em resposta de defesa ao fungo *Botrytis cinerea*, tem sido vastamente estudada pelos seus efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares e o tratamento de algumas neoplasias (KOBAYASHI, 2000), sendo este um exemplo de que nem sempre, um fitopatógeno é prejudicial.

A relação da indústria de alimentos com os fungos filamentosos é muito antiga e extensa. Os fungos estão associados à tecnologia de alimentos desde os primórdios das civilizações mais antigas conhecidas, como por exemplo, nos processos de preparação de alimentos orientais, bebidas de povos indígenas no continente americano e, na Europa, participam no processamento de alimentos à base de leite. Com o desenvolvimento das pesquisas, já é possível conhecer o processo pelos quais os fungos modificam os alimentos, seja pela produção de micotoxinas ou pela contaminação de alimentos processados (PASTORE e MACEDO, 2004).

Os estudos toxicológicos da ação de micotoxinas datam dos anos 60, devido ao surgimento de casos de contaminação e morte de centenas de animais. Entre as micotoxinas conhecidas, incluem-se as aflatoxinas, grupo de compostos tóxicos produzidos por certas cepas dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*; ocratoxinas compostos derivados da isocumarina com um grupo amida ligado ao grupo amino da fenilalanina produzidos principalmente pelos fungos *Penicillium cyclopium*, *P. viridicatum*, *P. palitans* e algumas cepas de *Aspergillus spp.*; citreoviridinas, tricotecenos e fumonisinas, produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, além de uma variedade de derivados indólicos (PINTO et al., 2002; PASTORE e MACEDO, 2004). As estruturas químicas de algumas micotoxinas estão apresentadas na Figura 1.

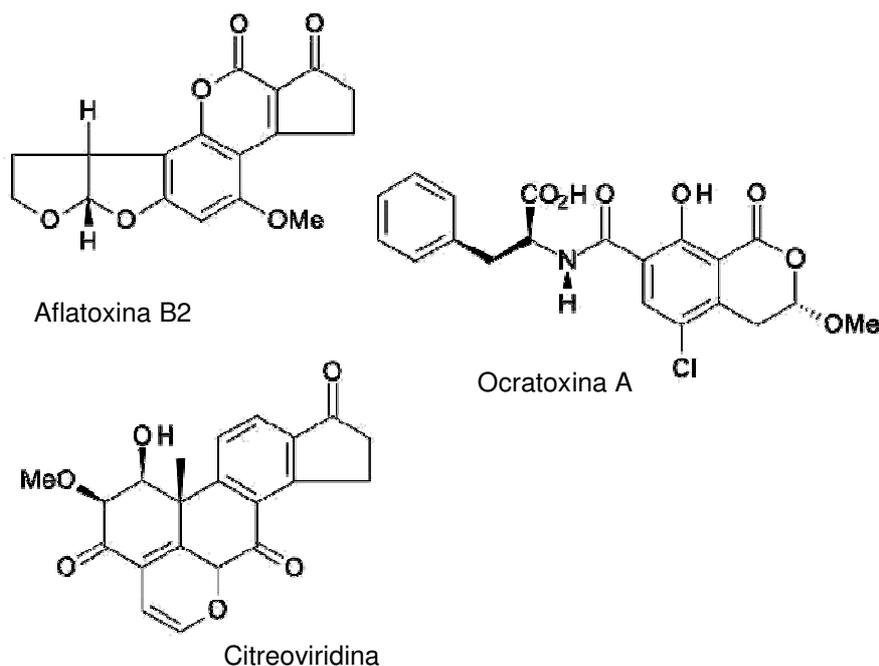


Figura 1 - Estrutura química de micotoxinas: aflatoxina B2, ocratoxina A e citreoviridina.

Os fungos vêm sendo extensamente utilizados na produção de enzimas. Entre as enzimas fúngicas importantes para a indústria alimentícia destacam-se as amiloglicosidases, produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*; α -amilases, que transformam amido em dextrinas e oligossacarídeos e podem ser isoladas por fermentação de linhagens de *A. niger*; reninas; lipases, que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis sob condições naturais, podendo catalisar a transesterificação e a síntese estereoespecífica de ésteres em um grande número de substratos (PASTORE e MACEDO, 2004).

Além do potencial industrial, os fungos estão diretamente ligados à recuperação ambiental, tanto na reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais, como na biodegradação de materiais lignocelulósicos (constituídos por celulose, poliose e lignina), especialmente a madeira (FERRAZ, 2004).

A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias para degradação de materiais lignocelulósicos pertence aos grupos de *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* e *Basidiomycetes*. Esses fungos podem causar três tipos de degradação: branca – degradam todos os componentes da madeira (*white-rot fungi*), marrom – degradam principalmente polissacarídeos (*brown-rot fungi*), macia – podem degradar lignina e

polissacarídeos, porém em velocidades baixas (*soft-rot fungi*). Essas degradações são em geral, feitas por enzimas oxidativas, principalmente do tipo lacase e peroxidase (DURÁN, 2004).

Para a indústria farmacêutica, importantes fármacos de uso clínico em várias patologias são obtidos de fungos. Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas, destacam-se como os exemplos mais conhecidos, os antibióticos penicilina, produzida por fungos do gênero *Penicillium*, descoberta em 1928 por Alexander Fleming; e a cefalosporina, isolada de culturas de *Cephalosporium acremonium* em 1948 por Brotzu (MENEZES et al., 2000; PINTO et al., 2002). As estruturas destes antibióticos estão apresentadas na Figura 2.

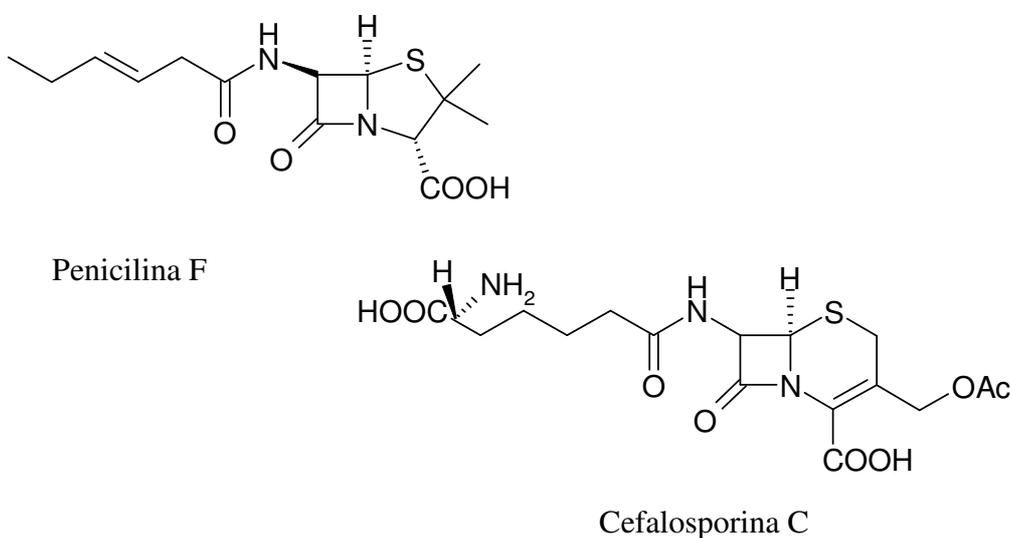


Figura 2 - Antibióticos de origem fúngica: penicilina F e cefalosporina C.

Outros exemplos de substâncias produzidas a partir de metabólitos de fungos com atividades farmacológicas diferentes são: mevinolina um agente redutor de colesterol; ciclosporinas; ergometrina; asperlicina, um antagonista de doenças gastrointestinais e do sistema nervoso central; papulacandinas um agente antifúngico, entre outros (PINTO et al., 2002; MORO et al., 2007).

Outra utilização para os produtos obtidos a partir dos fungos é o controle biológico na agricultura. Destacam-se nesse processo, a utilização de fungos do gênero *Trichoderma* e *Metharhizium* como micoerbicidas, micoinseticidas ou micoparasitas (AZEVEDO et al. 2002).

2.3 Fungos Endofíticos e suas Aplicações Biotecnológicas

2.3.1 Controle biológico

Do ponto de vista biológico, a produção de um metabólito pode estar fundamentada em vários mecanismos envolvidos na interação entre o microrganismo e seu habitat. A colonização, adaptação e propagação dos fungos endofíticos no hospedeiro, podem ser beneficiadas com a produção de compostos que atuem na competição com outros microrganismos, animais herbívoros e promoção de crescimento vegetal. A produção de metabólitos secundários depende de fatores bióticos e abióticos, e estão intimamente relacionadas com o momento fisiológico do hospedeiro (AZEVEDO et al., 2002; ZHI-LIN et al., 2007).

No Brasil, o controle biológico começou a ser utilizado com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e com o *Baculovirus*, no controle das cigarrinhas da cana e das pastagens, e no controle da *Anticarsia gematalis* na soja, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 1999; BROGLIO-MICHELETTI et al., 2006). Na cultura do cacaueteiro, o fungo *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Moniliophthora perniciosa*, conhecido anteriormente como *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa (SILVA et al., 2008; ALVES, 2005). Já o fungo endofítico *Gliocladium catenulatum* apresentou potencial como antagonista reduzindo em 70% a doença nas mudas de cacaueteiro testadas (RUBINI et al., 2005).

Leveduras são utilizadas no controle biológico preferencialmente pela proteção de frutos destinados ao consumo *in natura*. Por esses organismos terem sua ação antagonica vinculada mais à competição que à antibiose, geralmente não produzem antibióticos, elementos considerados contaminantes químicos nos vegetais, atuando no controle de doenças, principalmente como protetores de infecção (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000).

Mais recentemente, a habilidade das leveduras em atacar hifas e conídios de fungos fitopatogênicos tem sido especulada por contribuir para a atividade de biocontrole sobre a superfície das plantas. Allen et al. (2004) observaram o combate de *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia homoeocarpa* por leveduras do filoplano, comprovado por testes de antagonismo *in vitro*.

Os mecanismos de interações antagonicas que levam ao controle biológico de um determinado organismo são o parasitismo, a antibiose e a indução de resistência. Se mais de um destes mecanismos for utilizado por um microrganismo antagonista, este fato é considerado como uma característica favorável para este ser bem sucedido como agente de biocontrole (BÉLANGER et al., 1994).

2.3.2 Produção de fármacos

Na área de saúde, metabólitos secundários de origem fúngica têm sido de extrema utilidade para indústria farmacêutica. São utilizados como princípio ativo e ajudam a prevenir e curar inúmeras doenças. Metabólitos secundários são formados geralmente nas fases finais do crescimento celular, e aparentemente são substâncias não essenciais para o desenvolvimento do organismo. Dentre os metabólitos secundários podem ser citados antibióticos, pigmentos e toxinas (GUIMARÃES, 2006).

O principal exemplo de metabólito secundário produzido por fungo endofítico é o taxol, cuja estrutura química está apresentada na Figura 3. Este composto vem sendo utilizado no tratamento de câncer de mama e de útero. Sua principal fonte é a árvore *Taxus brevifolia*, encontrada em pântanos e alagadiços da costa oeste norte-americana (AZEVEDO et al., 2002).

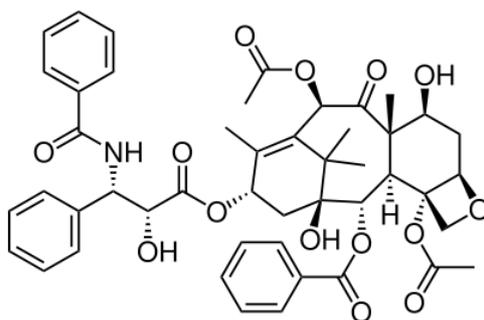


Figura 3 – Estrutura química do taxol.

O fungo endofítico isolado da planta, *Taxomyces adreanae*, também é capaz de sintetizar taxol. Na planta, esse composto confere proteção contra fungos patogênicos à raiz que são característicos de ambientes alagados, como *Phytium* e *Phytophthora*. Sabe-se que vários fungos que colonizam *Taxus* spp. bem como outras plantas que não produzem taxol mas que crescem em solos alagados, também produzem a mesma

substância (AZEVEDO et al., 2002). Este é um exemplo importante que impulsionou os estudos com fungos endofíticos visando a obtenção de metabólitos secundários, isolado por Stierle et al. em 1993.

Zou et al. (2000) isolaram um fungo endofítico da planta *Artemisia mongolica* (Fisch. ex Bess.), da família Asteraceae, identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., que produziu uma substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico. Ainda no mesmo ano, Lu et al. (2000) caracterizaram três novos metabólitos antimicrobianos de uma cultura do fungo *Colletotrichum sp.*, endófito isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L. (Asteraceae), produtora de artemisinina, droga antimalárica muito utilizada na China. No ano seguinte, Shrestha et al. (2001) constataram a produção de paclitaxel (nome comercial do taxol) pelos fungos endofíticos *Sporormia minima* e *Trichothecium sp.*, isolados da planta medicinal *Taxus wallichiana*, da região do Nepal, Índia, criando assim uma nova alternativa de produção de taxol de origem microbiana.

A maioria dos microrganismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo. No entanto, certos endófitos também têm se mostrado potentes produtores de antibióticos, dos quais muitos com propriedades de uso na agricultura e na medicina (STROBEL e DAISY, 2003). Actinomicetos, bactérias e fungos estão entre os produtores mais conhecidos. A vasta maioria de antibióticos atualmente utilizados é produzida por actinomicetos, e em particular por membros do gênero *Streptomyces*. Entre os fungos, *Penicillium* e *Cephalosporium spp.* são os mais conhecidos (STROBEL e DAISY, 2003).

Outro exemplo é a substância vincristina, também com atividade anticancerígena, produzida por um grupo de fungos endofíticos (*Mycelia Sterilia*) associado a *Catharanthus roseus*, isolada por Yang et al. em 2004. Mais recentemente, Eyberger e sua equipe isolaram em seu estudo com o fungo endofítico *Phialocephala fortinii*, associado a *Podophyllum peltatum*, a podofilotoxina, um precursor natural para três drogas anticancerígenas - teniposido, etoposido e etoposido fosfatado - substância primeiramente encontrada na planta *Podophyllum emodi*, mas que apresenta grande dificuldade em ser sintetizada, o que gerou a necessidade por nova fonte natural (STROBEL e DAISY, 2003; GUIMARÃES, 2006; EYBERGUER et al., 2006). Vale ainda mencionar a espécie *Acremonium caenophialum*, um fungo endofítico

de gramíneas, que apresenta efeito inibitório sobre vários patógenos (WHITE e COLE, 1986).

A investigação de microrganismos endofíticos de plantas medicinais da amazônia, como *Copaifera multifuga* (copaíba) vem sendo reportada. O óleo de copaíba tem sido utilizado pela população como antiinflamatório, anti-reumático, cicatrizante, no tratamento de ulcerações e desinfectante das vias urinárias. Os principais gêneros fúngicos isolados da copaíba foram *Guignardia*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Xylaria* e alguns fungos leveduriformes (AZEVEDO et al., 2002). Desta forma, diversos compostos com atividade biológica podem ser encontrados a partir do estudo de fungos endofíticos de plantas amazônicas, principalmente a partir dos gêneros supracitados, uma vez que estes já são conhecidos como produtores de compostos de interesse.

Em geral, pode-se esperar que as condições ambientais em que a planta hospedeira cresce podem influenciar no número e na variedade de fungos endofíticos, bem como na produção de metabólitos secundários. Por exemplo, no estudo com os extratos dos metabólitos de 15 isolados do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* obtidos em 4 continentes, observou-se que apenas dois dos extratos apresentavam perfis cromatográficos idênticos, ou seja, as condições ambientais dos diferentes continentes influenciaram diretamente na produção dos metabólitos de cada espécime (STROBEL et al, 2001).

2.3.3 Produção de enzimas hidrolíticas

As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e têm um papel importante na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e na deterioração dos alimentos. Nas vias metabólicas, agem em seqüências organizadas de rotas catabólicas e anabólicas (LEHNINGER, 1988).

Enzimas extracelulares de fungos são importantes não só para digestão, mas também em muitos casos para o processo de patogenicidade. Além disso, as enzimas podem funcionar como a resistência natural do hospedeiro a uma determinada ameaça, bem como na doação para o hospedeiro de produtos solúveis que podem ser absorvidos e utilizados como alimento pela planta. A produção de proteases extracelulares por

fungos fitopatogênicos foi proposta como uma interação fungo-planta onde as enzimas podem funcionar como fatores de patogenicidade (MOREIRA, 2005).

As enzimas também podem atuar no controle dos processos bioquímicos nas células vivas, podendo ser isoladas de animais, plantas e microrganismos. Os últimos são considerados boas fontes devido à grande diversidade de enzimas industriais que produzem (LIMA et al., 1986).

As enzimas são utilizadas em larga escala na indústria têxtil (amilase, celulase, oxidorreduções), de detergentes (protease, lipase, celulase, oxidorreduções), de alimentos (pectinase, protease, celulase, oxidorreduções), de papel (xilanase, oxidorreduções e lipase) e couro (protease, lipase) (NIELSEN e OXENBOLL, 1998).

As enzimas hidrolíticas são agentes de biocatálise frequentemente utilizados em síntese orgânica que clivam diferentes ligações químicas, em presença de água. Os fungos filamentosos sintetizam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas. Várias espécies desses organismos são usadas para a produção de enzimas industrialmente importantes, tais como proteases, celulases, lipases, entre outras (FRIEDRICH et al., 1999).

Torres et al. (2003) estudaram fungos endofíticos produtores de lipases. Os autores afirmam que atualmente, a maioria das lipases utilizadas em aplicações biotecnológicas são isoladas de fungos. Geralmente, essas enzimas são produtos extracelulares retirados do meio, embora haja indícios consideráveis de que essa atividade também esteja vinculada ao micélio. Além disso, essas lipases podem ser utilizadas naturalmente tornando-as um produto com grande potencial rentável, porque a biomassa pode ser utilizada diretamente, eliminando assim, a necessidade de isolamento, purificação, imobilização da enzima, minimizando a perda da atividade enzimática (TORRES et al., 2003).

As lipases são definidas como carboxilesterases que catalisam a hidrólise e síntese de acilgliceróis de cadeia longa, sendo a trioleína o substrato padrão (JAEGER e EGGERT, 2002). Podem ser aplicadas nas indústrias de detergentes (KIRK et al., 2002) até na síntese de compostos de alto valor agregado (RASOR e VOSS, 2001; LIESE e FILHO, 1999; PANKE e WUBBOLTS, 2002; JAEGER e EGGERT, 2002).

As proteases, além de serem utilizadas em processos industriais como a fabricação de detergentes, na cervejaria e panificação, também, em condições apropriadas, podem catalisar a síntese de peptídeos de alto valor comercial (BEYNON e BOND, 1989). Além dos exemplos já mencionados, a utilização tanto de lipases (YOSHIDA et al., 2003) como de proteases (LÓPEZ-SERRANO et al., 2001), têm representado uma ferramenta valiosa para a resolução racêmica de compostos de interesse. Esta nova tendência observada para a obtenção de moléculas de interesse comercial justifica-se por algumas vantagens que as enzimas apresentam, tais como poucas reações laterais, condições brandas para que as reações ocorram e o fato principal, de que enzimas são biodegradáveis, diminuindo assim os riscos ambientais que ocorrem com processos não-biocatalíticos.

O uso de proteases corresponde a 40% do mercado mundial de biocatalisadores, avaliado em 1 bilhão de dólares (SILVA-NEVES et al., 2006). Entre os microrganismos produtores de enzimas, as leveduras têm destaque como fonte de biocompostos, entre os quais predominam as proteínas. São microrganismos bastante usados na indústria de alimentos porque a maioria das espécies não apresenta características patogênicas (RODRIGUES e SANT'ANNA, 2001).

Xilanases são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por fungos (PHAM et al., 1998), que podem ser empregadas em indústrias de papel como auxiliares no branqueamento de polpas Kraft. Tais enzimas atuam principalmente na degradação do xilano, após o cozimento, na superfície das fibras da polpa, hidrolisando este polissacarídeo e proporcionando maior permeabilidade à estrutura das mesmas. Isto permite maior extração de lignina residual, o que leva à redução no consumo de reagentes químicos à base de cloro durante o processo de branqueamento, tornando-o menos poluente (BAJPAI et al., 1994). Este processo é conduzido sob altas temperaturas e alcalinidade, e as enzimas empregadas devem ser tolerantes a estas condições, além de serem livres de celulasas para que não danifiquem as fibras (DHILLON et al., 2000).

As celulasas, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos microrganismos, para que estes cresçam em celulose (KUBICEK et al., 1993). Grande parte da produção industrial de celulasas é realizada com o emprego de alguns fungos filamentosos, os quais são

eficientes produtores de enzimas hidrolíticas (DURÁN e ESPOSITO, 2000). Do mecanismo de indução de celulases nestes microrganismos, que ainda não está totalmente esclarecido, há evidências da participação de dissacarídeos, como a celobiose e a sofrose (ILMÉN et al., 1997). Adicionalmente, alguns estudos realizados com *Trichoderma reesei* sugerem a possibilidade da utilização do dissacarídeo lactose como substrato indutor para a produção de celulases (ANDREOTTI et al., 1980). Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos (MESTER e TIEN 2000; HOFRICHTER, 2002), principalmente, na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBERG, 1981; KUBICEK et al., 1993).

As amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e microrganismos. Entretanto, devido às vantagens que oferecem, como menor tempo de produção, as amilases produzidas por fungos têm a preferência do mercado de enzimas (REDDY et al., 2003). O gênero *Mucor* constitui um grupo de microrganismos responsável pela produção de amilases amplamente utilizado nas indústrias (ZARE-MAIVAN e SHEARER, 1988; PETRUCCIOLI e FEDERICI, 1992).

As pectinases representam um grupo de enzimas que degradam as substâncias pécticas (CASTILHO et al., 2000; JAYANI et al., 2005). Estes heteropolissacarídeos estruturais caracterizam-se por longas cadeias de resíduos de ácido galacturônico. As pectinases possuem ampla gama de aplicações nas indústrias de alimentos, especialmente na clarificação de sucos, setor farmacêutico e têxtil (ALKORTA et al., 1998; BLANCO et al., 1999), bem como no tratamento de efluentes pécticos. Bactérias, leveduras e fungos tanto em cultivo sólido, como em meio líquido são capazes de produzir essas enzimas (VENDRUSCOLO et al., 2008). O isolamento de microrganismos que produzem eficientemente enzimas pectinolíticas, a seleção das condições ótimas de produção e caracterização bioquímica dessas enzimas, constituem linhas de pesquisa importantes e essenciais para o desenvolvimento de processos biocatalíticos economicamente mais competitivos (MARCHI et al., 2006).

2.3.4 Produção de compostos antioxidantes

Os radicais livres liberados durante o estresse oxidativo são os modificadores de DNA mais amplamente distribuídos no meio intracelular. Eles estão envolvidos na carcinogênese, inflamação, diabetes, aterosclerose, isquemia cerebral e no coração, envelhecimento, entre outros (MARY et al., 2003).

Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos que tem ao menos um elétron desemparelhado, o que os torna altamente reativos. Os radicais livres promovem uma oxidação benéfica que produz energia e mata invasores bacterianos. Em excesso, entretanto, produzem uma oxidação prejudicial que podem danificar membranas e conteúdos celulares (KIM et al., 2006).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes (VALKO et al., 2004). Destas últimas, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (EL-AGAMEY et al., 2004). As estruturas químicas de alguns compostos antioxidantes estão apresentadas na Figura 4.

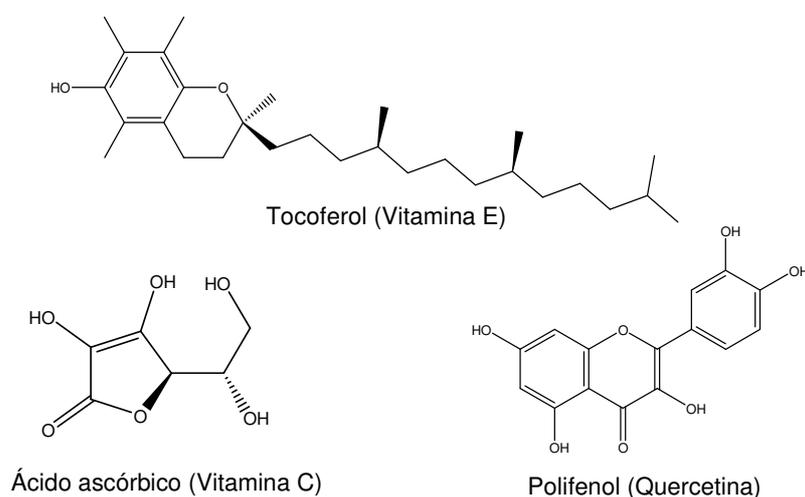


Figura 4 - Estruturas químicas de compostos antioxidantes.

Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter acumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (HASLAM et. al., 1996).

Os compostos antioxidantes são classificados como enzimáticos ou não enzimáticos conforme a estrutura do agente antioxidante. Os fungos filamentosos ou endofíticos, entre eles os dos gêneros *Assochyta*, *Aspergillus*, *Chaetomiun*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Trichothecium* e *Penicillium* (LEKHA e LONSANE, 1997) são produtores de tanase (enzima extracelular, induzível, produzida na presença de ácido tânico por fungos, bactérias e leveduras). Apesar de vários microrganismos produzirem tanase, estas não são igualmente ativas com todos os taninos hidrolisáveis.

Os taninos ocorrem em uma ampla variedade de vegetais, podendo ser encontrados nas raízes, folhas, frutos, sementes e cascas de plantas. São classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e condensados (AGUILAR et al., 2001). Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1966). As tanases de leveduras são efetivas somente na decomposição do ácido tânico. Em contrapartida, as tanases fúngicas são eficientes na degradação de ácido tânico e outros taninos hidrolisáveis que ocorrem na natureza (PINTO, 2003).

Embora existam muitas aplicações industriais da tanase, poucas são efetivamente empregadas devido essencialmente ao custo de produção da enzima, que ainda é elevado. Esta enzima tem vasta aplicação na indústria de alimentos, sucos, cervejaria, cosméticos, farmacêutica e indústria química (LEKHA e LONSANE, 1997). Por esse motivo, a tanase pode ser utilizada para produção de antioxidantes como epigallocatequina, epicatequina e ácido gálico. Segundo Banerjee et al. (2001), o ácido gálico tem várias aplicações na indústria química e farmacêutica. É utilizado para síntese de propil galato, pirogalol, trimetropim e resinas semicondutoras. O propil galato é uma substância amplamente utilizada como aditivo na indústria de alimentos e como antioxidante em óleos e produtos ricos em lipídeos. O pirogalol é utilizado como conservante na indústria de alimentos (LEKHA e LONSANE, 1997), e o trimetropim é um agente antibacteriano utilizado na indústria farmacêutica (AGUILAR e GUTIÉRREZ-SANCHEZ, 2001).

Além disso, os fungos constituem um ótimo modelo para estudos em eucariontes devido à sua simplicidade, se comparado a outros seres. Eles possuem entre 30 a 35 milhões de pares de nucleotídeos no genoma sendo que diversas características do DNA

de fungos são semelhantes a de outros eucariontes. Por exemplo, seus cromossomos também possuem histonas e centrômeros; seus genes possuem introns e exons; entre outras (TUDZYNSKI e TUDZYNSKI, 1997; AZEVEDO, 2004).

As potencialidades dos fungos endofíticos em muitos casos estão diretamente relacionadas a seus hospedeiros. Dessa forma, investigar espécies que já estão descritas na literatura como produtoras de algumas substâncias de interesse comercial são extremamente necessárias.

A Amazônia tem um largo histórico quanto à produção de compostos a partir de plantas. No entanto, os estudos relacionados a endófitos ainda são inexpressivos.

2.4 Família Piperaceae

Piperaceae é uma família de plantas dicotiledôneas, que pertence à ordem *Piperales*, que por sua vez, foi descrita por Paul Dietrich Giseke. É composta por 12 gêneros e cerca de 3000 espécies, sendo que, destes gêneros, apenas cinco são encontrados no Brasil (ROSA e SOUZA, 2004). Desses cinco, maior destaque é dado aos gêneros *Piper*, *Piperomia* e *Pothomorphe*, pela sua ampla distribuição e diversidade (LAGO et al., 2004, FAZOLIN, et al., 2007).

A família Piperaceae é comum em diversas localidades, muitas vezes dominando a borda ou o extrato inferior das matas. Esta família é representada por ervas eretas ou escandentes, subarbustos, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas. Possui folhas estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas das mais diversas, tricomas muito variados, geralmente dotadas de glândulas translúcidas e sua inflorescência apresenta-se em forma de espiga com as flores (JARAMILLO e MANOS, 2001; LAGO et al., 2004; FAZOLIN et al., 2007).

As espécies da família Piperaceae possuem importância comercial, econômica e medicinal. Além do interesse ornamental por sua folhagem vistosa, as plantas desta família são mundialmente importantes para o mercado de condimentos. Os frutos maduros de *Piper nigrum* são a fonte da pimenta branca, enquanto os frutos imaturos da mesma espécie são da pimenta preta (PARMAR et al., 1997). As propriedades inseticidas de extratos da pimenta do reino (*P. nigrum* L.) são conhecidas desde 1924 e mostraram-se tóxicas para a mosca doméstica *Musa domestica* L. (Diptera: Muscidae),

para o mosquito *Culex pipiens* Palex (Diptera: Culicidae) e o gorgulho-do-caupi *Callosobruchos chinensis* L. (Coleoptera: Bruchidea) (ESTRELA et al., 2003).

Além de apresentar importância econômica para o mercado de condimentos e atividade inseticida, esta família possui grande diversidade estrutural em relação aos seus constituintes químicos, contendo lignanas, flavonóides, alcalóides e amidas (SILVA et al., 2008).

A maioria dos trabalhos utilizando Piperáceas na área medicinal é realizada por pesquisadores da China e Índia, sendo que a maioria deles está relacionada com plantas do gênero *Piper* que se encontram distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Um extraordinário número de espécies do gênero *Piper* aparece em farmacopéias de todo mundo, sendo considerado o gênero mais estudado (PARMAR et al., 1997). Muitas das espécies deste gênero são fontes ricas em compostos biologicamente ativos, que constituem matrizes para estudos biossintéticos importantes, principalmente para indústria de fármacos (SILVA e BASTOS, 2007).

2.4.1 Gênero *Piper*

As plantas do gênero *Piper* são popularmente conhecidas como pimenteiras ou falsos-jaborandís. Este gênero é composto por arbustos, herbáceas, lianas ou pequenas árvores, com folhas alternadas, simples, inteiras, geralmente assimétricas, peninérveas ou palminérveas. O fruto é uma drupa pequena, em forma de espiga, com sementes minúsculas (JARAMILLO e MANOS, 2001).

As espécies deste gênero encontram-se extensamente distribuídas na vegetação secundária de florestas tropicais, particularmente na Ásia e na Amazônia (MOTA et al., 2001) e cerca de 1000 espécies estão distribuídas nos hemisférios. Dentre estas espécies, apenas 12% vêm sendo estudadas (SOUTO, 2006), sendo que grande parte delas são plantas pioneiras e estão envolvidas em processos de regeneração e manutenção da diversidade das matas.

Como mencionado anteriormente, algumas espécies do gênero *Piper sp.* despertam interesse por produzirem compostos bioativos, tais como alcalóides, flavonóides e lignóides que são utilizados na medicina popular e também em outras aplicações como, por exemplo, alimento, plantas ornamentais, especiarias, na produção

de perfumes, inseticidas, fungicidas e bactericidas (SCHULTES e RAFFAUF, 1990; HEGNAUER, 1990; JENSEN et al., 1993; THIES e KALKO, 2004; LAGO, 2005).

Os estudos com espécies desse gênero têm revelado a presença de fenilpropanóides, os quais têm sido caracterizados nos óleos essenciais (OE) produzidos por várias espécies do gênero *Piper* (PESSINI et al., 2005).

Os óleos essenciais presentes nas espécies de *Piper*, tais como safrol, miristicina, eugenol, dilapiol e apiol (Figura 5) representam uma classe de substâncias que tem merecido especial atenção, pois pode apresentar inúmeras aplicações de interesse biotecnológico e industrial, tais como antiinflamatória, anti-hemorrágica, adstringente, diurética, entre outras. Os óleos essenciais também apresentam atividade inseticida, bactericida e fungicida (BESSIERE et al., 1994; VÉRAS e YUYAMA, 2000; MARTINS et al., 2000; MORANDIM et al., 2003; FIGUEIRA et al., 2003; BASTOS et al., 2003).

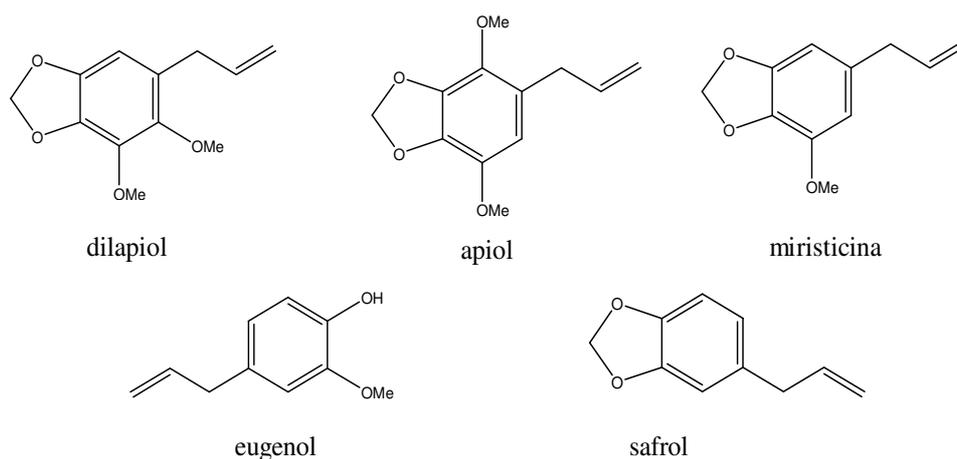


Figura 5 - Estruturas químicas de óleos essenciais produzidos por plantas do gênero *Piper*.

Muitos exemplos poderiam ser dados com relação à aplicabilidade de extratos e óleos essenciais de plantas do gênero *Piper*, porém vale ressaltar as diversas pesquisas realizadas com plantas de *P. hispidum*, uma excelente produtora de óleo essencial, o qual possui como componente majoritário o safrol (OLIVEIRA et al., 2007; LOBATO et al., 2006).

2.4.2 *Piper hispidum*

A espécie *P. hispidum* (Figura 6) constantemente confundida com uma outra espécie do mesmo gênero, a *Piper aduncum*, ocorre na Amazônia (GAIA et al., 2004) mas também pode ser encontrada no México, Suriname, Cuba, Sul da Flórida, Trinidad Tobago e Jamaica, e é muito comum na Costa Rica (FAZOLIN et al., 2005). *P. hispidum*, ou pimenta de macaco, como é conhecida popularmente, possui grande potencial para exploração econômica devido à produção de safrol. Produtos naturais de *P. hispidum* têm apresentado ação eficaz no controle de fitopatógenos de culturas tradicionais, além de ação acaricida, bactericida, anti-molusco e larvicida, com a vantagem destes produtos serem biodegradáveis (ORJALA et al., 1994; WADT et al., 2004; BASTOS, 2004; MORANDIM et al., 2005), além de comprovada ação analgésica, diurética e antiinflamatória, apresentando baixos níveis de toxicidade (MAIA et al., 1998; MONTEIRO et al., 2001; FONTES JUNIOR et al., 2002).



Figura 6 - Planta da espécie *Piper hispidum*.

Diversas espécies do gênero *Piper*, como a *P. arboreum*, *P. dilatatum*, *P. goesii*, *P. hispidum*, *P. hoffmanseffianum*, *P. nigrum*, *P. gaudichaudianum*, *P. guineense*, *P. molliconum*, *P. regnellii*, *P. aduncum* e *P. cernuum* produzem o óleo essencial safrol. No entanto, apenas *P. hispidum* produz em quantidade e grau de rendimento satisfatório para a utilização nas indústrias (NAVICKIENE, 2006; BASTOS, 2004).

Com isso a utilização de fungos endofíticos de *P. hispidum* é importante para garantir a preservação da espécie, mantendo a produção de compostos com potencial biotecnológico. Além disso, a possibilidade de que novos compostos de valor econômico sejam descobertos (antibióticos, antifúngicos, antioxidantes, enzimas) é imensa, uma vez que estudos com esses organismos ainda são incipientes na Amazônia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Piper hispidum* da cidade de Manaus, visando a obtenção de bioprodutos de interesse comercial.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar fungos endofíticos de *P. hispidum*;
- Comparar a diversidade dos fungos obtidos nos diferentes tecidos vegetais;
- Avaliar os isolados quanto à produção de compostos antimicrobianos;
- Avaliar os isolados quanto à produção de enzimas de interesse comercial (amilase, celulase, xilanase, lipase, pectinase e protease);
- Avaliar os fungos quanto à capacidade biocatalítica em reações de esterificação;
- Avaliar os isolados quanto à produção de terpenos;
- Avaliar os isolados quanto à produção de compostos antioxidantes;
- Preservar os isolados obtidos na coleção de fungos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta da Planta e Isolamento dos Fungos

Diferentes partes do material vegetal de *P. hispidum* foram coletadas na região urbana de Manaus para isolamento de seus fungos endofíticos. Foram coletados dois espécimes de *P. hispidum*. A amostra 1 foi coletada na Avenida do Futuro (coordenadas 3° 3'4.42"S e 60° 4'0.32"O) e a amostra 2 em uma área de cultivo ornamental (coordenadas 3° 6'17.31"S e 59° 59'27.57"O), conforme pode ser visto na Figura 7.

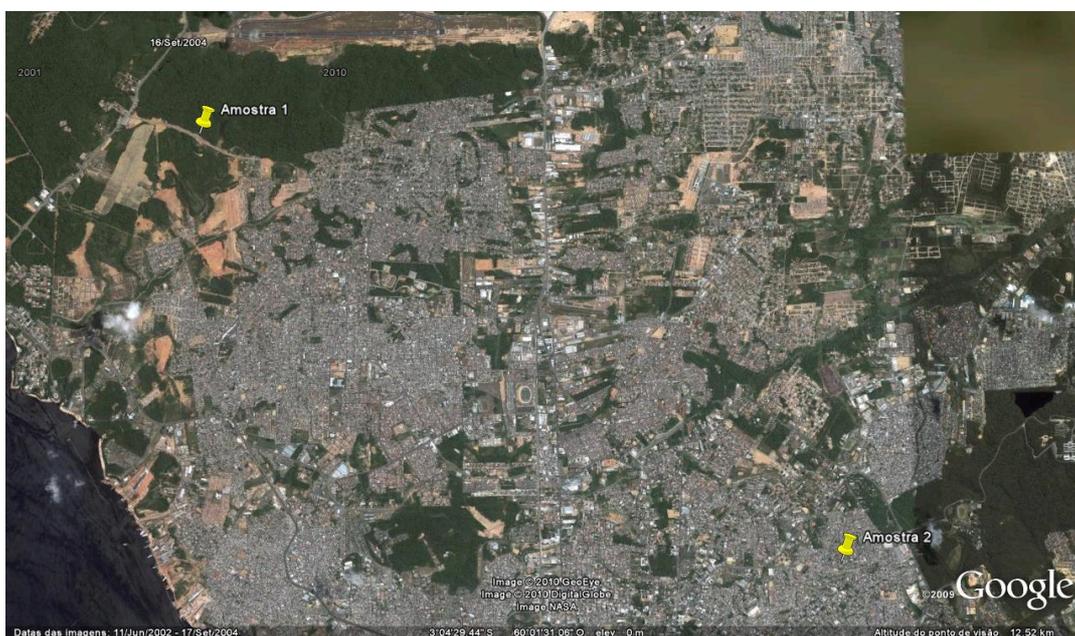


Figura 7 - Foto de satélite dos locais de coleta.

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados com local e data, e transportadas sob temperatura de 4°C, para o laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

A partir da desinfecção superficial, os fungos que são recuperados dos fragmentos do material vegetal após o processo são considerados fungos endofíticos. Foram utilizados entre 10 e 30 fragmentos de folhas e caules das plantas selecionadas (ARAÚJO et al., 2002).

Para início do isolamento foi necessário eliminar a comunidade epifítica, mantendo viável a comunidade endofítica do material vegetal. Para tanto, as amostras vegetais coletadas foram lavadas em água corrente e com detergente neutro. Foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 10 a 12 cm, submetidas a uma seqüência de submersões em soluções na seguinte ordem e tempo: álcool a 70% por 1 min.; hipoclorito de sódio a 3% por 2 min. para a folha, 4 min. para o caule e raiz; álcool a 70% por 30 s para folha, 1 min. para caule e raiz; e água destilada estéril por 2 min. para todos os tecidos (ARAÚJO et al., 2002).

Após a desinfecção superficial, as extremidades dos tecidos foram desprezados e o material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos e inoculados em placas de petri – 5 fragmentos em cada placa - contendo meio ágar batata dextrose (BDA) preparado no laboratório e autoclavado, acrescido de amoxicilina (0,5 g/L) para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. Como contraprova de esterilização foram semeadas em meio BDA alíquotas de água da última lavagem dos fragmentos vegetais. As placas foram incubadas sob temperatura de 28°C por 7 a 14 dias, conforme observação macroscópica do crescimento dos fungos (ARAÚJO et al., 2002; GUIMARÃES, 2005).

A taxa de colonização fúngica (TC) foi observada por avaliação macroscópica dos microrganismos isolados, e determinada a partir da seguinte equação:

$$TC = \frac{n^{\circ} \text{ de fragmentos vegetais com crescimento fúngico}}{n^{\circ} \text{ total de fragmentos vegetais}}$$

4.2 Purificação dos Isolados

A técnica de purificação por esgotamento foi utilizada para obtenção de colônias isoladas. Essa técnica consiste em fazer estrias, com auxílio de uma alça de platina, em meio sólido, onde, por esgotamento, se obtêm colônias isoladas no final das estrias. O meio utilizado para purificação foi o mesmo utilizado na inoculação inicial (BDA), para permitir a manutenção das características de cada fungo. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 a 2 dias a 28°C (ARAÚJO et al., 2002).

Posteriormente, foi retirada a colônia isolada, a qual foi inoculada no centro de outra placa com o mesmo meio de cultura. Assim, foi possível identificar as características de crescimento de cada fungo (ARAÚJO et al., 2002).

