

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS - MBT



ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS,
POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIMICROBIANO DE *Duguetia*
flagellaris Huber

JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA

MANAUS
2013

JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA

ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS,
POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIMICROBIANO DE *Duguetia*
flagellaris Huber

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

Orientador (a): **Prof^a Dr^a Antonia Queiroz Lima de Souza**

Co-orientador (a): **Prof^o Dr. Jair Max Furtunato Maia**

Colaborador: **Prof^o Dr. Antônio Carlos Webber**

MANAUS

2013

JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA

ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS,
POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIMICROBIANO DE *Duguetia*
flagellaris Huber

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

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Antônia Queiroz Lima de Souza
Universidade do Estado do Amazonas

Yamile Benaion Alencar
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Aldo Rodrigues de Lima Procópio
Faculdade Metropolitana de Manaus – FAMETRO

MANAUS
2013

*Dedico este trabalho ao meu Senhor e Salvador,
ao meu amado esposo que com todo amor e
paciência foi meu grande incentivador, e aos
meus queridos pais, irmã, cunhado e tia que
mesmo distantes estavam presentes em cada
conquista.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que com Seu grande amor me salvou e me cobriu de bênçãos, mesmo não sendo merecedora.

Ao meu esposo Rodolfo, que é meu amado, meu grande incentivador e companheiro fiel.

Aos meus pais por todo carinho e preocupação, por abrirem mão de tantas coisas para que eu pudesse estar aqui.

A minha irmã, exemplo de dedicação e competência e meu cunhado Marcos, pelo incentivo.

À minha tia Onília pelos cuidados e ensinamentos da infância.

Às minhas amadas igrejas pelas orações e amor demonstrados.

À prof^a Antonia pela orientação e ajuda.

Ao prof Jair pela disponibilidade e observações.

Ao prof Webber, prof^a Lilian, prof Afonso e Vanda pela disponibilidade em me ajudar.

Aos amigos e colegas do Mestrado, especialmente Jaqueline e Simone pelas conversas, risadas e ajuda.

Aos amigos Liane, Paulo, Fátima, Fabiana, Thaís, Renyer pelas companhias, idéias e paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPEAM, ao Programa Biocom, pelos recursos financeiros que auxiliaram na pesquisa da minha dissertação.

*“Nem olhos viram, nem ouvidos
ouviram, nem jamais penetrou em
coração humano o que Deus tem
preparado para aqueles que o amam”.*
I Coríntios 2:9

RESUMO

ESTUDO DA BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS, POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIMICROBIANO DE *Duguetia flagellaris* Huber

Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, Nº 1777 CEP: 69055-001. Manaus – AM, SOUZA, J. G., SOUZA, A. Q. L. e MAIA, J. M. F.
jugs_bio@hotmail.com; antoniaqlsouza@yahoo.com.br; jairmaia@gmail.com.