Os isolados foram identificados após a purificação por um código que consistia nas iniciais da planta PH (*P. hispidum*), uma letra representando o tecido do qual foi retirado (F para Folha, C para caule e R para raiz), seguida de um número que indica a ordem de purificação (exemplo: PH-F 2).

4.3 Caracterização Morfológica dos Isolados

A diversidade dos fungos obtidos nos diferentes tecidos vegetais foi determinada a partir da contagem das colônias purificadas, as quais foram agrupadas de acordo com suas características morfológicas.

A identificação dos fungos foi feita através da análise macroscópica das características dos fungos e análise microscópica das estruturas reprodutivas, estruturas de resistência ou morfologia das hifas, através de microcultivo. Foram consideradas características das culturas quanto: cor, textura, topografia, pigmento difuso, cor do verso da colônia e topografia do verso da colônia. Foi retirado um fragmento da colônia isolada e colocado em uma lâmina previamente esterilizada em autoclave para realização do microcultivo. As estruturas foram coradas com azul de lactofenol e observadas ao microscópio óptico em um aumento de 400 X. Foram observadas as septações das hifas, cor, esporos, presença de estrutura de resistência e ramificações (SOARES et al., 1987). As estruturas observadas foram comparadas com as estruturas descritas na literatura e documentadas por foto.

4.4 Preservação dos Isolados

Os fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* foram armazenados utilizando-se dois métodos: o tubo com meio de cultura inclinado submerso em óleo mineral e o método de Castellani (1939), no qual o fragmento da colônia com meio é colocado em água estéril dentro de frascos fechados. Ambos os métodos podem manter os microrganismos por um período de 1 a 4 anos. Os tubos e frascos com os isolados foram marcados com o código da coleção do MBT e data de armazenamento, e mantidos a 4°C e em temperatura ambiente.

4.5 Obtenção de Metabólitos Secundários

Discos dos meios sólidos contendo micélio dos fungos isolados foram transferidos para frascos erlenmeyer de 150 mL com 50 mL de meio líquido batata-dextrose acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis, conforme o método descrito por Souza et al. (2004) com modificações. Os frascos foram incubados sem agitação por 14 dias a uma temperatura de 28°C. Em seguida, o caldo de fermentação foi filtrado para separação do sobrenadante e do micélio. O sobrenadante contendo os metabólitos secundários de interesse foi utilizado nos testes de atividade antimicrobiana e de atividade antioxidante. O micélio dos fungos que apresentaram bioatividade foi utilizado para extração de DNA.

4.6 Ensaio de Atividade Antimicrobiana

Os sobrenadantes foram utilizados para testes de antagonismo *in vitro* contra linhagens-teste de: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei*. Foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina para que atingisse a mesma coloração da escala *MacFarland* n° 1 a 2. Com auxílio de um *swab*, a suspensão bacteriana foi inoculada em ágar Müller Hinton (MHA) da Merk® por toda superfície da placa. Foram feitos pequenos poços com 0,5 cm de diâmetro cada no meio de cultura de cada placa para adicionar 100 µL dos sobrenadantes. Para o controle negativo, todas as linhagens tiveram poços testados com o meio líquido de batata-dextrose.

As placas foram incubadas em aerobiose por 18 a 24 h sob temperatura de 35-37°C. Os sobrenadantes que indicaram resultado positivo para inibição de algum dos microrganismos teste foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a fim de comparar seu perfil cromatográfico ao de dois antibióticos comerciais (amoxicilina e cefaloxina). Para obtenção dos cromatogramas, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian® ProStar 310 utilizando coluna C18 (Varian®) de 250 x 4,6 mm, detector UV-Vis a 227 nm, e acetonitrila/tampão fosfato de sódio 25 mM pH 3,0 (20:80) como eluente.

4.7 Ensaio de Atividade Antioxidante

4.7.1 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos com difenil-picril-hidrazina (DPPH)

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 517 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no extrato fúngico (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998).

Transferiu-se 900 µL da solução padrão de DPPH (Sigma®) com concentração de 27 µg/mL para um microtubo e adicionou-se 10 µL do sobrenadante (extrato fúngico). A mistura foi homogeneizada e em seguida, adicionou-se 90 µL de metanol P.A., homogeneizando também essa mistura. O branco foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por metanol. A absorbância das amostras a 517 nm foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (Nova 2102 UVPC) Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para comparar a atividade antioxidante dos extratos fúngicos com o ácido ascórbico, conhecido antioxidante, foi preparada uma curva analítica com diferentes concentrações de ácido ascórbico.

4.7.2 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos usando Fe^{3+} como agente oxidante

Transferiu-se 10 µL da solução padrão de Fe^{3+} com concentração de 1000 µg/mL para um microtubo e adicionou-se 10 µL do sobrenadante (extrato fúngico). A mistura foi homogeneizada e em seguida, adicionou se 980 µL da solução de 1,10-fenantrolina a 0,25% homogeneizando também essa mistura. O branco foi preparado de

modo semelhante, substituindo a amostra por água deionizada. Após uma hora de reação, mediu-se a absorvância a 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Uma curva analítica com diferentes concentrações de ácido ascórbico foi preparada para fins de comparação com a atividade antioxidante dos extratos fúngicos.

4.8 Avaliação da Produção de Óleos Essenciais

Os extratos fúngicos que apresentaram atividade antimicrobiana foram submetidos à análise por CLAE (Varian® ProStar 310) utilizando coluna C18 de 250 x 4,6 mm, detector UV-Vis a 257 nm, e um gradiente acetonitrila/água como eluente (até 5 min. 50:50 H₂O/ACN; de 5 a 10 min. 100% ACN de 10 a 35 min. 100% ACN). Os cromatogramas obtidos foram comparados com padrões de diferentes terpenos para verificar a possível produção de óleos essenciais. Foi verificada a presença dos seguintes compostos: citronelol (Acros, 95%); β -cariofileno (Aldrich, 98%); (*R*)-carvona (Aldrich, 98%); α -pineno (Fluka, 98%); terpinoleno (Fluka, 85%); e safrol (Sigma, $\geq 97\%$). As estruturas químicas destes padrões podem ser observadas na Figura 8.

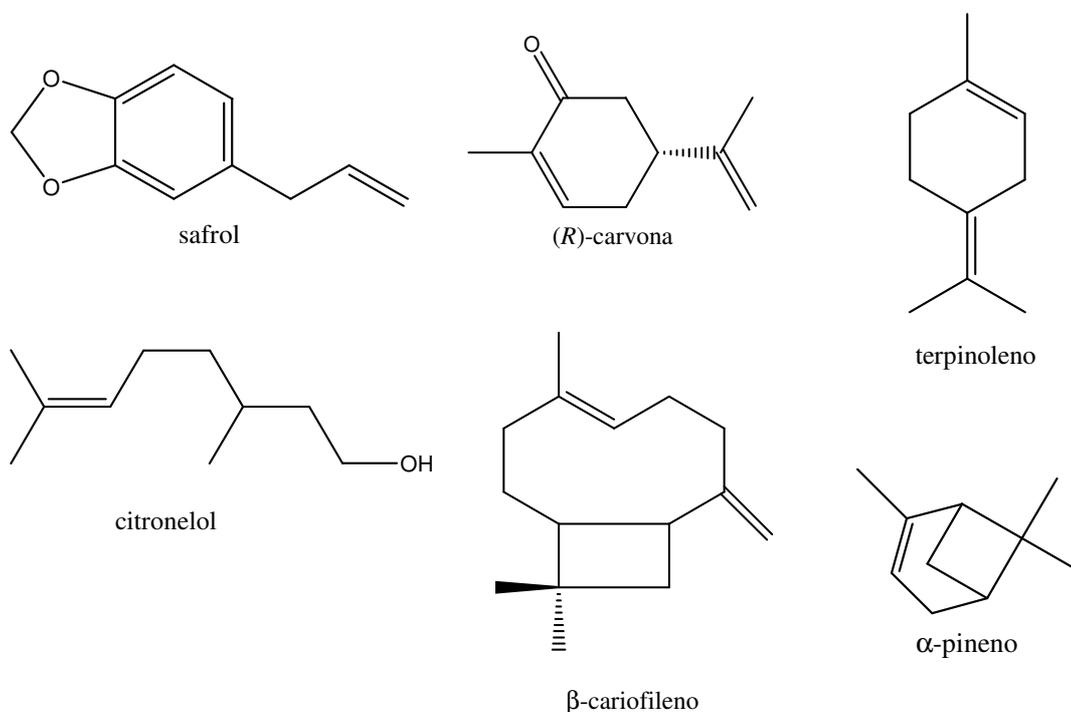


Figura 8 – Estruturas químicas dos terpenos analisados.

4.9 Ensaios Qualitativos para a Avaliação da Produção de Enzimas Hidrolíticas

Após o crescimento dos isolados endofíticos de *P. hispidum* em meio BDA a 28°C, foram realizados repiques destes para placas contendo meio de cultura específico para avaliar a produção de cada enzima. Para a avaliação da produção de amilase, protease, celulase e pectinase foi seguido o protocolo desenvolvido por Teixeira (1994). Para avaliar a produção de amilase, o meio de cultura utilizado foi o ágar amido, composto por amido (1,0%) e ágar (1,8%) diluídos em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0. Para os bioensaios referentes à protease, o meio foi composto por agar (1,8%), gelatina (1,0%), leite desnatado (1,0%) e tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0. Para o estudo da produção de celulase, foi utilizado ágar (1,8%), carboximetilcelulose (1,0%) e tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Para a identificação da produção de pectinase foi utilizado 1,8% de ágar, 1,0% de pectina cítrica e tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Para avaliar a produção de xilanase foi seguido o protocolo de Silva et al. (2005) utilizado o meio de cultura contendo xilano (1,0%) e ágar (1,8%) em água destilada.

As placas foram incubadas por até 72 h a 30°C e em seguida foi utilizada uma solução reveladora (celulose: vermelho congo a 0,1%; pectinase e xilanase: ácido clorídrico 5 M; amilase: iodo a 1,0%) para visualização do halo, indicativo da produção de enzimas (TEIXEIRA, 1994). O halo indicativo da produção de protease pode ser visto sem solução reveladora.

Para a seleção de fungos produtores de lipases utilizou-se o método de hidrólise de triacilglicerol na presença de Rodamina B (SHELLEY et al., 1987). Para tanto, prepararam-se placas contendo o corante (0,001%), ágar (15,0 g/L), Tween 80® (0,001 g/L) e óleo de oliva (1,0 %). As placas foram inoculadas com os isolados previamente cultivados em meio BDA e incubadas a 25°C por 7 dias. A formação de halo ao redor das colônias foi observado para os isolados que apresentaram atividade.

4.10 Ensaios Biocatalíticos de Fungos Produtores de Lipases

Os fungos que apresentaram resultado positivo para a produção de lipase foram cultivados em meio indutor da produção destas enzimas (KORITALA et al., 1987), contendo 2,0 g/L de L-asparagina, 2,0 g/L de glicose, 1,0 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 5,0 mg/L de hidrocloreto de tiamina, 1,45 mg/L de Fe(NO₃)₃.7H₂O, e 0,235

mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Após ajuste do pH para 5,5-6,0 o meio foi autoclavado (121 °C por 15 min) em alíquotas de 200 mL. Após resfriamento, foi adicionado 2% (v/v) de óleo de girassol (Sigma®) em condições assépticas. O meio foi inoculado com quatro discos cortados de BDA contendo o micélio fúngico e então incubado a 28°C por 9 dias em um agitador orbital a 200 rpm.

O micélio foi coletado do meio de cultura por filtração a vácuo em funil de Büchner, sendo em seguida, lavado com água destilada e acetona, seco em dessecador sob vácuo por 24 h e triturado a pó (TORRES et al., 2003). Foram utilizados 50 mg de micélio seco em cada reação biocatalítica (ZANOTTO et al., 2009). As reações foram realizadas em duplicata.

Para estudar o potencial biocatalítico dos isolados selecionados como produtores de lipase foi realizada uma reação padrão em meio orgânico: esterificação do ácido linoléico com dodecanol (Figura 9). Foi utilizada uma solução 50 mM de ácido linoléico e 50 mM de dodecanol em *n*-hexano. As reações biocatalíticas foram realizadas sob agitação constante a 28°C. Alíquotas foram retiradas periodicamente para o acompanhamento das reações.

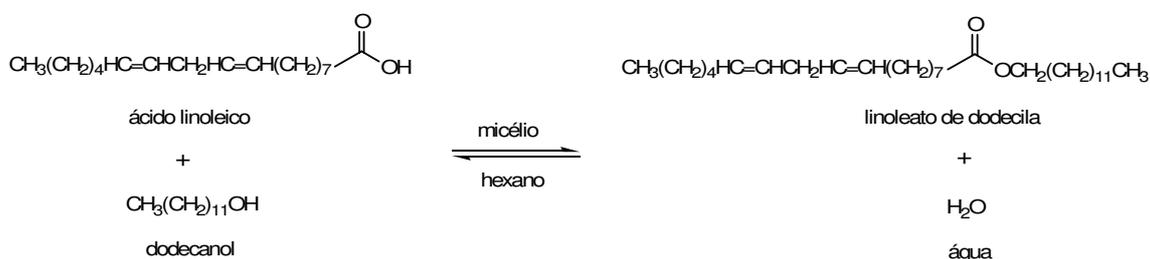


Figura 9 – Reação biocatalítica padrão.

As reações biocatalíticas foram avaliadas utilizando cromatográfico de fase líquida (Varian ProStar 310), equipado com coluna ChromSpher-C4 e detector UV-Vis a 210 nm. Como eluente foi utilizado um gradiente de acetonitrila/água (até 1 min. 75:25 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$; de 1 a 25 min. 100% ACN).

A enzima comercial Novozym® 435 (100% de conversão) foi utilizada como padrão biocatalítico (ZANOTTO et al., 2009).

4.11 Extração de DNA dos Isolados com Potencial Biotecnológico

Os isolados que produziram extratos e/ou compostos com bioatividade foram devidamente identificados taxonomicamente por características morfológicas e submetidos à extração de DNA, a fim de posteriormente serem identificados por técnicas de biologia molecular.

Amostras de micélios isolados dos fungos selecionados foram transferidas para tubos de 1,0 mL contendo solução de extração de DNA e em seguida foram adotados procedimentos de extração conforme protocolo do kit de extração Wizard Genomic DNA Purifications, da Promega™.

Os DNAs extraídos dos isolados que tiveram atividade para qualquer dos ensaios avaliados foram devidamente armazenados para prospecções posteriores.

4.12 Meios de Cultura e Soluções

4.12.1 Batata Dextrose Ágar (BDA)

Infusão de 200g de batata	500 mL
Glicose	20 g
Ágar	17 g
Água destilada – completar volume para	1000 mL
pH	6,8

O meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 20 minutos e mantido a temperatura ambiente. O meio de cultura líquido de batata-dextrose foi preparado com os mesmos reagentes do meio BDA, sem o ágar.

4.12.2 Tampão de Extração de DNA de Fungos Filamentosos (Raeder & Broda, 1985)

Tris-HCl 1M pH 8,0	2 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	0,5 mL
SDS 10%	1 mL
NaCl 5M	0,5 mL
H ₂ O destilada	6 mL

O tampão foi preparado no momento do uso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e Purificação dos Fungos Endofíticos

Dos dois espécimes de *P. hispidum*, foram isolados 58 fungos endofíticos, utilizando 25 fragmentos de cada tecido vegetal (raiz, caule e folha). No total, foram encontrados 120 fungos a partir dos 150 fragmentos coletados de *P. hispidum*, demonstrando a eficiência do método de isolamento empregado (80% do total de fragmentos apresentaram crescimento fúngico). Cabe ainda mencionar que para o isolamento foi utilizado apenas o meio BDA, escolhido no intuito de reduzir os custos durante o desenvolvimento do trabalho.

Considerando que grande parte da metodologia para avaliação do potencial biotecnológico de isolados fúngicos não estava padronizada no Laboratório de Biorgânica do MBT, optou-se por trabalhar com um número reduzido de fungos endofíticos de *P. hispidum*. Sendo assim, apenas 58 fungos foram isolados, embora 120 tenham sido encontrados. Durante esta pré-seleção, procurou-se isolar fungos de diferentes grupos morfológicos.

Verificou-se o crescimento de um maior número de fungos endofíticos a partir das folhas de cada amostra de *P. hispidum*, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de fragmentos coletados, número de fungos encontrados, número de fungos isolados e taxa de colonização dos espécimes cultivados.

	Código	Quantidade de fragmentos	Fungos encontrados	Fungos isolados	Taxa de colonização
Amostra 1	PH-F	25	22	13	0,88
	PH-C	25	18	8	0,72
	PH-R	25	19	6	0,76
Total			59	27	0,79
Amostra 2	PH-F	25	25	14	1,00
	PH-C	25	21	10	0,84
	PH-R	25	15	7	0,60
Total			61	31	0,81

Guimarães (2006) sugeriu que existem duas maneiras para disseminação dos fungos na planta: a transferência vertical quando os fungos são transmitidos através da semente e a transferência horizontal quando as colônias fúngicas são passadas de planta para planta. Considerando um conjunto de fatores tais como: disseminação horizontal dos fungos, e assepsia branda para este tecido, pode-se justificar a obtenção de um maior número de isolados fúngicos nas folhas. Além disso, os tecidos de galhos e caule apresentam maior resistência frente às alterações no habitat natural, oferecendo então, um ambiente menos favorável ao fluxo de microrganismos nesses tecidos.

A obtenção de valores de taxa de colonização maiores que 0,5 em todos os tecidos vegetais demonstra que a utilização dessa técnica para isolamento de fungos endofíticos foi eficaz, promovendo a obtenção de um número significativo de isolados fúngicos nos dois espécimes de *P. hispidum*.

A taxa de colonização foi igual a 1,00 nas folhas do espécime 2, ou seja, foram encontrados fungos em todos os fragmentos cultivados. Para caule e raiz, os valores de taxa de colonização permaneceram próximos na amostra 1 (0,72 e 0,74, respectivamente), ao contrário do que foi observado para a amostra 2, onde obteve-se TC de 0,84 para o caule e de 0,60 para a raiz.

A amostra 2 apresentou uma taxa de colonização total de 0,81, ou seja, de todos os fragmentos inoculados, apenas 19% não apresentaram crescimento fúngico. Este fato pode estar relacionado à diversidade de interações do espécime de *P. hispidum* com outras plantas, ou ao manejo daquela região (proximidades do campus universitário da UFAM) onde a amostra foi coletada, pois das duas espécimes estudadas, a amostra 2 apresentava (visualmente) uma maior interação com espécies distintas, tais como mangueiras (*Mangifera indica* L.), orquídeas (família Orchidaceae), caramboleiras, (*Averrhoa carambola*), aceroleiras (*Malpighia emarginata*) e muitas outras espécies. Portanto, este arbusto apresentava uma abundância de interações com plantas, animais e insetos, além de estar sujeito a adversidades ambientais causadas pela poluição atmosférica. Sendo assim, devido a estas diversas interações, pode-se sugerir que a amostra 2 possui uma boa distribuição de endófitos entre os espaços intercelulares de suas folhas, raiz e caule, refletindo na alta taxa de colonização.

A amostra 1 apresentou um valor de taxa de colonização total de 0,79, próximo do valor de TC obtido para o espécime 2. Apesar de estar em uma área aberta, a amostra

2 parecia ter uma menor abundância de interações com outras espécies, pois era visível que havia poucas espécies diferentes interagindo naquela região, que assemelhava-se a uma região de monocultura.

Os 58 isolados de *P. hispidum* foram devidamente armazenados e utilizados nas etapas subsequentes.

5.2 Caracterização Morfológica dos Isolados

Os 58 fungos isolados foram divididos em 9 grupos de acordo com as características macro-morfológicas das colônias, observadas após um período de crescimento de até quatorze dias a uma temperatura de 28°C em meio BDA. A Figura 10 apresenta a diferença morfológica entre os isolados que variaram desde a pigmentação do meio, forma e tempo de crescimento da colônia, até a coloração micelial.

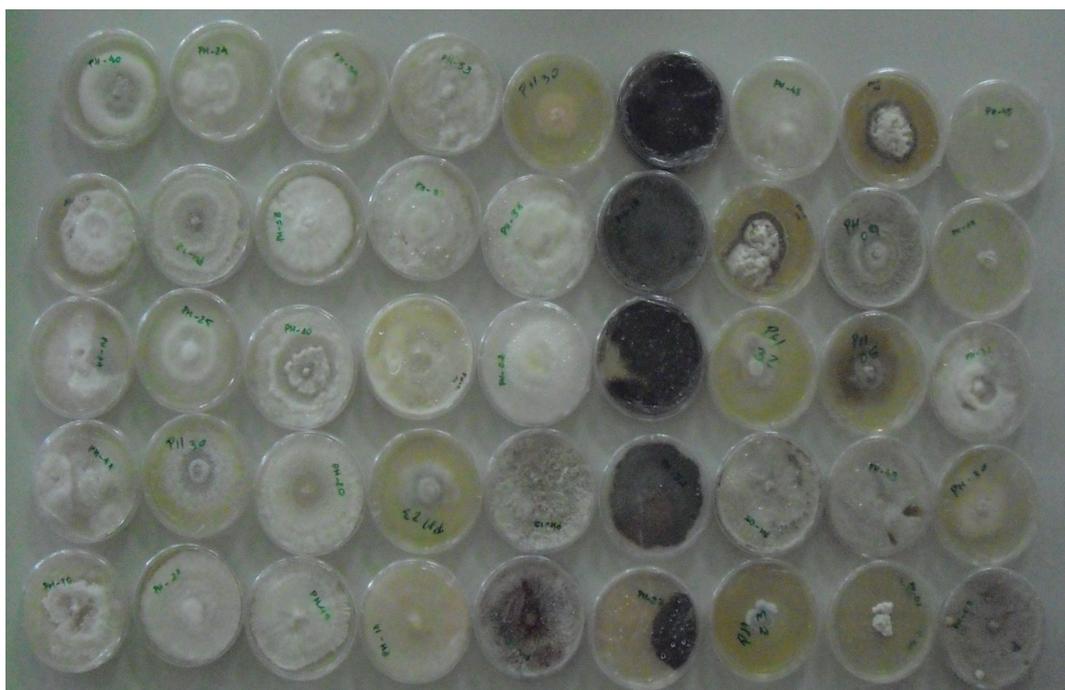


Figura 10 – Diversidade morfológica de fungos endofíticos de *P. hispidum*.

A Tabela 2 apresenta as características observadas em cada grupo morfológico formado. A partir da formação dos 9 grupos morfológicos, os prováveis gêneros dos isolados de *P. hispidum* são *Paecilomyces sp.*; *Aspergillus*; *Fusarium*; *Colletotrichum*; *Guignardia*; *Peniophora*; *Glomerella*; *Curvularia*; e um grupo que não apresentou características para uma provável identificação (*Mycelia sterilia*).

Tabela 2 - Descrição das características morfológicas dos grupos obtidos no isolamento de fungos endofíticos de *P. hispidum*.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS	Possível Gênero	Nº DE ISOLADOS
I	Cor creme a marrom. Textura pulverulenta ou aveludada. Os conídios são elípticos a oblongos, de coloração hialina a pigmentado, ocorrendo em grandes cadeias lineares.	<i>Paecilomyces</i>	11
II	Cor verde. Colônia pulverulenta aveludada a cotonosa. Inicialmente branca, adquirindo coloração verde. Conidióforos terminando em uma vesícula globosa.	<i>Aspergillus</i>	3
III	Cor rosa. Textura cotonosa a lanosa. Os macroconídios são grandes, claros, multiseptados, em forma de foice ou canoa, produzidos em macroconidióforos simples ou ramificados.	<i>Fusarium</i>	5
IV	Cor bege. Colônia lanosa a aveludada. Hifa septada apresentando conidióforos hialinos a castanhos, produzindo conídios unicelulares que podem se tornar septados.	<i>Colletotrichum</i>	7
V	Cor preto a cinza. Textura granular com borda da colônia irregular. Crescimento lento. Picnídios negros.	<i>Guignardia</i>	14
VI	Cor verde. Textura inicialmente aveludada, tornando-se pulverulenta, podendo apresentar borda branca. O fundo pode ser marrom amarelado. Hifa septada, apresentando conidióforos simples ou ramificados.	<i>Peniophora</i>	5
VII	Cor amarela. Textura cotonosa. Hifa septada e nodosa de paredes finas. Não foram observados conidióforos.	<i>Glomerella</i>	3
VIII	Cor cinza. Colônia lanosa a aveludada. Hifa septada apresentando conidióforos hialinos a castanhos, produzindo conídios unicelulares que podem se tornar septados. Os conídios podem ser ovais, oblongos ou falcados.	<i>Curvularia</i>	4
IX	Outros. Características variadas.	-	6 (10,3%)
Total			58

Na Figura 11, pode-se observar que cerca de 24% dos fungos foram classificados no grupo V, cujas características indicam o provável gênero *Guignardia*. Para o grupo I foram 19% do total de isolados (provável gênero *Paecilomyces*). Estes resultados são semelhantes aos que Strobel e colaboradores observaram em seus experimentos de isolamento de fungos endofíticos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), onde a maior parte dos fungos isolados está classificada como Ascomicetos (Strobel et al., 2001).

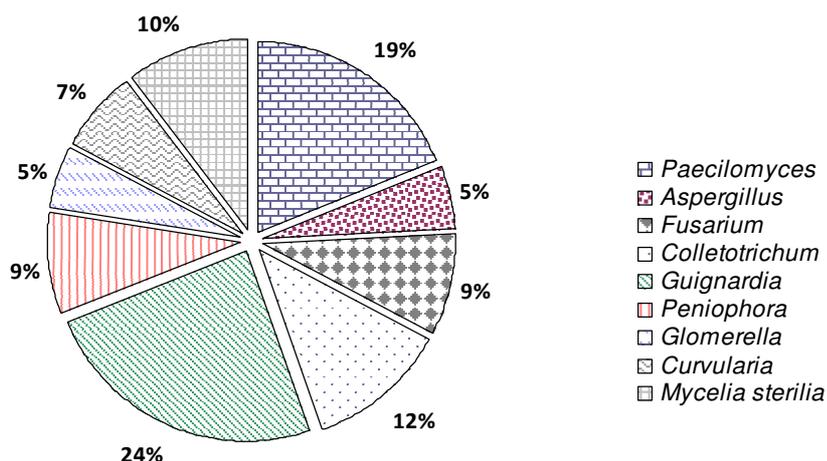


Figura 11 – Distribuição percentual dos isolados fúngicos em possíveis gêneros.

As características morfológicas observadas para os isolados endofíticos de *P. hispidum* indicaram a presença de gêneros importantes para a biotecnologia como: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, cujas espécies vêm sendo utilizadas em diversos processos industriais.

5.3 Produção de Compostos Antimicrobianos

Os líquidos metabólicos dos fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* foram utilizados para os ensaios de antagonismo *in vitro* contra bactérias-teste (Figura 12).

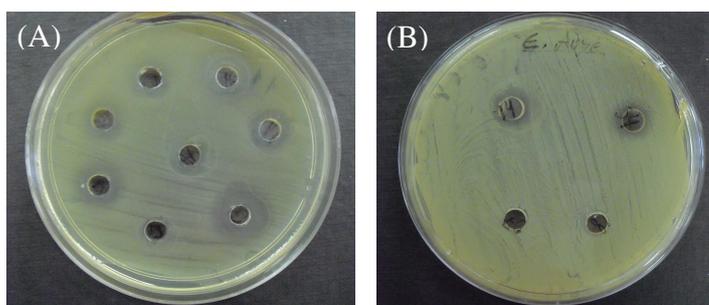


Figura 12 – Inibição do crescimento de *S. sonnei* (A) e *S. aureus* (B) por líquidos metabólicos de fungos endofíticos de *P. hispidum*.

Do total de líquidos metabólicos testados, 15 (25,9%) apresentaram atividade antagonica contra uma ou mais bactérias-teste, como pode ser observado nos dados da Tabela 3. Dos isolados que produziram metabólitos secundários com atividade antibacteriana, 6 foram isolados de caule, 5 de folha, e 4 de raiz de *P. hispidum*.

Tabela 3 - Teste de antagonismo entre os isolados fúngicos endofíticos de *P. hispidum* e as bactérias-teste patogênicas.

Isolado	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>	Isolado	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>
PH-F 1	-	-	-	-	PH-C 23	-	+	-	-
PH-F 2	-	-	-	-	PH-C 24	-	+	-	+
PH-F 3	-	-	-	-	PH-C 25	-	-	-	-
PH-F 4	-	-	-	-	PH-C 26	-	-	-	-
PH-F 5	-	-	-	-	PH-C 27	-	-	-	-
PH-F 6	-	-	-	-	PH-C 28	-	-	+	-
PH-F 7	-	-	-	-	PH-C 29	-	-	-	-
PH-F 8	-	-	-	-	PH-C 30	-	-	-	+
PH-F 9	-	-	-	-	PH-C 31	-	-	-	-
PH-F 10	-	-	-	-	PH-C 32	-	-	-	-
PH-F 39	-	-	-	-	PH-C 33	-	-	+	-
PH-F 40	-	-	-	-	PH-C 34	+	-	-	+
PH-F 41	-	+	-	-	PH-C 35	-	-	-	-
PH-F 42	-	-	-	-	PH-C 36	-	-	-	-
PH-F 43	-	-	-	-	PH-C 37	-	-	-	-
PH-F 44	-	+	-	-	PH-C 38	-	-	-	-
PH-F 45	-	-	-	-	PH-R 11	-	-	-	-
PH-F 46	-	-	-	-	PH-R 12	-	-	-	-
PH-F 47	-	-	-	-	PH-R 13	-	+	-	-
PH-F 48	-	-	-	-	PH-R 14	+	-	-	+
PH-F 49	-	-	-	-	PH-R 15	-	-	-	-
PH-F 50	-	-	-	-	PH-R 16	-	-	-	-
PH-F 51	-	-	+	-	PH-R 17	-	-	-	-
PH-F 52	-	+	-	+	PH-R 18	-	-	-	+
PH-F 53	-	-	-	-	PH-R 19	-	-	-	-
PH-F 54	-	+	-	+	PH-R 20	-	+	-	-
PH-F 55	-	-	-	-	PH-R 56	-	-	-	-
PH-C 21	-	-	-	-	PH-R 57	-	-	-	-
PH-C 22	-	-	-	-	PH-R 58	-	-	-	-

(+) = presença de halo de inibição do crescimento bacteriano

(-) = ausência de halo de inibição do crescimento bacteriano

Vale ressaltar que 8 isolados endofíticos (PH-F 41, PH-F 44, PH-F 52, PH-F 54, PH-C 23, PH-C 24, PH-R 13 e PH-R 20) produziram metabólitos secundários que apresentaram atividade de inibição do crescimento da bactéria-teste *Proteus vulgaris*. Este patógeno apresenta forma de bastonetes, é Gram negativo e habita o trato intestinal de humanos e animais. Pode ser encontrado no solo, na água e em matéria fecal.

Agrupada com os enterobacteriaceae, é uma bactéria oportunista de humanos, conhecida por causar infecções do trato urinário (PELCZAR et al., 1997).

Foram encontrados três isolados endofíticos de *P. hispidum* (PH-F 51, PH-C 28 e PH-C 33) que produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli*, uma bactéria bacilar Gram-negativa, descrita como uma das mais antigas bactérias simbioses do homem (PELCZAR et al., 1997).

O agente etiológico mais comum da shigelose é a *Shigella sonnei*, a qual é transmitida por via fecal-oral. Esta doença possui altíssima infectividade e é caracterizada por causar diarreia hemorrágica com pus, quase sempre acompanhada de dor abdominal (PELCZAR et al., 1997). A partir dos testes de antagonismo *in vitro*, observou-se que sete isolados fúngicos (PH-R 14, PH-R 18, PH-C 24, PH-C 30, PH-C 34 e PH-F 52 e PH-F 54) produzem compostos com potencial ação inibitória frente a bactéria *S. sonnei*.

Dois extratos metabólicos dos isolados de *P. hispidum* apresentaram resultado positivo nos testes de antagonismo frente à bactéria-teste *Staphylococcus aureus*. Este patógeno Gram positivo pertence à família Staphylococcaceae. Coloniza principalmente as vias nasais de humanos, mas também pode ser encontrado no trato intestinal e na cavidade oral. Responsável por inúmeras infecções purulentas, esta bactéria está associada a intoxicações alimentares e à síndrome do choque tóxico (PELCZAR, 1997).

Não foram observados casos em que os metabólitos promoveram um maior crescimento dos microrganismos-teste. Araújo (1996) e Souza et al. (2004) também observaram resultados semelhantes ao realizar ensaios de culturas pareadas entre microrganismos endofíticos de *Citrus* e de plantas tóxicas da Amazônia, contra diferentes bactérias patogênicas.

Estes resultados observados indicam uma complexidade na interação entre a microbiota endofítica e seu hospedeiro, visto que a partir da produção de metabólitos secundários com atividade antibacteriana, o endófito pode estar auxiliando a planta a se defender contra patógenos. Do ponto de vista biológico, a produção de um dado metabólito pode ser fundamentada em vários mecanismos envolvidos na interação entre um microrganismo e seu habitat, como por exemplo, a competição por nicho onde um microrganismo ocupa o mesmo espaço que o outro, e depois competição por nutrientes, ou ainda, ser apenas produto do seu metabolismo.

Os 15 extratos de isolados endofíticos de *P. hispidum* que forneceram resultados positivos nos testes de antagonismo *in vitro* foram submetidos à análise por CLAE para posterior comparação de seus perfis cromatográficos com os obtidos para dois antibióticos comerciais (amoxicilina e cefaloxina). Dez extratos fúngicos, produzidos pelos isolados PH-F 41, PH-F 44, PH-F 51, PH-F 54, PH-C 23, PH-C 24, PH-C28, PH-C 33, PH-C 34 e PH-R 20, apresentaram perfis cromatográficos semelhantes ao perfil da amoxicilina comercial, como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 13.

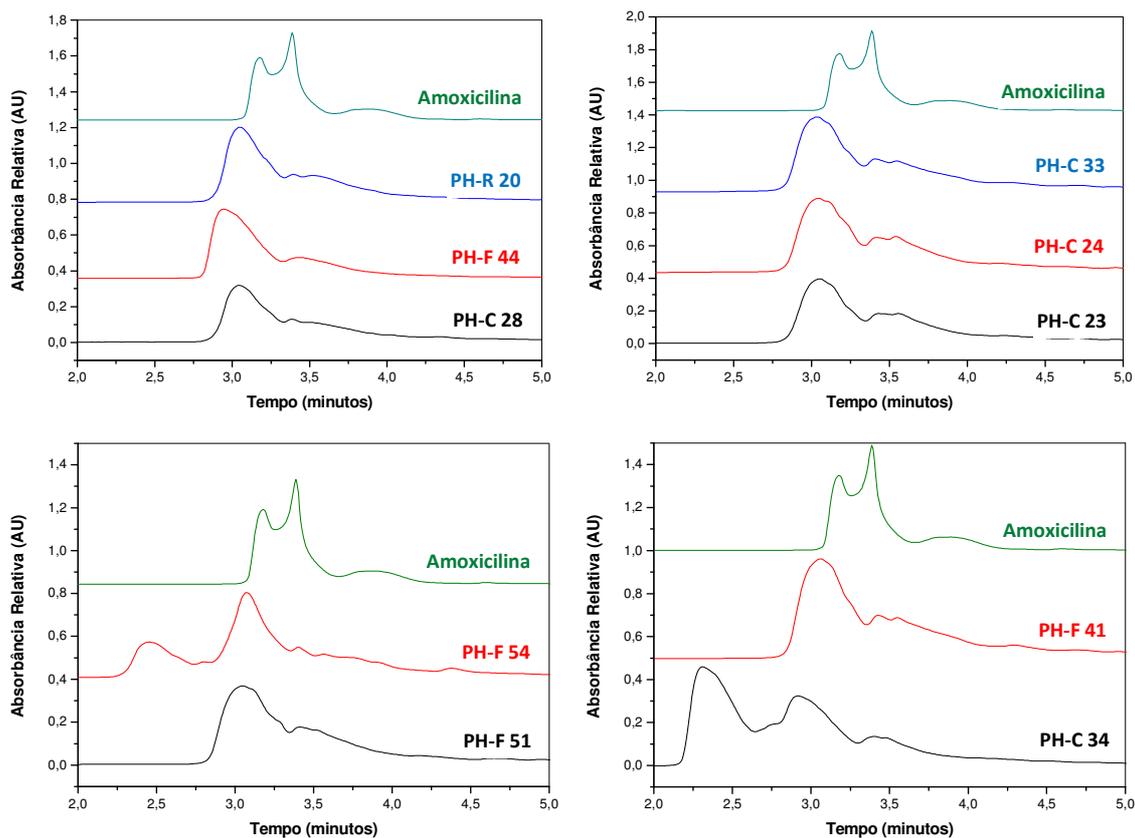


Figura 13 – Perfis cromatográficos da amoxicilina comercial e dos extratos metabólicos de isolados endofíticos de *P. hispidum*.

A partir da análise dos perfis cromatográficos da Figura 13, verifica-se que existe a possibilidade destes fungos endofíticos de *P. hispidum* produzirem uma substância quimicamente semelhante ao antibiótico comercial, uma vez que os picos obtidos nos cromatogramas apresentaram tempos de retenção semelhantes.

Seis sobrenadantes obtidos a partir do cultivo dos isolados PH-F 41, PH-F 51, PH-C 23, PH-C 24, PH-C 33 e PH-C 34 apresentaram perfil cromatográfico com picos na região dos picos observados no cromatograma da cefaloxina comercial, como pode ser observado na Figura 14.

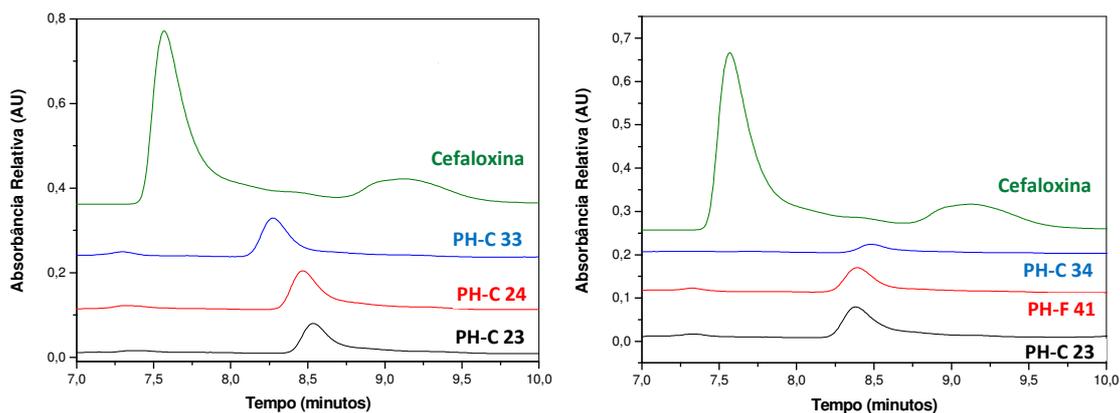


Figura 14 – Perfis cromatográficos da cefaloxina comercial e dos extratos metabólicos de isolados endofíticos de *P. hispidum*.

Observa-se na Figura 14, que existe a possibilidade destes fungos endofíticos de *P. hispidum* produzirem um composto com estrutura química semelhante a do antibiótico comercial, visto que os picos obtidos nos cromatogramas apresentaram tempos de retenção próximos.

Avaliando os perfis cromatográficos dos 15 isolados endofíticos de *P. hispidum* que apresentaram atividade antibacteriana, verificou-se a produção de uma mesma substância pelos isolados PH-F 41, PH-C 23, PH-C 24, PH-C 28, PH-C 33 e PH-R 20. A sobreposição dos cromatogramas destes isolados está apresentada na Figura 15.

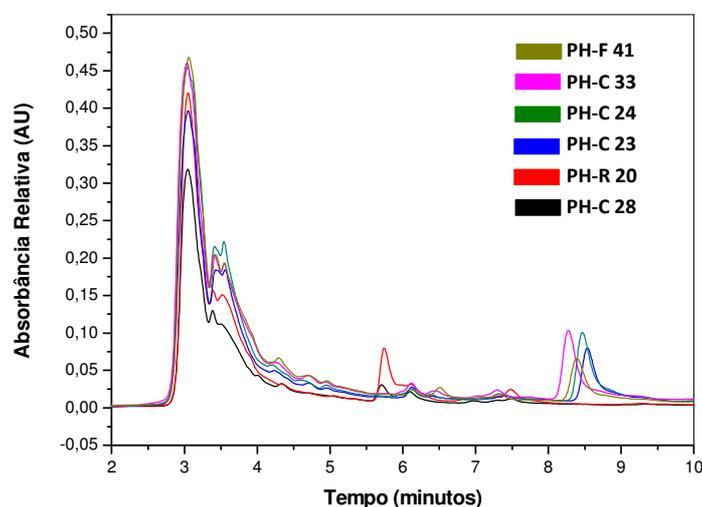


Figura 15 – Sobreposição dos perfis cromatográficos dos extratos dos isolados PH-F 41, PH-C 23, PH-C 24, PH-C 28, PH-C 33 e PH-R 20.

Nota-se nos cromatogramas da Figura 15 que os seis extratos apresentam um mesmo pico com tempo de retenção de 3,05 minutos, região do cromatograma referente aos picos observados para a amoxicilina comercial. Considerando os resultados de atividade antibacteriana destes isolados, e características químicas semelhantes à da

amoxicilina, pode-se sugerir que esta molécula com pico em 3,05 minutos seja a possível responsável pela atividade antimicrobiana destes isolados.

5.4. Ensaio de Atividade Enzimática

De um total de 58 fungos avaliados nos testes qualitativos de produção de enzimas hidrolíticas, 23 apresentaram atividade, ou seja, 39,7% dos isolados endofíticos possuem potencial para serem utilizados em processos enzimáticos. Foram considerados resultados positivos para a produção de enzimas hidrolíticas os isolados que apresentaram formação de halo no meio sólido (área de coloração diferente ao redor da colônia), como pode ser visto na Figura 16.

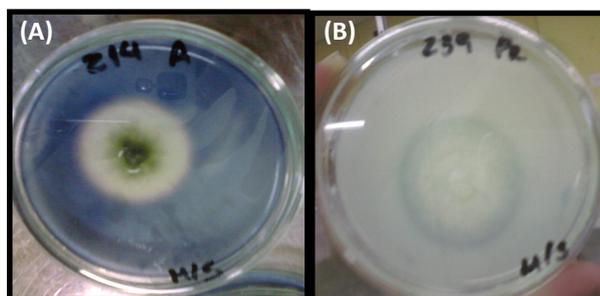


Figura 16 – Halo indicativo da produção de (A) amilase e (B) protease.