O vasto espaço da Floresta Amazônica concentra 1/3 do total de todas as espécies da Terra. Toda essa riqueza, no entanto corre risco de extinção devido à falta de conhecimento multidisciplinar e ao uso indiscriminado pelo homem. Mais precária ainda é a ausência de informações intra-específicas e sobre o potencial biotecnológico que estas podem apresentar. No Estado de São Paulo foram listadas 1.009 espécies ameaçadas de extinção ou extintas em 2005 e o Banco de Dados Tropical indicou 2.754 espécies de plantas brasileiras com algum grau de ameaça nos anos 90, entre as quais 49 são Annonaceae. Como estes dados não são atualizados é de se esperar uma relação bem maior de plantas ameaçadas. Portanto, o conhecimento da biodiversidade vegetal, animal e de micro-organismos é um desafio ao uso racional e à conservação da diversidade genética para as gerações futuras. A família Annonaceae, que é tipicamente dos neotrópicos, possui um grande potencial para pesquisas nas áreas de: botânica, microbiológica, genética, biotecnológica, química de produtos naturais, conservação, entre outras. Com aproximadamente 120 gêneros, 2.000 espécies e o centro de distribuição nas Regiões Amazônica e Guianas, as anonáceas são potenciais produtoras de substâncias com atividades biológicas, tais como: anti-cancerígena, antiprotozoários (leishmanicida e antimalárica) e inseticida. Estas atividades são atribuídas a dois importantes grupos de moléculas: as acetogeninas, exclusivo destas plantas e os alcalóides, relacionados à atividade antimalárica. Dentre a biodiversidade vegetal da Floresta Amazônica encontra-se *D. flagellaris* (Annonaceae) cujo conhecimento dos seus endófitos, o potencial biotecnológico destes e o conhecimento sobre a interação planta/micro-organismos são inexistentes. Por essas razões é que nos propusemos estudá-las para pesquisar o potencial biotecnológico das plantas e de seus micro-organismos endofíticos com ensaios contra micro-organismos de interesse médico e indicadores de atividade citotóxica, além de investigar a interação entre os fungos endofíticos e as hospedeiras. Neste estudo, isolou-se 247 micro-organismos endofíticos, sendo 234 fungos resultando em uma taxa de colonização de 108,3%. Os grupos mais frequentes isolados neste trabalho foram: *Phomopsis* (45,4%), *Fusarium* (14,8%) e *Colletotrichum* (25,5%). O tecido vegetal em que foi isolado o maior número de fungos endofíticos foi o flagelo (45,4%), seguido do galho (38,4%) e da folha (24,5%). Entretanto, deve-se ressaltar que no galho isolou-se o maior número de grupos (14), e a folha e o flagelo, apresentaram uma diversidade menor: 8 e 6 grupos, respectivamente. De acordo com os meios de cultura testados, os meios BDA+AT, BDA+CT, Aveia+AT e ISP2+CT apresentaram maiores taxas de colonização. Os extratos vegetais em sua maioria demonstraram atividade pelo menos contra 2 agentes patogênicos e uma atividade antimicrobiana significativa foi apresentada pelo extrato Galho-Hexano, onde observou-se um halo de 18 mm contra *E. faecalis*. Os grupos fúngicos em sua maioria apresentaram atividade contra pelo menos dois micro-organismos testados.

Conclui-se que *D. flagellaris* possui um elevado índice de colonização e uma potencial atividade citotóxica e antimicrobiana, juntamente com seus fungos endofíticos que também demonstraram atividade contra importantes patógenos.

Palavras chaves: *Duguetia flagellaris*, fungos endofíticos, metabólitos secundários.

Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Linha de pesquisa: Caracterização da biota Amazônica para uso biotecnológico e estudos filogenéticos.

Fonte financiadora: CAPES e FAPEAM.

ABSTRACT

STUDY OF BIODIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI, POTENTIAL CYTOTOXIC AND ANTIMICROBIAL OF *Duguetia flagellaris* Huber

Universidade do Estado do Amazonas. Rua Carvalho Leal, N° 1777 CEP: 69055-001. Manaus – AM, SOUZA, J. G., SOUZA, A. Q. L. e MAIA, J. M. F.
jugs_bio@hotmail.com; antoniaqlsouza@yahoo.com.br; jairmaia@gmail.com.

The vast expanse of the Amazon rainforest concentrates third of the total of all species on Earth. However, all this wealth suffers risk of extinction due to lack of multidisciplinary knowledge and indiscriminate use by man. Even more precarious is the absence of intra-specific information and the biotechnological potential that these may present. In the State of São Paulo were 1,009 endangered or extinct species listed in 2005 and the Database Tropical indicated 2,754 species of Brazilian plants with some degree of threat in the 90s, among which 49 are Annonaceae. As these data are not updated is to expect a much higher ratio of threatened plants. Therefore, knowledge of plant biodiversity, animal and micro-organism is a challenge to the rational use and conservation of genetic diversity for future generations. The family Annonaceae, is typically of the Neotropics, has a great potential for research in the areas of botany, microbiological, genetics, biotechnology, natural products chemistry, conservation, among others. With approximately 120 genera, 2,000 species and distribution center in Regions Amazon and Guianas, the Annonaceae are potential producers of substances with biological activities, such as anticancer, antiprotozoal (leishmanicidal and antimalarial) and insecticide. These activities are assigned to two major groups of molecules: the aromatic polyketides, these unique plants and alkaloids related to antimalarial activity. Among the plant biodiversity of the Amazon Rainforest is *D. flagellaris* (Annonaceae) whose knowledge of their endophytes, the biotechnological potential of these and knowledge about the interaction of plant/microorganisms are nonexistent. For these reasons is that we set out to study them to research the biotechnological potential of plants and their endophytes with tests against microorganisms of medical interest and indicators of cytotoxic activity, and to investigate the interaction between endophytic fungi and host. In this study, we isolated 247 endophytic microorganisms, among these 234 are fungi resulting in a fungi colonization rate of 108.3%. The groups most frequently isolated in this study were: *Phomopsis* (45.4%), *Fusarium* (14.8%) and *Colletotrichum* (25.5%). The plant tissue was isolated in which the largest number of endophytic fungi was flagellum (45.4%), followed by branch (38.4%) and leaf (24.5%). However, in the branch isolated the largest number of groups (14), and leaf and flagellum, showed a lower diversity: 8 and 6 groups, respectively. According to the tested media, media BDA+AT, BDA+CT, Aveia+AT and ISP2+CT had higher rates of colonization. The plant extracts demonstrated mostly activity against at least two pathogens and a significant antimicrobial activity was presented by Branch-Hexane extract, where there was a halo of 18 mm against *E. faecalis*. Fungal groups mostly showed activity against at least two microorganisms. Therefore concluded that *D. flagellaris* has a high rate of colonization and a potential antimicrobial and cytotoxic activity, together with their endophytic fungi also demonstrated activity against important pathogens.