Dos fungos que apresentaram resultado positivo nos ensaios enzimáticos, 12 revelaram atividade amilolítica; 5 lipolítica; 4 proteolítica; 4 celulolítica; 4 pectinolítica; e apenas 1 isolado exibiu atividade xilanolítica. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 17.

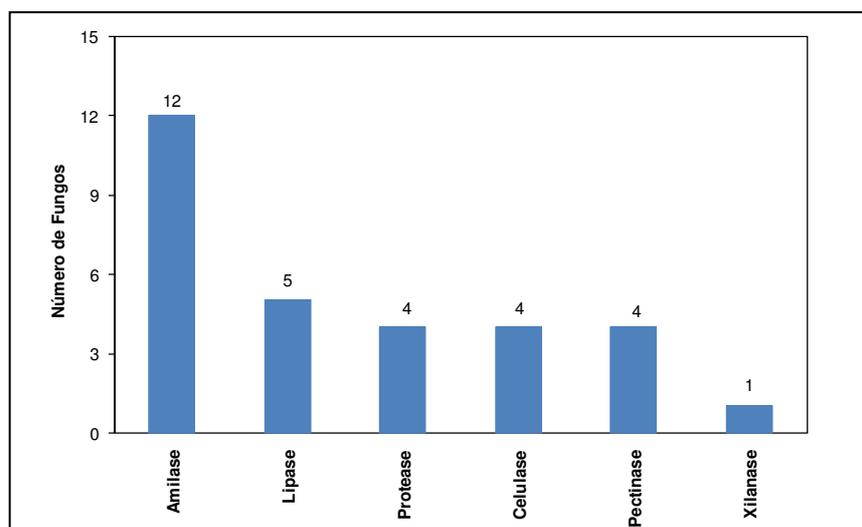


Figura 17 – Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de *P. hispidum*.

Segundo Jimenez-Zurdo et al. (1996), é possível que as baixas atividades xilanolítica, pectinolítica, celulolítica, proteolítica e lipolítica dos isolados de regiões tropicais, sejam observadas devido às dificuldades de visualização da produção destas enzimas em meio sólido, principalmente num curto período de incubação. Em estudos realizados por Hubbel (1978) e Mateos et al. (1992), o tempo de incubação para avaliação da produção destas enzimas variou entre 14 e 21 dias, enquanto neste trabalho os ensaios foram realizados com um tempo que variou de 3 a 7 dias.

Apesar de alguns autores sugerirem um tempo de incubação maior para a avaliação da atividade hidrolítica em fungos, Mendes et al. (2010) obtiveram resultados positivos para produção de amilase fúngica em um tempo de incubação curto (5 dias), semelhante ao utilizado neste estudo. Portanto, tentou-se neste trabalho minimizar o tempo de análise dos testes enzimáticos, visando otimizar o método de seleção de fungos produtores de enzimas de interesse comercial. Esta tentativa justifica-se pela demanda industrial, que requer um retorno mais imediato, ou seja, procurou-se isolados fúngicos que possam produzir enzimas hidrolíticas em um curto período de tempo.

Dos 23 isolados endofíticos de *P. hispidum* que apresentaram atividade hidrolítica em até sete dias de cultivo, 6 apresentaram atividade para mais de uma enzima avaliada (Tabelas 4, 5 e 6). Destes, três foram isolados de raiz (PH-R 16, PH-R 18 e PH-R 20), dois de caule (PH-C 25 e PH-C 27) e um de folha (PH-F 44). O isolado PH-R 18 apresentou atividades amilolítica, pectinolítica e xilanolítica. Os isolados PH-R 16 e PH-R 20 apresentaram atividades amilolítica e celulolítica, enquanto PH-C 25 e PH-C 27 possuem atividades lipolítica e proteolítica. O fungo isolado da folha de *P. hispidum* PH-F 44 apresentou atividades amilolítica e lipolítica.

Os fungos que apresentaram atividade para apenas uma enzima (PH-F 1, PH-F 2, PH-F 5, PH-F 10, PH-F 39, PH-F 41, PH-C 21, PH-C 22, PH-C 23, PH-C 24, PH-C 30, PH-C 31, PH-C 33, PH-C 34, PH-R 12, PH-R 17, e PH-R 19) podem ser considerados como promissores para serem utilizados em aplicações industriais, pois possuem maior especificidade na produção de enzimas hidrolíticas, o que auxilia na obtenção dos produtos desejados em reações ou etapas de processos catalisados enzimaticamente.

Como pode ser observado na Tabela 4, apenas 7 fungos isolados das folhas de *P. hispidum* apresentaram atividade hidrolítica nas condições de teste utilizadas. A maioria

destes isolados produziu amilase (5 fungos), e nenhum isolado das folhas apresentou produção de pectinase, xilanase e protease.

Tabela 4 – Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de *P. hispidum* isolados de folhas.

Isolado	Celulase	Amilase	Pectinase	Xilanase	Protease	Lipase
PH-F 1	-	+	-	-	-	-
PH-F 2	-	+	-	-	-	-
PH-F 3	-	-	-	-	-	-
PH-F 4	-	-	-	-	-	-
PH-F 5	-	+	-	-	-	-
PH-F 6	-	-	-	-	-	-
PH-F 7	-	-	-	-	-	-
PH-F 8	-	-	-	-	-	-
PH-F 9	-	-	-	-	-	-
PH-F 10	-	+	-	-	-	-
PH-F 39	+	-	-	-	-	-
PH-F 40	-	-	-	-	-	-
PH-F 41	+	-	-	-	-	-
PH-F 42	-	-	-	-	-	-
PH-F 43	-	-	-	-	-	-
PH-F 44	-	+	-	-	-	+
PH-F 45	-	-	-	-	-	-
PH-F 46	-	-	-	-	-	-
PH-F 47	-	-	-	-	-	-
PH-F 48	-	-	-	-	-	-
PH-F 49	-	-	-	-	-	-
PH-F 50	-	-	-	-	-	-
PH-F 51	-	-	-	-	-	-
PH-F 52	-	-	-	-	-	-
PH-F 53	-	-	-	-	-	-
PH-F 54	-	-	-	-	-	-
PH-F 55	-	-	-	-	-	-

(+) = presença de halo indicativo de atividade hidrolítica

(-) = ausência de halo indicativo de atividade hidrolítica

Resultados distintos foram observados para os fungos isolados do caule de *P. hispidum* (Tabela 5). Dentre estes isolados, apenas um produziu amilase, enquanto 4 produziram protease, 4 lipase e 3 pectinase de um total de 12 fungos produtores de hidrolases. Atividades celulolítica e xilanolítica não foram observadas nos fungos isolados do caule de *P. hispidum* nas condições de teste utilizadas.

Tabela 5 - Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de *P. hispidum* isolados de caule.

Isolado	Celulase	Amilase	Pectinase	Xilanase	Protease	Lipase
PH-C 21	-	-	-	-	-	+
PH-C 22	-	-	-	-	-	+
PH-C 23	-	-	-	-	+	-
PH-C 24	-	-	-	-	+	-
PH-C 25	-	-	-	-	+	+
PH-C 26	-	-	-	-	-	-
PH-C 27	-	-	-	-	+	+
PH-C 28	-	-	-	-	-	-
PH-C 29	-	-	-	-	-	-
PH-C 30	-	+	-	-	-	-
PH-C 31	-	-	+	-	-	-
PH-C 32	-	-	-	-	-	-
PH-C 33	-	-	+	-	-	-
PH-C 34	-	-	+	-	-	-
PH-C 35	-	-	-	-	-	-
PH-C 36	-	-	-	-	-	-
PH-C 37	-	-	-	-	-	-
PH-C 38	-	-	-	-	-	-

(+) = presença de halo indicativo de atividade hidrolítica

(-) = ausência de halo indicativo de atividade hidrolítica

Tabela 6 - Produção de enzimas hidrolíticas dos fungos endofíticos de *P. hispidum* isolados de raiz.

Isolado	Celulase	Amilase	Pectinase	Xilanase	Protease	Lipase
PH-R 11	-	-	-	-	-	-
PH-R 12	-	+	-	-	-	-
PH-R 13	-	-	-	-	-	-
PH-R 14	-	-	-	-	-	-
PH-R 15	-	-	-	-	-	-
PH-R 16	+	+	-	-	-	-
PH-R 17	-	+	-	-	-	-
PH-R 18	-	+	+	+	-	-
PH-R 19	-	+	-	-	-	-
PH-R 20	+	+	-	-	-	-
PH-R 56	-	-	-	-	-	-
PH-R 57	-	-	-	-	-	-
PH-R 58	-	-	-	-	-	-

(+) = presença de halo indicativo de atividade hidrolítica

(-) = ausência de halo indicativo de atividade hidrolítica

Para os 10 isolados da raiz de *P. hispidum* que apresentaram atividade hidrolítica (Tabela 6), observou-se que, assim como para os isolados das folhas, a maioria dos fungos demonstra atividade amilolítica (6 fungos). Nenhum dos isolados de raiz apresentou atividade proteolítica ou lipolítica nas condições de teste utilizadas.

A baixa produção de enzimas hidrolíticas observadas neste estudo também pode ser justificada pelas diferenças fisiológicas dos fungos, uma vez que fungos com crescimento lento podem levar mais tempo para a produção de metabólitos primários. Portanto, os fungos que não apresentaram resultado positivo nas condições de teste realizadas neste estudo, não devem ser descartados para futuras prospecções de produção de enzimas de interesse comercial, uma vez que a partir de manipulações genéticas, podem-se utilizar vetores que promovam a produção da enzima fúngica de interesse com maior rapidez.

5.5 Ensaio Biocatalíticos

Dois fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* (PH-C 21 e PH-C 22) foram utilizados nestes ensaios, visto que dos cinco que apresentaram resultado positivo no ensaio qualitativo para a produção de lipases, apenas os isolados do caule PH-C 21 e PH-C 22 foram capazes de crescer no meio contendo óleo de girassol, indutor da produção de lipases.

Segundo Sanchez-Montero (1991), a reação de esterificação pode ser considerada uma reação padrão para verificar a atividade de lipases em meio orgânico. Essa reação possibilita discriminar entre a atuação de lipases e esterases. Zanotto et al. (2009) utilizaram a reação de esterificação do ácido linoléico com dodecanol para verificar a atividade de lipases de 77 fungos amazônicos. Os autores observaram que dentre os isolados avaliados, nove apresentaram potencial para mediar esta reação.

Os fungos endofíticos estudados neste trabalho demonstraram baixa atividade sintética quando comparados aos fungos estudados por Zanotto e colaboradores (2009), os quais observaram que 32 fungos de *P. aduncum* demonstraram resultados interessantes na reação de esterificação, apresentando moderadas conversões a linoleato de dodecila, de até 60%. Os autores observaram que isolados fitopatogênicos da castanha-do-Brasil e do cacau promoveram excelentes valores de conversão nas reações

de esterificação (acima de 90%), quando comparados às reações mediadas pela enzima comercial Novozym® 435, cujas conversões a éster foram de 100% (Zanotto, 2009).

Não foi verificada a formação de linoleato de dodecila quando a reação de esterificação foi mediada pelo micélio do isolado PH-C 22. Entretanto, como pode ser observado no cromatograma da Figura 18, existem indícios de formação de produto quando o isolado PH-C 21 foi utilizado como biocatalisador (indicado pela seta na Figura 18).

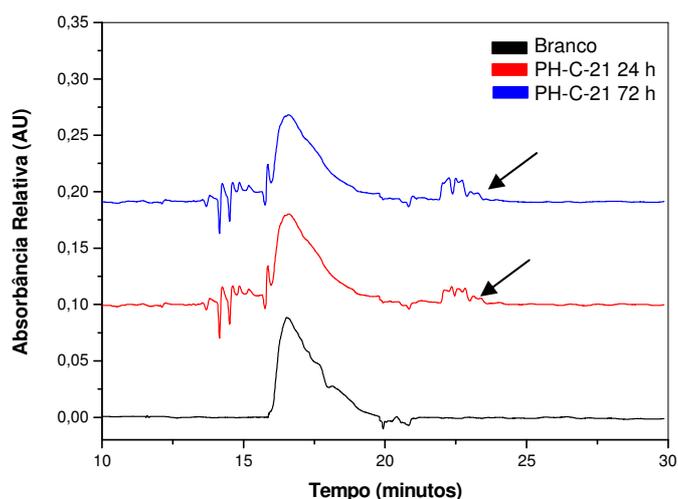


Figura 14 – Cromatogramas das alíquotas da reação de esterificação mediada pelo micélio do isolado PH-C 21 e da reação controle (branco).

A diminuição do pico em 16,52 min., referente ao reagente (ácido linoléico), pode ser observado nos cromatogramas sobrepostos da Figura 19, indicando o consumo do ácido graxo durante a reação de esterificação mediada pelo isolado PH-C 21.

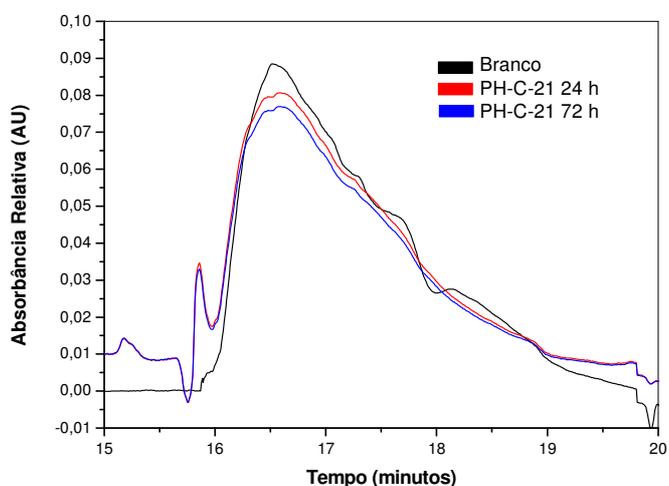


Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos das alíquotas das reação mediada pelo isolado PH-C 21 e da reação controle (branco).

A reação mediada pela enzima comercial Novozym® 435, apresentou claramente a formação do éster, cujo pico aparece em 22,35 min no cromatograma da Figura 20. Neste cromatograma também fica claro o desaparecimento do pico referente ao ácido linoléico em apenas 24 horas de reação (100% de conversão).

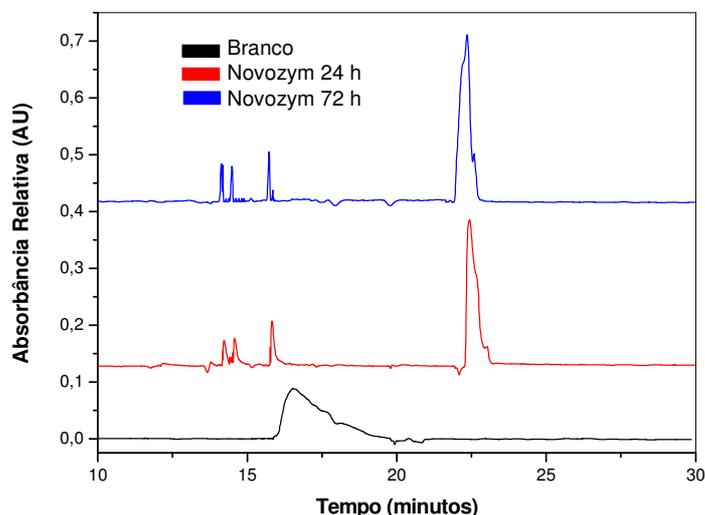


Figura 20 – Cromatograma das alíquotas da reação de esterificação mediada pela enzima comercial Novozym® 435 e da reação controle (branco).

O experimento foi finalizado após 72 horas de reação. Os dois fungos endofíticos aqui estudados, portanto, mostraram-se pouco eficientes como biocatalisadores em reações de esterificação. Entretanto, não se descarta a possibilidade de que estes fungos isolados de *P. hispidum* tenham essa capacidade, considerando que apresentaram resultado positivo para a produção de lipase em meio sólido. A baixa eficiência em mediar a esterificação do ácido linoléico com dodecanol pode ser explicada considerando que na metodologia empregada neste estudo apenas as lipases ligadas ao micélio dos isolados PH-C 21 e PH-C 22 foram avaliadas. As lipases extracelulares, secretadas para o meio de cultivo líquido, não foram avaliadas nos ensaios biocatalíticos. Outra hipótese para a baixa atividade sintética dos isolados PH-C 21 e PH-C 22 na reação de esterificação do ácido linoléico com dodecanol pode estar relacionada à rigidez tridimensional de lipases ligadas ao micélio. Visto que o micélio atua como um “suporte natural” na imobilização de enzimas (ROMERO, 2007), sugere-se que pode haver uma diminuição da flexibilidade conformacional da lipase ligada ao micélio, e como consequência, a enzima torna-se mais específica para determinados substratos (ZANOTTO, 2009).

Embora os cinco fungos endofíticos de *P. hispidum* que apresentaram atividade no ensaio qualitativo em meio sólido fossem potenciais biocatalisadores, os resultados obtidos nos ensaios biocatalíticos com dois destes isolados demonstram que os fungos não foram eficientes em mediar a reação de esterificação. Esse comportamento pode estar relacionado ainda com as diferentes estabilidades de lipases atuando em solvente orgânico. Esta hipótese está reportada nos trabalhos de Herar et al. (1993) e Janssen et al. (1999).

5.6 Avaliação da Produção de Óleos Essenciais

Terpenos são formados por combinações de cinco unidades de carbono (C5) chamadas de isopreno, e aqueles que contêm oxigênio são chamados de terpenóides (FACUNDO, 2008). Os terpenos utilizados como padrão neste estudo foram os monoterpenos (C10), hemiterpenos (C5), diterpenos (C20) e triterpenos (C30).

Os padrões de terpenos foram injetados no cromatógrafo para obtenção dos tempos de retenção característicos e posterior comparação com os perfis cromatográficos dos extratos fúngicos. Foram analisados por CLAE os sobrenadantes dos 58 fungos endofíticos isolados de *P. hispidum*, os quais apresentaram crescimento nas condições de cultivo descritas no item 4.5.

De modo geral, foi possível observar que o perfil cromatográfico dos sobrenadantes dos isolados endofíticos de *P. hispidum* apresenta dois grupos de moléculas de diferentes polaridades, considerando as condições analíticas utilizadas (CLAE de fase reversa). O primeiro grupo é constituído por moléculas mais polares, que possuem tempos de retenção menores, entre 0 e 5 minutos. O segundo grupo contém moléculas menos polares, apresentando tempos de retenção entre 10 e 20 minutos.

Na Figura 21 estão apresentados os cromatogramas dos padrões de safrol e de α -pineno, bem como o perfil cromatográfico do extrato obtido a partir do isolado endofítico de *P. hispidum* PH-F 52, que apresentou atividade antimicrobiana contra *P. vulgaris* e *S. sonnei*.

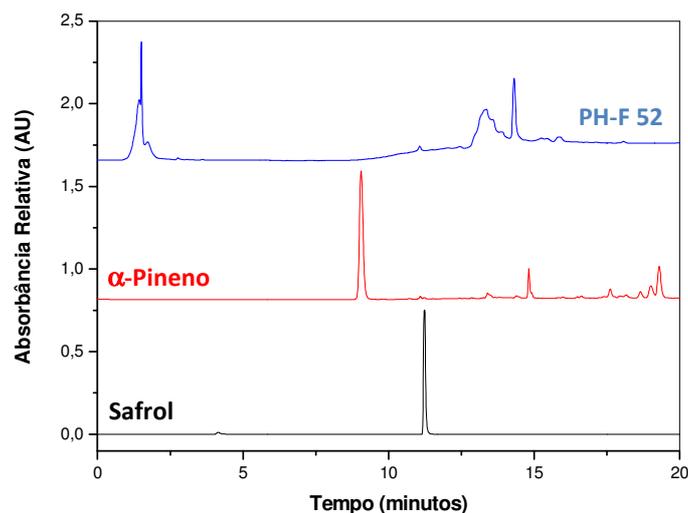


Figura 21 – Cromatogramas dos terpenos safrol e α -pineno e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.

Como pode ser observado na Figura 21, o safrol, componente majoritário na planta (WADT, 2004) de onde os fungos foram isolados, apresentou um pico característico no tempo de retenção de 13,11 min. O α -pineno, encontrado na concentração de 10,2% em *P. hispidum* (BOTTIA S. et al, 2007), apresentou um pico majoritário em 9,05 minutos. No cromatograma obtido para o extrato do isolado PH-F 52 não foram observados picos nos tempos de retenção obtidos para o safrol e para o α -pineno. Portanto, este isolado não produz estes terpenos.

Na Figura 22 estão apresentados os cromatogramas dos padrões do β -cariofileno e do citronelol, bem como o perfil cromatográfico do extrato obtido a partir do isolado PH-F 52.

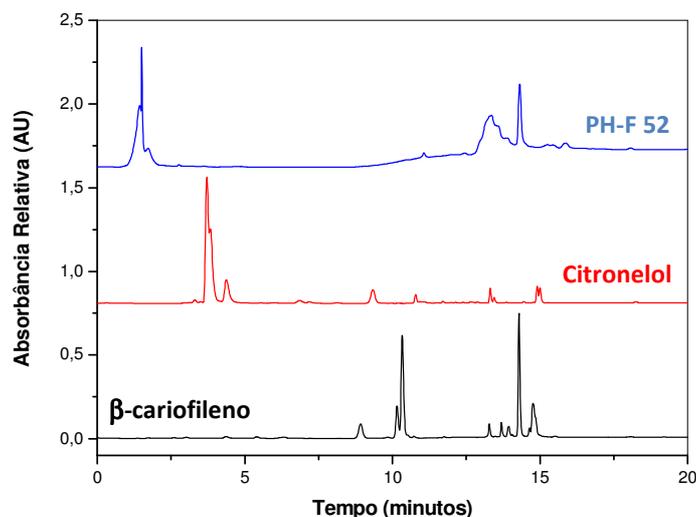


Figura 22 – Cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citronelol e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.

O β -cariofileno está presente em baixas concentrações no óleo essencial de *P. hispidum* (BOTTIA S. et al, 2007). Como pode ser observado na Figura 22, este terpeno apresentou dois picos majoritários no cromatograma, em 10,33 e em 14,28 minutos, fato este que pode estar relacionado à degradação do composto, devido à conhecida sensibilidade de terpenos frente às reações de oxidação. O padrão de citronelol apresentou um pico majoritário em 3,70 minutos. O sobrenadante do isolado PH-F 52 apresentou um pico com tempo de retenção semelhante ao de um dos picos majoritários do β -cariofileno, como pode ser observado nos cromatogramas ampliados da Figura 23.

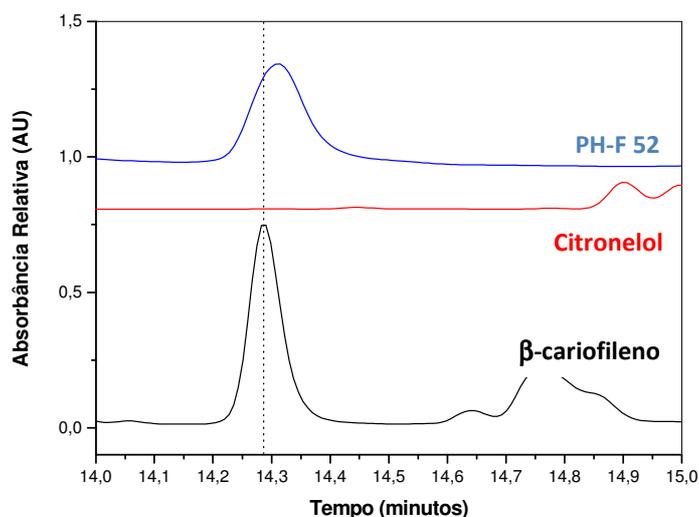


Figura 23 – Ampliação dos cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citronelol e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.

Nota-se na ampliação do cromatograma do extrato fúngico a presença de um pico centrado em 14,32 minutos próximo do pico presente no cromatograma do β -cariofileno em 14,28 minutos (Figura 23). Contudo, devido à possível degradação do terpeno padrão, e a presença de dois picos majoritários observados na injeção deste composto, não se pode afirmar que o pico em 14,28 minutos seja referente à molécula de β -cariofileno. Mesmo assim, existe a possibilidade de que o isolado PH-F 52 produza este terpeno.

Comparando-se o perfil cromatográfico do extrato do isolado PH-F 52 com o do citronelol (Figuras 22 e 23), verifica-se a ausência de picos com tempos de retenção semelhantes. Portanto, este isolado não produz o citronelol.

Os perfis cromatográficos dos padrões de terpinoleno e (*R*)-carvona, bem como do extrato obtido a partir do isolado PH-F 52 estão apresentados na Figura 24. O terpinoleno vem sendo constantemente isolado de plantas do gênero *Piper*. Porém,

encontrado em baixa concentração (1,2%) em plantas da espécie *P. hispidum* (BOTTIA S. et al., 2007). A (*R*)-carvona ainda não foi descrita como metabólito de plantas do gênero *Piper* sp. No entanto, por possuir estrutura química semelhante a de alguns compostos produzidos pelas plantas deste gênero, não foi desconsiderada a hipótese de que fungos endofíticos desta planta tenham capacidade de produzir esta substância

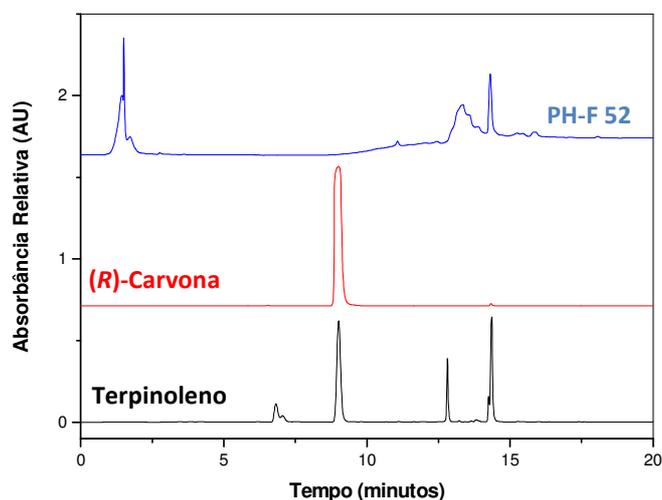


Figura 24 – Cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (*R*)-carvona e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.

Como pode ser observado na Figura 24, assim como o β -cariofileno, o terpinoleno apresentou dois picos majoritários no cromatograma, em 9,02 e em 14,38 minutos, possivelmente devido a sua degradação por oxidação. A (*R*)-carvona apresentou um pico majoritário em 8,99 minutos. O extrato do isolado PH-F 52 apresentou um pico com tempo de retenção semelhante ao de um dos picos majoritários do terpinoleno, como pode ser observado nos cromatogramas ampliados da Figura 25.

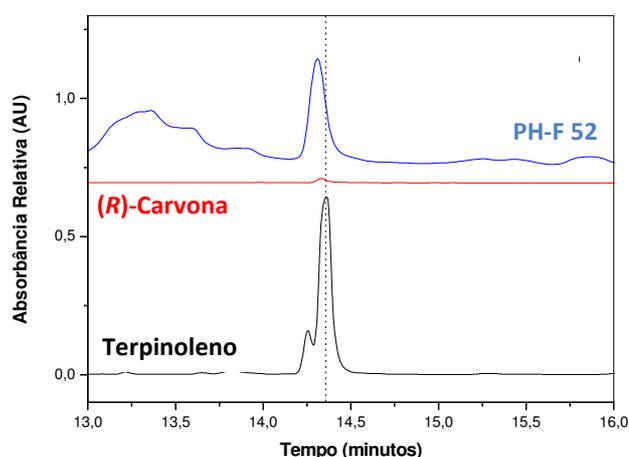


Figura 25 – Ampliação dos cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (*R*)-carvona e do extrato do isolado endofítico PH-F 52.

Nota-se no cromatograma ampliado do extrato do isolado PH-F 52 a presença de um pico centrado em 14,32 minutos, muito próximo do pico presente no cromatograma do terpinoleno, em 14,38 minutos (Figura 25). Entretanto, devido à presença de dois picos majoritários no padrão de terpinoleno, não se pode afirmar que o pico em 14,38 minutos seja referente à molécula deste terpeno, podendo ser o produto de degradação. Ainda sim, não pode ser descartada a possibilidade de que o isolado PH-F 52 produza terpinoleno.

Comparando-se o perfil cromatográfico do extrato do isolado PH-F 52 com o da (*R*)-carvona (Figuras 24 e 25), verifica-se a ausência de picos com tempos de retenção semelhantes. Portanto, este isolado não produz a (*R*)-carvona.

Na Figura 26 estão apresentados os cromatogramas dos padrões de safrol e de α -pineno, do perfil cromatográfico do extrato obtido a partir do isolado PH-F 54 que apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas *P. vulgaris* e *S. sonnei*, e o perfil cromatográfico do extrato do isolado PH-C 34, que inibiu o crescimento das bactérias *S. aureus* e *S. sonnei*.

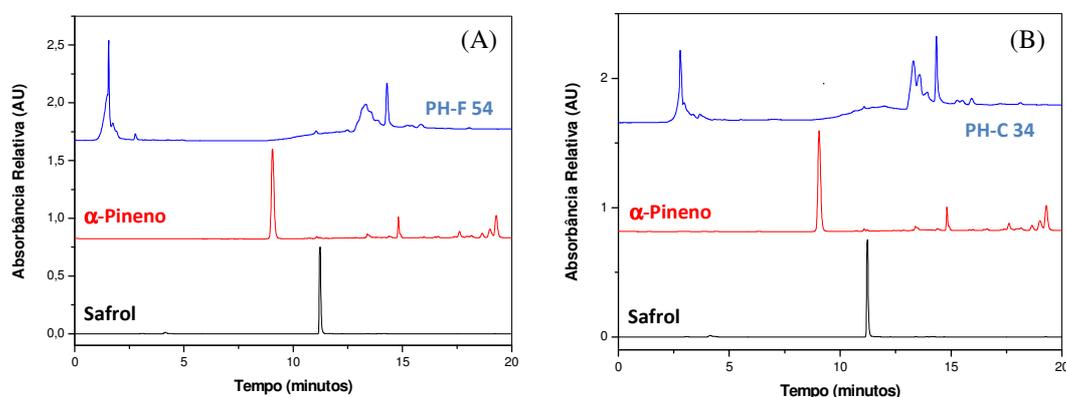


Figura 26 – Cromatogramas dos terpenos safrol e α -pineno e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A), e PH-C 34 (B).

Como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 26, não foram observados picos nos tempos de retenção obtidos para o safrol (13,11 min.) e para o α -pineno (8,99 min.) nos extratos dos fungos endofíticos PH-F 54 e PH-C 34. Portanto, estes fungos não produzem safrol e α -pineno. O mesmo foi observado para os demais 52 extratos fúngicos analisados, ou seja, em nenhum dos sobrenadantes analisados por CLAE observaram-se picos com tempos de retenção semelhantes aos dos padrões de safrol e α -pineno.

A partir destes resultados, verifica-se que nas condições experimentais utilizadas, nenhum dos quinze fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* que apresentaram atividade antibacteriana produz safrol, composto de comprovada ação bactericida (MAIA et al., 1988; MONTEIRO et al., 2001; FONTES JUNIOR et al., 2002). Portanto, a atividade antagonista observada contra bactérias patogênicas está associada à produção de outras moléculas que fazem parte do metabolismo secundário destes fungos.

Na Figura 27 estão apresentados os cromatogramas dos padrões do β -cariofileno e do citrônolol, bem como os perfis cromatográficos dos extratos obtidos a partir dos isolados PH-F 54 e PH-C 34.

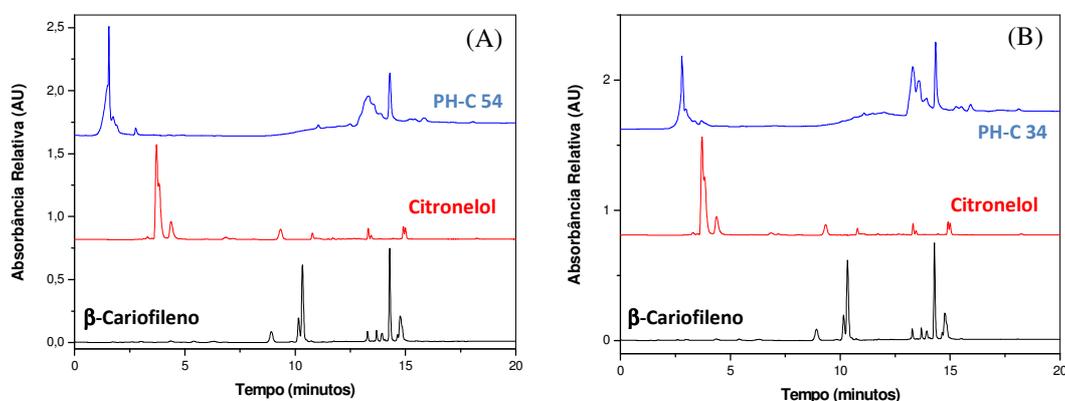


Figura 27 – Cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citrônolol e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A) e PH-C 34 (B).

Assim como foi observado para o isolado endofítico PH-F 52, os sobrenadantes dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 apresentaram picos com tempos de retenção semelhantes ao de um dos picos majoritários do β -cariofileno. Os cromatogramas ampliados dos extratos dos fungos PH-F 54 e PH-C 34 estão apresentados na Figura 28.

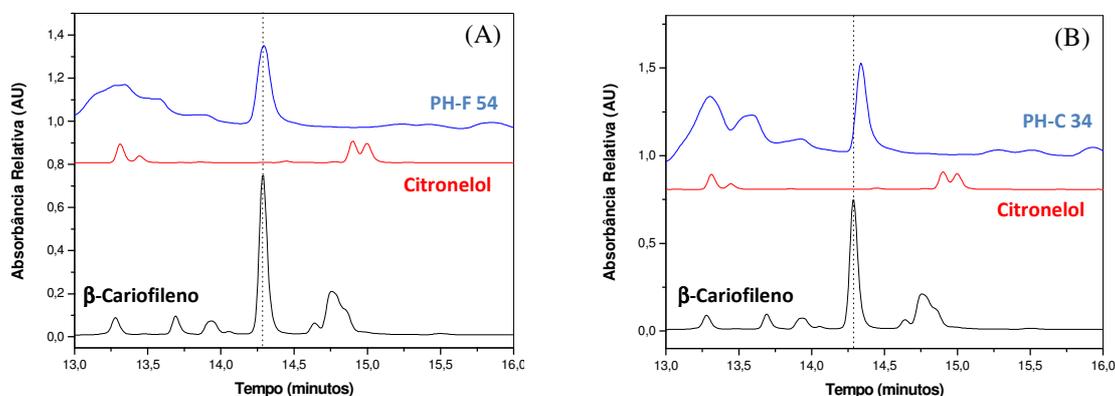


Figura 28 – Ampliação dos cromatogramas dos terpenos β -cariofileno e citrônolol e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A) e PH-C 34 (B).

Nota-se nos cromatogramas ampliados da Figura 28 que os extratos dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 apresentam picos centrados em 14,29 e 14,37 minutos, respectivamente. Ambos os picos possuem tempo de retenção semelhante ao do pico em 14,28 min. observado para o β -cariofileno. Estes resultados sugerem que existe a possibilidade dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 produzirem β -cariofileno. Contudo, devido à maior proximidade entre os tempos de retenção, o isolado PH-F 54 mostra-se como um potencial candidato para a produção de β -cariofileno. Os demais extratos fúngicos analisados por CLAE não apresentaram picos com tempos de retenção semelhantes aos picos do β -cariofileno, como observado para os extratos dos fungos PH-F 52, PH-F 54 e PH-C 34. Sendo assim, apenas estes três isolados podem estar produzindo o terpeno.

Não foram observados picos referentes à produção de citronelol nos extratos dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 (Figuras 27 e 28). Este resultado também foi observado para os demais extratos obtidos de isolados de *P. hispidum* utilizados neste trabalho, ou seja, não foi verificada a produção de citronelol nos isolados fúngicos endofíticos de *P. hispidum*.

Os perfis cromatográficos dos padrões de terpinoleno e (*R*)-carvona, bem como dos extratos obtidos a partir dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 estão na Figura 29.

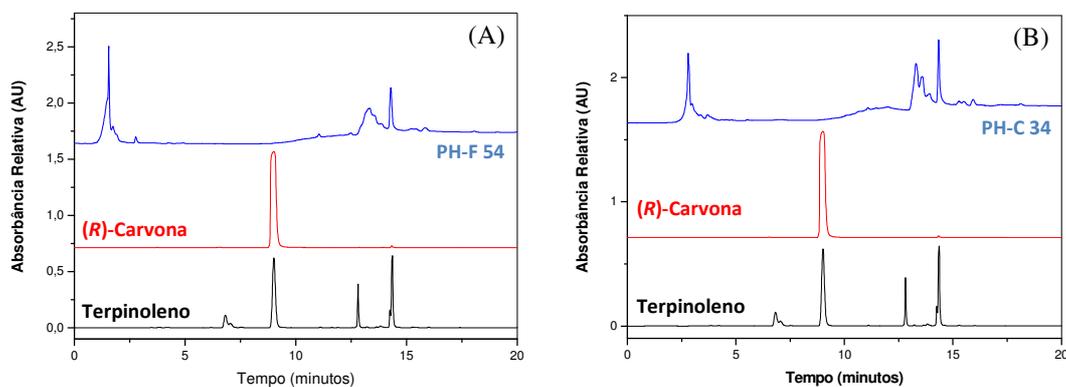


Figura 29 – Cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (*R*)-carvona e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 e PH-C 34.

Observa-se na Figura 29 que os extratos dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 apresentaram um pico com tempo de retenção semelhante ao de um dos picos majoritários do terpinoleno. Os cromatogramas ampliados dos extratos dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 estão apresentados na Figura 30.

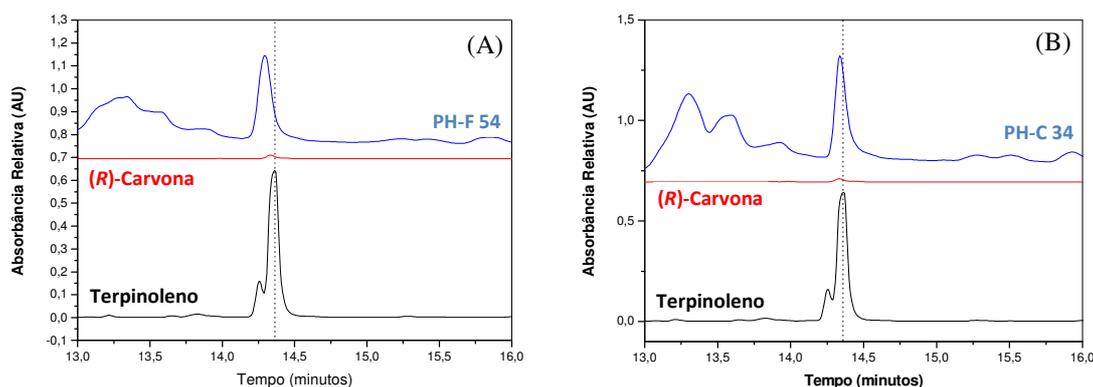


Figura 30 – Ampliação dos cromatogramas dos terpenos terpinoleno e (*R*)-carvona e dos extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 (A) e PH-C 34 (B).

Nota-se nos cromatogramas ampliados da Figura 30 que os extratos dos isolados PH-F 54 e PH-C 34 apresentam picos centrados em 14,29, e 14,37 minutos, respectivamente. Estes tempos de retenção são próximos ao de um dos picos majoritários do terpinoleno (14,38 min.), o que indica a possível produção de terpinoleno por estes isolados. Entretanto, o isolado PH-C 34 mostra-se como um candidato mais promissor em relação à produção deste terpeno, uma vez que seu extrato apresenta um pico com tempo de retenção muito próximo ao do pico do terpinoleno. Os demais extratos fúngicos analisados por CLAE não apresentaram picos com tempos de retenção semelhantes aos picos do terpinoleno, como observado para os extratos dos fungos PH-F 52, PH-F 54 e PH-C 34. Sendo assim, apenas estes três isolados podem estar produzindo o terpeno.

Os extratos dos isolados endofíticos PH-F 54 e PH-C 34 não apresentaram picos com tempos de retenção correspondentes à produção de (*R*)-carvona (Figuras 28 e 29). Este resultado também foi observado para os demais extratos obtidos de isolados de *P. hispidum* utilizados neste trabalho, ou seja, não foi verificada a produção de (*R*)-carvona nos endófitos de *P. hispidum*.

A hipótese de que fungos endofíticos de *P. hispidum* sejam produtores de terpenos presentes no óleo essencial extraído da planta é bastante coerente, uma vez que já existem relatos de que os genes que codificam a expressão das enzimas 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintetase e 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato-isomerase, que regulam a via da produção de terpenos, são transferidos pela planta para o fungo, provavelmente devido à co-evolução de ambos (CARRAU et al., 2005; ZHI-LIN et al., 2007).

Um estudo desenvolvido por Hock em 1984 revelou a produção dos terpenos linalol, geraniol e citronelol pelas leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces fermentati* durante a fermentação alcoólica (HOCK et al., 1984). Um estudo mais recente de Carrau e colaboradores permitiu identificar a produção majoritária de linalol e α -terpeniol por *Saccharomyces cerevisiae*, além da produção de outros terpenos como citronelol, geraniol e farnesol, após alteração de concentrações da fonte de nitrogênio no meio de cultura (CARRAU et al., 2005).

Neste trabalho não foi observada a produção de safrol, composto majoritário no óleo essencial de *P. hispidum*, por nenhum dos isolados endofíticos. Entretanto, três isolados demonstraram a possibilidade de estarem sintetizando β -cariofileno e terpinoleno, terpenos que se apresentam em concentrações baixas na planta hospedeira. Portanto, verifica-se que há a possibilidade dos fungos endofíticos de *P. hispidum* serem os responsáveis pela produção deste composto.

A realização de um isolamento com diferentes meios de cultura mais específicos, o uso de outras técnicas de isolamento, e alterações nas condições de cultivo dos fungos em meio líquido podem colaborar para que seja possível a obtenção de terpenos com atividade biológica conhecida a partir de fungos endofíticos de *P. hispidum*.

5.7 Ensaio de Atividade Antioxidante

Os radicais derivados do oxigênio, gerados por vários processos de oxidação-redução, podem agir de forma danosa em várias enzimas que agem como protetoras do estresse oxidativo tais como: superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase. Desta forma, agente antioxidantes são de fundamental importância para a proteção do organismo contra o estresse oxidativo (ELLNAIN-WOJTASZEK et al., 2003).

Chomcheon et al. (2009) verificaram a existência de atividade antioxidante em extratos de fungos endofíticos da espécie *Corynespora cassicola*, demonstrando o potencial de obtenção destes compostos utilizando fungos.

Neste estudo, foi avaliada a atividade antioxidante de 42 extratos de fungos endofíticos de *P. hispidum*. Os demais extratos não foram avaliados quanto a sua

capacidade antioxidante devido à reduzida quantidade obtida, o que impossibilitaria a realização dos dois ensaios de atividade antioxidante, em triplicata.

5.7.1 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos com difenil-picril-hidrazina (DPPH)

Na Figura 31 pode ser observada a curva analítica da absorbância *versus* a concentração de ácido ascórbico ([AA] µg/mL) utilizada para expressar os resultados de atividade antioxidante dos extratos fúngicos em função da atividade antioxidante do ácido ascórbico.

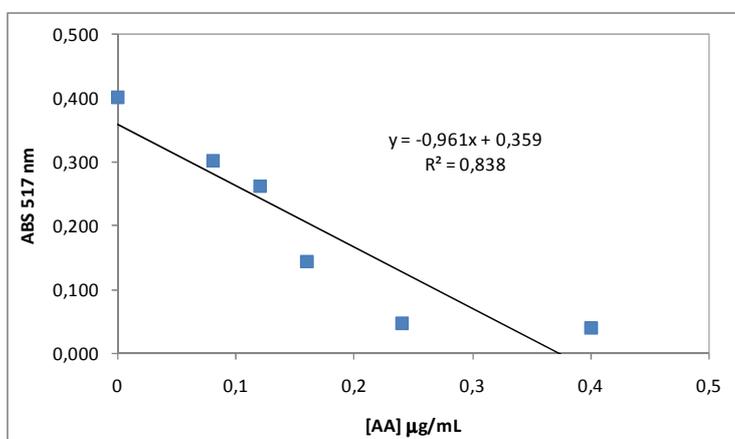


Figura 31 – Curva analítica da absorbância obtida no ensaio de atividade antioxidante utilizando DPPH para diferentes concentrações de ácido ascórbico.

A equação de regressão linear apresentada na Figura 30 foi utilizada para converter os valores de absorbância dos extratos fúngicos na concentração de ácido ascórbico correspondente. O valor de R^2 encontrado foi baixo, o que pode ser explicado pela alta reatividade e rápida degradação do reagente DPPH. Todos os valores utilizados na curva analítica representam a média de análises dos ensaios realizados em triplicata para cada concentração de ácido ascórbico.

A Figura 32 apresenta os valores correspondentes de concentração de ácido ascórbico referentes às moléculas com atividade antioxidante presentes nos extratos fúngicos, a partir dos ensaios utilizando DPPH.

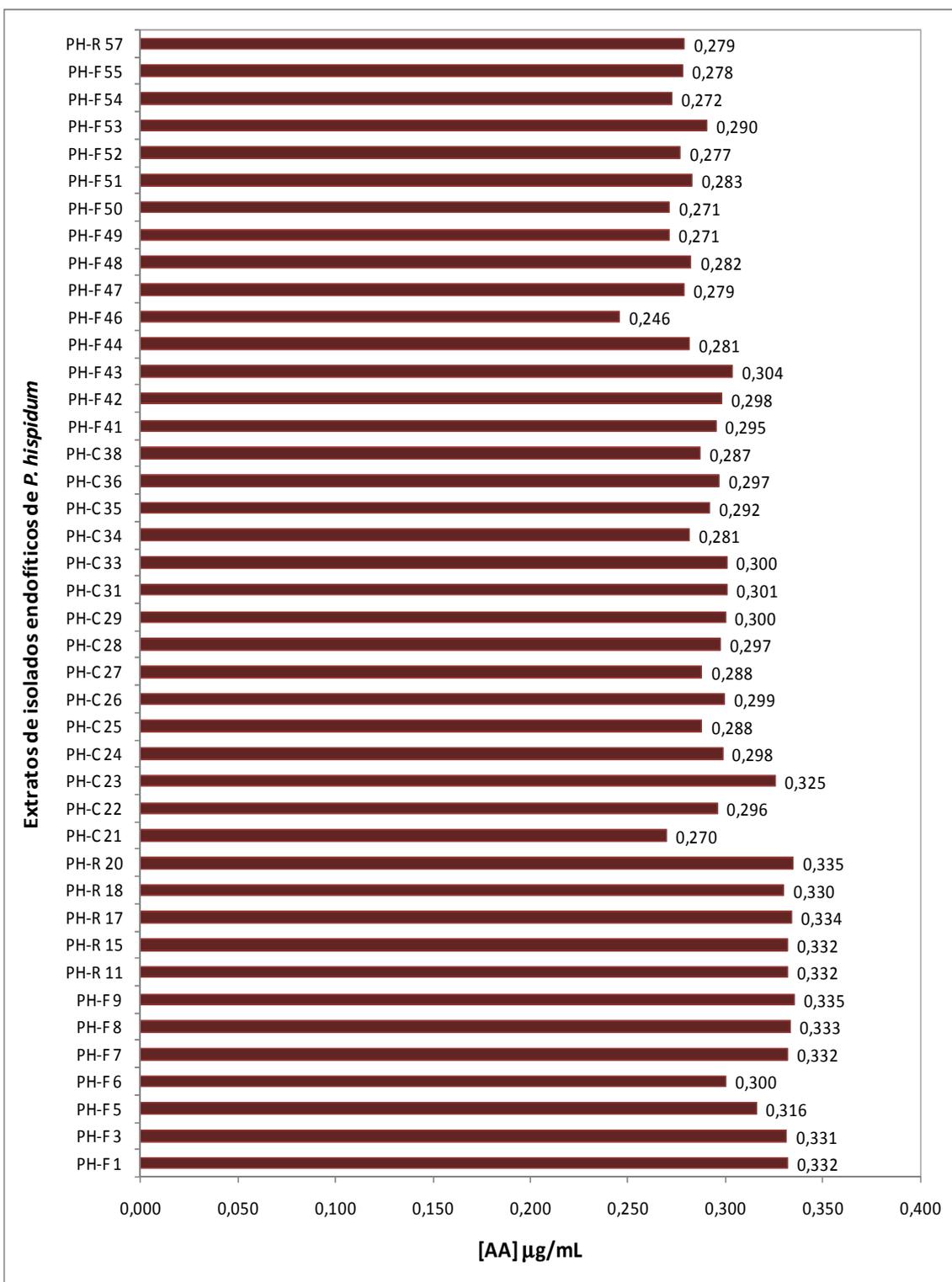


Figura 15 - Concentração equivalente de ácido ascórbico presente nos extratos fúngicos, obtida nos ensaios com DPPH.

Os extratos dos isolados fúngicos testados demonstraram uma baixa capacidade de sequestrar radicais livres, visto que os valores de absorbância obtidos nos ensaios com DPPH são baixos (correspondentes a concentrações entre 0,246 e 0,335 µg/mL de

ácido ascórbico). Os isolados de folha e de caule produziram extratos que apresentaram em média, atividade antioxidante equivalente à 0,295 µg/mL de ácido ascórbico. Os extratos obtidos dos isolados da raiz de *P. hispidum* apresentaram média de atividade antioxidante mais alta, correspondente a 0,323 µg/mL de ácido ascórbico. Apesar dos fungos isolados de raiz apresentarem extratos com maiores valores de concentração equivalente de ácido ascórbico, não foi verificado nenhum extrato com valores muito superiores às médias encontradas, ou seja, nenhum dos extratos se destacou em relação à presença de compostos com atividade antioxidante.

É incorreto afirmar que outros isolados endofíticos de *P. hispidum* não sejam capazes de seqüestrar radicais livres, pois talvez as condições de cultivo utilizadas neste trabalho não tenham promovido a biossíntese de moléculas antioxidantes. Outros fatores como a alta reatividade do DPPH, principalmente na presença de luz, a pequena quantidade de extrato bruto utilizada nos ensaios (10 µL), e o tempo de reação, podem ter interferido nos resultados de atividade antioxidante dos sobrenadantes fúngicos.

5.7.2 Determinação da capacidade antioxidante dos extratos dos isolados fúngicos usando Fe³⁺ como agente oxidante

Os mecanismos de ação dos antioxidantes são bem variados. Estes compostos podem atuar na remoção do oxigênio do meio, no seqüestro de metais catalisadores que auxiliam na formação de radicais livres, no aumento da geração de antioxidantes endógenos, ou mesmo com a interação de mais de um mecanismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; ARAÚJO, 2002).

Considerando os diversos mecanismos de atuação dos compostos antioxidantes, a utilização de íons de ferro mostrou-se como uma alternativa interessante para testar a atividade antioxidante dos sobrenadantes de isolados fúngicos de *P. hispidum*, visto que a metodologia baseia-se na capacidade de redução de um íon e não de um radical livre, como no método do DPPH. Dessa forma, foi possível verificar a presença de moléculas com mecanismos de ação antioxidante diferentes.

Na Figura 33 pode ser observada a curva analítica da concentração de ácido ascórbico ([AA] µg/mL) *versus* a concentração de Fe²⁺ ([Fe²⁺] µg/mL), íon liberado após a reação com o agente antioxidante. Neste método de análise de atividade antioxidante as concentrações de ácido ascórbico utilizadas foram maiores que as

utilizadas no método com o DPPH, em função do elevado custo do radical livre. Sendo assim, os valores equivalentes de concentração de ácido ascórbico nos extratos de fungos endofíticos de *P. hispidum* são maiores.

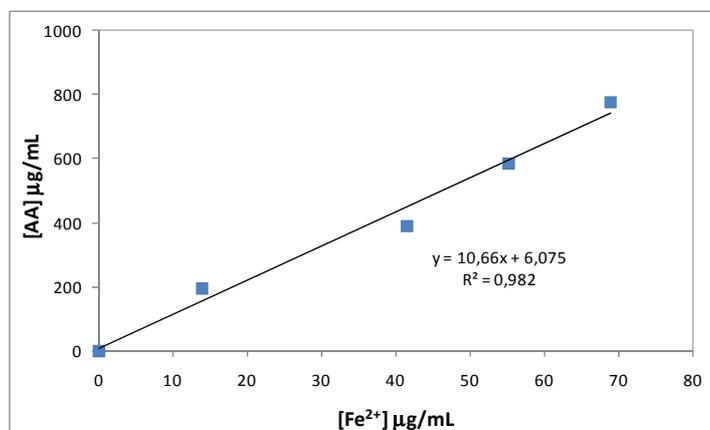


Figura 33 – Curva analítica da concentração de Fe²⁺ obtida no ensaio de atividade antioxidante utilizando Fe³⁺ para diferentes concentrações de ácido ascórbico.

A partir da equação da reta obtida na curva analítica, os resultados de atividade antioxidante dos extratos fúngicos utilizando o método do Fe³⁺ foram expressos em função da concentração de ácido ascórbico. A Figura 34 apresenta os valores correspondentes de concentração de ácido ascórbico referentes à atividade antioxidante presentes nos extratos fúngicos, a partir dos ensaios utilizando Fe³⁺.

Como pode ser observado na Figura 33, os fungos que produziram os extratos com os maiores valores de atividade antioxidante frente o íon Fe³⁺ foram os isolados do caule PH-C 21, PH-C 22 e PH-C 38. Estes extratos apresentaram baixa atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH (Figura 31). Este fato pode ter ocorrido em virtude da diferença no mecanismo de ação dos antioxidantes presentes nos sobrenadantes destes isolados, que apresentam maior capacidade de reduzir íons do que complexar radicais livres.

De modo geral, os extratos de fungos endofíticos isolados de caule de *P. hispidum* apresentaram maior capacidade de reduzir os íons de Fe do que formar complexos com o DPPH, enquanto os isolados de raiz mostraram-se mais eficientes na reação com o radical livre.

Considerando a concentração máxima de ácido ascórbico analisada no ensaio com Fe³⁺, de 777,6 µg/mL, verifica-se que a atividade antioxidante dos extratos fúngicos foi, de modo geral, baixa, atingindo no máximo o equivalente a 297 µg/mL de ácido ascórbico.

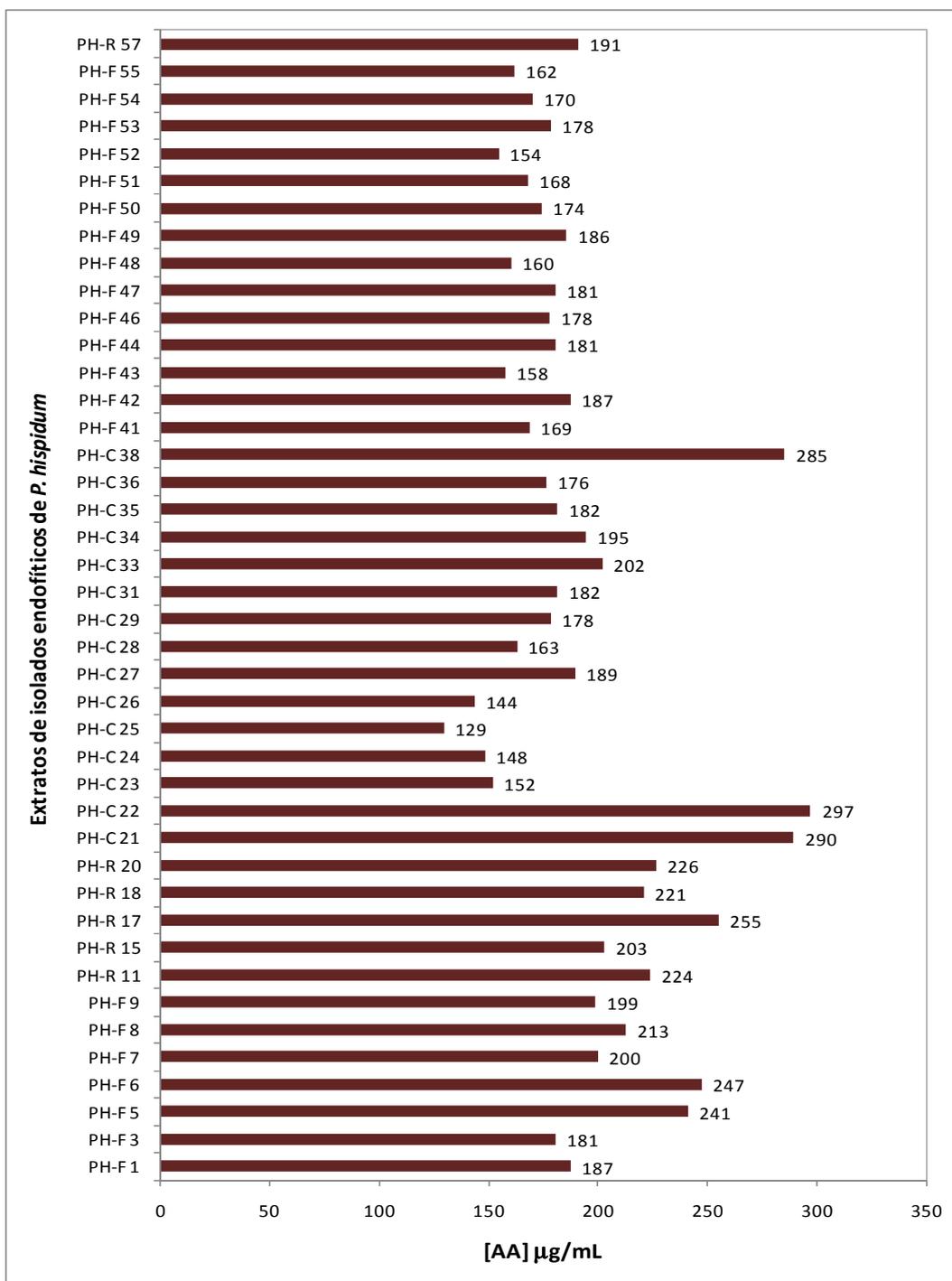


Figura 34 – Concentração equivalente de ácido ascórbico para os extratos fúngicos nos ensaios com Fe^{3+} .

Sendo assim, pode-se afirmar que os isolados endofíticos do caule de *P. hispidum*, PH-C 21, PH-C 22 e PH-C 38, apresentam potencial para serem utilizados em posteriores prospecções de compostos com atividade antioxidante.

6. CONCLUSÕES

De posse dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Foram isolados 58 fungos endofíticos de duas espécimes de *P. hispidum* coletadas na zona urbana de Manaus, sendo que o maior número de isolados foi obtido nos fragmentos foliares;
2. Não houve grande diversidade nos isolados endofíticos de *P. hispidum*, que foram divididos em nove grupos morfológicos, sendo os prováveis gêneros *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Peniophora*, *Glomerella* e *Curvularia*.
3. Quinze isolados de *P. hispidum* produzem compostos antimicrobianos com ação antagônica frente as cepas patogênicas testadas. Dois isolados inibiram o crescimento de *S. aureus*, sete apresentaram atividade contra *S. sonnei*, três fungos produziram compostos com atividade frente *E. coli*, e oito isolados endofíticos possuem ação antagônica frente *P. vulgaris*.
4. A comparação dos perfis cromatográficos dos extratos fúngicos que apresentaram atividade antimicrobiana com os perfis de antibióticos comerciais (amoxicilina e cefaloxina) sugere que os fungos produzem moléculas com estruturas químicas semelhantes às dos fármacos comerciais;
5. Os isolados de *P. hispidum* produzem enzimas de interesse comercial. Foram encontrados 12 produtores de amilase; 5 de lipase, 4 de protease, 4 de celulase, 4 de pectinase e 1 de xilanase;
6. Os isolados de *P. hispidum* não apresentarem eficiência como biocatalisadores na reação de esterificação do ácido linoléico com dodecanol;
7. Os isolados de *P. hispidum* avaliados neste trabalho não produzem safrol, citronelol; (*R*)-carvona e α -pineno. Os isolados PH-F 52, PH-F 54 e PH-C 34 são potenciais produtores de terpinoleno e β -cariofileno;
8. Os extratos produzidos pelos isolados de *P. hispidum* têm uma atividade antioxidante baixa quando comparada à do ácido ascórbico; sendo que três isolados do caule mostraram-se promissores na redução de íons de Fe.
9. Todos os isolados estão disponíveis na micoteca do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais – MBT da UEA.

7. PERSPECTIVAS

- Fazer novo isolamento dos fungos endofíticos de *P. hispidum* em diferentes estações do ano para comparação da influência do clima na produção dos metabólitos primários e secundários;
- Realizar a triagem seletiva de fungos em meios de cultura diferenciados que favoreçam a produção de substâncias de interesse, tais como enzimas, compostos antimicrobianos, óleos essenciais e antioxidantes;
- Avaliar a influência da concentração de fontes de nitrogênio no meio de cultivo dos isolados de *P. hispidum*, visando induzir a produção de terpenos;
- Estudar a fisiologia fúngica para determinação das condições adequadas de crescimento para aperfeiçoar a produção de moléculas de interesse comercial;
- Utilizar marcadores moleculares para seleção de fungos com genes que codificam para enzimas que regulam a via metil eritritol fosfato;
- Concentrar os extratos fúngicos obtidos para avaliar a atividade antioxidante do concentrado;
- Realizar a identificação molecular dos fungos que apresentaram potencial biotecnológico neste estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, C.N.; GUTIÉRREZ-SANCHEZ, G. Review: Sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science Technology International**. v.7, p.373-382, 2001.

ALEXOPOULOS C. J; MIMS C. W; BLACKWELL M. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York: John Wiley, 1996. 869 p.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SER, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1 p. 21-28, 1998.

ALLEN T.W.; BURPEE L.L.; BUCK J.W. In vitro attachment of phyloplane yeasts to *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotinia homoeocarpa*. **Canadian Journal of Microbiol**, v.12, p.1041-1048, 2004.

ALMEIDA,C.V.;YARA,R.; ALMEIDA,M. Fungos Endofíticos Isolados de Ápices caulinares de Pupunheira Cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.467-470, 2005.

ALVES, L.F.A.; GASSEN, F.G.S.; PINTO, P.M.O.J.; NEVES, S.B.; ALVES, M.G. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 507-510, 2005.

ANDREOTTI, R.E.; MEDEIROS, J.E.; ROCHE, C.E.; MANDELS, M. Effects of strain and substrate on production of cellulases by *Trichoderma reesei* mutants. In: GHOSE, T.K. **Bioconversion and Bioengineering Symposium**. Centre Nova Deli: Biomedical Engineering Research, 1980. p.353 – 371.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. 1996. 99f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo. 1996.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILARVILDOSO,C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

ARAÚJO,W.L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

ARTS, J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; VOSS, H.P. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical toxicology**, v.42, p.45-49, 2004.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogenic radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.419-421, 2000.

ARAÚJO, A.S.R. **Influência do Hipotireoidismo no Dano Oxidativo e nas Defesas Antioxidantes**. 2002. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. **Fungi: Multifaceted Microbes**. New Dehli: Anamaya Publication, 2006. p.189-207.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p.269-294.

AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M. **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.445-461.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p.173-180.

AZEVEDO, J.L.; Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, p.225-229, 1999.

BAJPAI, P.; BHARDWAJ, N.K.; BAJPAI, P.K.; JAUHARI, M.B. The impact of xylanases on bleaching of eucalyptus Kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 38, p.1-6, 1994.

BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal Basic Microbiology**, v.41, p.313-318, 2001.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3^a ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1994. 1972p.

BARROS, I. A. **Isolamento e biodiversidade de bactérias endofíticas de *Dicksonia Sellwiana* e seu potencial biotecnológico.** 2003. 76f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2003.

BARY, A. **Morfologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten.** Engelman: Leipzig, 1866. 316p.

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia brasileira**, v.3, p.441-443, 2004.

BASTOS, C.N.; SILVA, D.H.M.M.; GUIMARÃES, E.F.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Atividade bactericida e composição de óleos essenciais de *Piper* spp. **Documentos**, Campinas. 74p. 2003.

BÉLANGER, R.R.; LABBÉ, C.; JARVIS, W. R. Comercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. **Plant disease**, v.78, p. 420-424, 1994.

BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G.C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.644-653, 1977.

BESSIERE, C. Arc-consistency and arc-consistency again. **Artificial Intelligence**, v.65, p.179-190, 1994.

BEYNON R.J.; BOND J.S. **Proteolytic enzymes - a practical approach.** Oxford: IRL Press, 1989. 259p.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v.175, p.1-9, 1999.

BOTTIA S., E.J.; DÍAZ F., O.L.; MENDIVELSO, D.L.; MARTÍNEZ, J.R.; STASHENKO, E.E. Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultânea. **Scientia Et Technica**, v.XIII, n.033, p.193-195, 2007.

BRAND, W.W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BROGLIO, M.S.M.F.; SANTOS, A.J.N.; PEREIRA, B.J.L. Ação de alguns produtos fitossanitários para adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Agrotécnica**, v. 30, p.1051-1055, 2006.

CARROL, G. **The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials:** Microbiology of the phylloplane. London: Cambridge University Press, 1986, 729p.

CASTELLANI, A. Viability of Mold Culture of Fungi in Distilled Water. **Journal Tropical Medicine**, v.42, p.225-226, 1939.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v.71, p.45-50, 2000.

CHERFAS, J. Disappearing Mushrooms: Another Mass Extinction? **Science**, v.254, p.1458-1458, 1991.

COLOMBO, P.M. Occurrence of endophytic bacteria in *Siphonous algae*. **Phycologia**, v.17, p.148-151, 1978.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; KENGTONG, S.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. **Phytochemistry**, v.70, p.407-413, 2009.

CÁRDENAS, M.I.; GALÁN, W.L.; FERRÉ, M. J.; PEREYRA, A.B. Selección de toxinas cry contra *Trichoplusia ni*. **Ciência Uanl**, v.4, p.51-62, 2001.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ, M.J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.145-154, 2001.

DHILLON, A.; GUPTA, J.K.; JAUHARI, B.M.; KHANNA, S. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerante xylanase produced by *Bacillus ciculans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. **Bioresource Technology**, v. 73, p.273-277, 2000.

DIAS, A.C. F.; COSTA, F.E.C.; ANDREOTE, F.D; LACAVAL, P.T.; TEIXEIRA, M.A.; ASSUMPCÃO, L.C.; ARAUJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p.189-195, 2009.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

DURÁN, E.L.; PLOPER, L.D.; RAMALHO, J.C.; PICCOLO, G.R.A.; HUPPER GIANCOLI, Á.C.; AZEVEDO, J.L. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p.350-355, 2005.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EducS, 2004. p.245-260.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment. **Applied Catalysis B. Environmental**, v.28, p.83-99, 2000.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; MCGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOTT, T.M.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.430, p.37-48, 2004.

ESTRELA, J.L.V.; GUEDES, R.N.C.; MALTHA, C.R.A.; FAZOLIN, M. Toxicidade de amidas análogas a Piperina a larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepdoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepdoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.32, p.343-346, 2003.

EYBERGUER, A.L.; REJESWARY, D.; PORTTER, J.R. Endofhytes fulgal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Jornal of Natural Products**, v.69, p. 1121-1124, 2006.

ELLNAIN, W.M.; KRUCZYNSKI, Z.; KASPRZAK, J. Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. **Fitoterapia**, v.74, p.1-6, 2003.

FACUNDO, V.A.; ROBERTA, P.A.; VALERIA, R.R.; TEIXEIRA, M.J.S.; QUERINO, S.R.; CARDOSO, T.C. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v.38, p.743-748, 2008.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA; M.S.; ALÉCIO, M.R. Toxicidade do óleo de *P. aduncum* L. a Adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.485-489, 2005.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA; M.S.; ALÉCIO, M.R.; LIMA, M.S. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *P. aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758(1). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.113-120, 2007.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de madeira. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p.215-240.

FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; SILVA, C.A.L.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Piper spp* cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp, **Horticultura Brasileira**, v.21, p.400-403, 2003.

FIGUEIREDO, M.L.C.; CRUZ, I.; DELLA, L.; TEREZINHA, M.C. Controle integrado de *spodoptera frugiperda* (smith & abbot) utilizando-se o parasitóide *telenomus remus* nixon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1975-1982, 1999.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia Bratislava**, v.62, p.251-257, 2007.

FISHER, P.J.; GRAF, F.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C.; WOOKEY, P.A. Fungal Endophytes of *Dryas octopetala* from a High Arctic Polar Semidesert and from the Swiss Alps. **Mycologia**, v.87, p.319-323, 1995.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H.M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p.299-305, 1992.

FONTES, J.R, E.A.; SOUSA, P.J.C.; SOUSA, R.C.; MAIA, J.G.S.; SANTOS, A.M.S. Atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *Piper aduncum* In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL. 2002, **Resumos**, Salvador, 2002. 66p.

FONTES, J.R, E.A.; SOUSA, P.J.C.; SOUSA, R.C.; MAIA, J.G.S.; SANTOS, A.M.S. Atividade antiinflamatória e analgésica do óleo essencial de *P. aduncum* In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL. 2002, **Resumos**, Salvador, 2002. 66p.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J.P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.127-130, 1999.

GAIA, J.M.D.; MOTA, M.G.C.; CONCEIÇÃO, C.C.C.; COSTA, M.R.; MAIA, J.G.S. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p.686-689, 2004.

GUIMARÃES, A.C. **Estudo químico e biológico de *Cladocolea micrantha*, uma planta medicinal da região amazônica.** 2005. 330f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

GUIMARÃES, D.O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae).** 2006. 236f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 2006.

HALLMANN, J.; QUADT, H.A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

Haslam, E. Natural polyphenol as drugs: possible modes of action. **Journal Natural Products**, v.59, p.202-205, 1996.

HAWKSWORTH, D.L. The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, significance, and Conservation; **Mycology Resume**. v.95, p.641-655, 1991.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen.** Birkhäuser Verlag:Stuttgart, 1990. 100p.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiology Technology**, v.30, p.454-456, 2002.

HUBBELL, D.H.; MORALES, V.M.; UMALLI, G.M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. **Applied Environmental Microbiology**, v.35, p.210-213, 1978.

HERAR, A.; KREYE, L; WENDEL, V.; CAPEWELL, A.; MEYER, H.H.; SCHEPER, T.H.; KOLISIS, F.N. Factor affecting the lipase catalyzed transesterification reactions of 3-hydroxy esters in organic solvents. **Tetrahedron Asymmetry**, v.4, p.1007-1016, 1993.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

ILMÉN, M.; SALOHEIMO, A.; ONNELA, M.; PENTTILÄ, M.E. Regulation of cellulose gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.4, p.1298-1306, 1997.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.390-397, 2002.

JANSSEN, A.E.M.; SJURSENS, B.J.; VAAKUROV, A.; HALLING, P.J. Enzyme microbiol. **Technology**, v.24, p.463-470, 1999.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.4, p.706-716, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v.40, p.2931-2944, 2005.

JENSEN, S.; HANSEN, J.; BOLL, P.M. Lignans and neolignans from Piperaceae. **Hytochemistry**, v.3, p.523-530, 1993.

JIMENEZ, Z.J.I.; MATEOS, P.F.; DAZZO, F.B.; MARTINEZ, M.E. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil Biology Biochemistry**, v.28, p.917-921, 1996.

KIEK, O.; BORCHERT T. V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.

KOBAYASHI, M. The boring to logs of several broadleaf trees by *Platypus quercivorus* (Murayama). **Applend Science**, v.9, p.99-103, 2000.

KIM, H.; MELEN, K.; OSTERBERG, M.; HEIJNE, G. A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome. **National Academy Sciences**. v.30, p.11142-11147, 2006.

KORITALA, S.; HESSELTINE, C.W.; PRYDE E.H.; MOUNTS, T.L. Biochemical modification of fats by microorganisms: a preliminary survey. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.4, p.505-513, 1987.

KUBICEK, C.P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.L.; KUBICEK, P.E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.90-99, 1993.

KUKLINSKY, S.J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI, L.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant Soil**, v.273, p.91-99, 2005.

LAGO, J.G.L.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, C.C.D.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, C.D.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.F.; YOUNG, M.M.C.; KATO, M.J. Benzoic Acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p.1783-1788, 2004.

LAGO, J.H.G.; TANIZAKI, T.M.; YOUNGC, M.C.M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M.J. Antifungal Piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC **Journal of the Brazilian Chemical Societ.**, v.16, p.153-156, 2005.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M.R.; MORENO, V. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p.683-686, 2002.

LAZOROVITS, G.; NOWAK, J.; Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Hort Science**, v.32, p.188–192, 1997.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannic acyl hydrolase: State of the art. **Advances in Applied Microbiology**. v.44, p.215-260, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 3^a Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

LIMA, V.A.; AQUARONE, E.; BARZANI, V. **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1986. 285p.

LOBATO, A. K. S.; SANTOS, D. G. C.; NETO, C. F. O.; COSTA, R. C. L. Germinação de Sementes de Feijão-Caupi tratadas com óleo essencial de *Piper aduncum* L. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI. 2006, **Resumos**, Teresina, 2006, 235p.

LOGUERCIO, L.C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educ, 2004. p. 47-88.

LIESE, A.; FILHO, M.F. Production of fine chemicals using biocatalysis. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 10, p.595-603, 1999.

LÓPEZ-SERRANO, P.; WEGMAN M.A.; VAN RANTWIJK, F.E; SHELDON, R.A. Enantioselective enzyme catalysed ammoniolysis of amino acid derivatives. Effect of temperature. **Tetrahedron Asymmetry**, v.12, p.235-240, 2001.

LU, M. L.; LANE, H. Y.; CHEN, K. P. Fluvoxamine reduces the clozapine dosage needed in refractory schizophrenic patients. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.61, p.594-599, 2000.

LU J, M.; ZHANG, C.L; OLSON, E.N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. **Molecular Cell**, v.6, p.233–244, 2000.

LU, B.S.; HYDE, K.D.; HO, W.H.; TSUI, K.M.; TAYLOR, J.E.; WONG, K.M.; YANNA, D.Q. Checklist of Hong Kong fungi. **Fungal Diversity Research Series**, v.5, p.201-207, 2000.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrihum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p.67-73, 2000.

MAIA, J.G.S.; ZOHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; LUZ, A.I.R.; BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *P. aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p.269-272, 1998.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Atividades amilolítica e pectinolítica de *Alternaria solani* e a relação com a agressividade em tomateiro. **Summa Phytopathology**, v.32, n.4, p.345-352, 2006.

MARTINS, R.C.C.; SARTORELLI, P.; LATORRE, L. R.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.7, p.843-846, 2000.

MARY NK, A.C.R.; BABU BH, P.J. *In vitro* antioxidant and antithrombotic activity of *Hemidesmus indicus* (L) R.Br. **Journal Ethnopharmacol**, v.87, p.187-191, 2003.

MATEOS, P.F.; JIMENEZ, Z.J.L.; CHEN, J.; SQUARTINI, A.S.; HAACK, S.K.; MARTINEZ, M.E.; HUBBELL, D.H.; DAZZO, F.B. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1816-1822, 1992.

MCFERREN, M.A.; CORDOVA D.; RODRIGUEZ, E.; RAUH, J.J. *In vitro* neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.201-207, 2002.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. Controle Biológico. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 3, p.19– 39, 1999.

MENEZES, J.C.; ALVES, T.P.; CARDOSO, J.P. Biotecnologia Microbiana: A produção de Penicilina. In: LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: DIFEL, 2000. p.78-95.

MENDES, M.M.G.S.; PEREIRA, S.A.; OLIVEIRA, R.L.; DUVOISIN JR., S; ALBUQUERQUE, P.M. Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Aceito para publicação, 2010.

MESQUITA, J.M.O. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira Farmacognitiva**, v.15, p.6-12, 2005.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. **Int Biodeterior Biodegradation**, v.46, p.51-59, 2000.

MINAMI, P.S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses**. Barueri: Manole, 2003. 199 p.

MONTEIRO, G.M.; LIRA, D.S.; MAIA, J.G.S.; BARROS, C.A.L.; SOUSA, P.J.C. Acute and sub-acute toxicity of the essential oil of *P. aduncum* In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, Águas de Lindóia, 2001. p.153, 2001.

MORANDIM, A.A.; NAVICKIENE, H.M.D.; REGASINI, L.O.; CORDON, T.; FERRI, A.F.; AGRIPINO, D.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; MARQUES, M.O.M.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Constituição e atividade antifúngica dos óleos essenciais das folhas e caules de *P. aduncum* L, *P. arboreum* Aublet e *P.tuberculatum* Jacq e dos frutos de *P. aduncum* L. e *P. tuberculatum* Jacq. **Documentos**, Campinas. 74p. 2003.

MORANDIM, A.A; BERGAMO, D.C.B; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.. Circadian Rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *P. aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v.16, p.282-286, 2005.

MOREIRA, Fabiana Guillen et al.. Production of hydrolytic enzymes by the plant pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria* in submerged cultures. **Brazilian Journal Microbiology**, v.36, p.07-11, 2005.

MORO, F.; MAGALHÃES, E.; GALÚCIO, E.; MOYSÉS, K.; ANTUNES, V.C.; VINTAL, T.C. Efficacy of cyclosporine 0.05% for preventing endothelial loss in corneal transplant. **Revista Brasileira Oftalmologista**, v.66, p.321-326, 2007.

MOTA, M.G.C.; COSTA, C.C.C.; MAIA, J.G.S. Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *P. aduncum* na Amazônia Brasileira. In: **SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS DA AMÉRICA LATINA E CARIBE, Resumos**. Londrina, 2001. 89p.

NOVAES, J. A. P. **Desenvolvimento e Validação de Método para Quantificação da Capacidade Redutora de Extratos Vegetais Secos**. 2007. 31f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais)-Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2007.

NOWAK, G.; MATUSZEWSKA, A.; NOWAK, M. Protein secretion and oxidase activities in idiophasic cultures of *Trametes versicolor*. In: 7TH INTERNATIONAL

CONFERENCE OF BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, **Resumos**. Canadá, 1998. 300p.

NAVICKIENE, H.M.D.; MORANDIM, A.A.; ALÉCIO, A.C.; REGASINI, L.O.; BERGAMO, D.C.B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, M.N.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; MARQUES, M.O.M.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J.; Composition and antifungal activity of essential oils from *P. aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatu*. **Quimica Nova**, v. 29, p.467-470, 2006.

NIELSEN, R.I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v.12, p.69-71, 1998.

NEVES, K. C.S.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**, v.36, p.299-306, 2006.

NOWAK, J. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **Biology Plant**, v.34, p.122-130, 1998.

OLIVEIRA, L.C.P.; MAUSE, R.; NUNOMURA, S.M. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *P. aduncum* L. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.1439-1442, 2005.

OLIVEIRA, R.C.; BANDO, E.; MACHINSKI, J.M. Intralaboratory optimization and validation of a method for patulin determination in grapes by Thin-Layer Chromatography. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.304-308, 2007.

ORJALA, J.; WRIGHT, A.D.; BEHRENDTS, H.; FOLKERS, G.; STICHER, O.; RUEGGER, H.; RALI, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p.18 -26, 1994.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E.; BOLL, P.M. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46, p.597-673, 1997.

PASTORE, G.L.; MACEDO, G. A. Utilização dos fungos na industria de alimentos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004. p. 311-334.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações, v. 2, São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.1130-1133, 2005.

PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, R.G. A note on the production of extracellular hydrolytic enzymes by yeast-like fungi and related microorganisms. **Annual Microbiology and Enzymology**, v.42, p.81-86, 1992.

PHAM, P.L.; TAILLANDIER, P.; DELMAS, M. STREHAIANO, P. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. **Industrial Crops and Products**, v.7, p.195-203, 1998.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.S. Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p.45-51, 2002.

PINTO, G.A.S. **Produção de tanase por *Aspergillus niger***. 2003. 213f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

REDDY, N. S.; NIMMAGADDA, A.; RAO, K.R.S.S. An overview of the microbial α -amylase family. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p.645-648, 2003.

ROSA, S.M.; SOUZA, L.A.; Estruturas de Reprodução de *Piper amalago* Var. *medium* Linnaeus (Piperaceae). **Acta Científica Venezolana**, v.55, p.27-34, 2004.

RODRIGUES, A.N.; SANT'ANNA, E.S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.1, p.63-66, 2001.

ROMERO, M.C.; BAIGORI, M.D.; PERA, M.L. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.1067-1069, 2007.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal Biological Science**, v.1, p.24-33, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science Food Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANCHEZ-MONTERO, J.M.; HAMON, V.; THOMAS, D.; LEGOY, M.D. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology International**, v.39, p.791-800, 1991.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The Endophytic Continuum. **Mycological Research**, v.6, p.661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G.; Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal Microbiology**, v.4, p.239-249, 2004.

SILVA, C.A.M. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria guardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)**. 2007. 197f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

SILVA, D.M.H.; BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.43-145, 2007.

SILVA, I.L.S.S.; RESENDE, M.L.V.; JUNIOR, P.M.R.; COSTA, J.C.B.; CAMILO, R.F.; BAPTISTA, J.C.; SALGADO, S.M.L. Efeito de nutrientes combinados com indutores de resistência na proteção contra a vassoura-de-bruxa no cacauero. **Ciência Agrotécnica**, v.32, p.61-67, 2008.

SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C.W.; MACCHIONE, M.M.; PARK, Y.K. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe. **Brazilian Journal Microbiology**, v.36, p.235-241, 2005.

SILVÉRIO, M. B. **Análise econômica da biodiversidade na Amazônia brasileira**. 2004 23f. Monografia (Bacharelado em Economia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

SOARES, J.B; CASIMIRO, A.R.S; AGUIAR, L.M.B.A. Morfologia dos fungos filamentosos-bolores ou mofosos. **Microbiologia Básica** cap. V, p. 71, 1987.

SORENSEN, M; DOYGAARDS, S.; ESTELLA, JE.; KVIST, LP.; NIELSEN, PE. Status of the South American tuberous legume *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. **Biodiversity and Conservation**, v.6, p.1581–1625, 1997.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI F.S. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v.34, p.185-195, 2004.

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

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000, p.3-30.

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

STROBEL, G.A.; KNIGHTON, B.; KLUCK, K.; REN, Y.; LIVINGHOUSE, T.; GRIFFIN, M.; SPAKOWICZ, D.; SEARS, J. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Micology**, v. 154, p.3319-3328, 2008.

STROBEL, G.A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p.2943-2950, 2001.

TEIXEIRA, M.F.S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus Penicillium* termofílicas e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos**. 1994. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Alimento)-Universidade Federal do Amazonas, 1994.

THIES, W.; KALKO, E.K.V. Phenology of neotropical pepper plants (Piperaceae) and their association with their main dispersers, two shorttailed fruit bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea* (Phyllostomidae). **Oikos**, v.104, p.326-376, 2004.

THOMAS, P. Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.114-123, 2004.

TORRES, M.; DOLCET, M.M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.51, p.3328-3333, 2003.

TUDZYNSKI, P.; TUDZYNSKI, B. Fungal genetics: Novel techniques and regulatory circuits. In: ANKE, T. **Fungal Biotechnology**. London: Chapman and Hall, 1997. p.229-243.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; Leveduras para o Biocontrole de Fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 2000. p.307-320.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular Cellular Biochemistry**, v. 266, p.37-56, 2004.

VARMA A.; VERMA S.; SUDHA, S.N.; BUETEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica* – a cultivable plant growth-promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizal fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v.65, p.2741–2744, 1999.

VENDRUSCOLO, F. ALBUQUERQUE, P. M.; STREIT, F.; ESPOSITO, E. NINOW, J. L. Apple pomace: a versatile substrate for biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 26, p. 15-28, 2008.

VÉRAS, S.M; YUYAMA, K. Controle da vassoura-de-Bruxa do cupuaçuzeiro por meio de extrato de *P. aduncum L.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS. **Resumos**. Fortaleza. 2000. p.15-19.

WADT, L.H.; DE, O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P.Y. Genetic diversity of “Pimenta Longa” genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.74-82, 2004.

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Applied Microbiology**, v.66, p.3468–3473, 2000.

WHITE, J.F.J.R.; COLE, G.T. Endophyte-Host Associations in Forage Grasses. IV. The Endophyte of *Festuca versuta*. **Mycologia**, v. 78, p.102-107, 1986.

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

ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L.U.S.; DUVOISIN JR., S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F.A.; SILVA, S.F.; ALBUQUERQUE, P.M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p.1046-1059, 2009.

ZARE-MAIVAN, H.; SHEARER, C.A. Extracellular enzyme production and cell wall degradation by freshwater lignicolous fungi. **Mycology**, v.80, p.365-375, 1988.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p.1266-1271, 2007.