Keywords: *Duguetia flagellaris*, endophytic fungi, secondary metabolites.

Area of Concentration: Genetics and Biotechnology.

Research line: characterization of Amazonian biota to use biotechnology and phylogenetic studies.

Financial support: CAPES and FAPEAM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos grupos morfológicos de fungos endofíticos isolados de <i>D. flagellaris</i> segundo os tecidos vegetais. Dados expressos em unidades e frequência relativa (%).	25
Tabela 2: Distribuição das bactérias endofíticas isoladas de <i>D. flagellaris</i> segundo os tecidos vegetais e dados expressos em unidades e frequência relativa (%).	25
Tabela 3: Distribuição total dos micro-organismos endofíticos isolados de <i>D. flagellaris</i> segundo os tecidos vegetais e dados expressos em unidades e frequência relativa (%).	26
Tabela 4: Distribuição dos fungos endofíticos isolados de <i>D. flagellaris</i> de acordo com o Meio de cultura e agrupamento macroscópico, dados expressos em unidades e frequência relativa (%).	33
Tabela 5: Peso e rendimento dos extratos de <i>D. flagellaris</i>	40
Tabela 6: Resultados dos testes de Difusão em Ágar dos extratos vegetais (2mg/mL) contra <i>C.albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i>	40
Tabela 7: Distribuição dos grupos de acordo com o período de incubação e pH final do líquido metabólito.	42
Tabela 8: Resultados dos testes de Difusão em Ágar dos líquidos metabólitos fúngicos contra <i>C.albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i> . Diâmetro dos halos em mmm	44
Tabela 9: Resultado da DL ₅₀ de extratos de <i>D. flagellaris</i> no teste de toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach – TAS	50
Tabela 10: Principais íons detectados no espectro de massas (ESI-IT-MS) dos extratos vegetais metanólicos de <i>D. flagellaris</i>	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica em que se encontra inserida a Fazenda Experimental da UFAM, com seus limites e acesso.....	15
Figura 2: <i>D. flagellaris</i> (A - Fonte: Neotropical plants image data base), Identificação de <i>D. flagellaris</i> (B), Folha de <i>D. flagellaris</i> coletada (C).....	16
Figura 3: Modelo do isolamento de micro-organismos endofíticos de <i>D. flagellaris</i> (SOUZA, 2006).....	18
Figura 4: Aspectos macroscópicos de micro-organismos isolados de <i>D. flagellaris</i>	24
Figura 5: Distribuição dos micro-organismos endofíticos isolados de <i>D. flagellaris</i> segundo tecido vegetal e agrupamento macroscópico, dados expressos em frequência relativa (%).	26
Figura 6: Frequência relativa de isolamento de fungos endofíticos de <i>D. flagellaris</i> por tecidos vegetais.....	29
Figura 7: Diversidade fúngica endofítica isolada de <i>D. flagellaris</i> por tecido vegetal.....	29
Figura 8: Distribuição dos fungos endofíticos isolados de <i>D. flagellaris</i> segundo tecido vegetal empregado.	30
Figura 9: Distribuição dos micro-organismos isolados de <i>D. flagellaris</i> a partir da temperatura de crescimento.....	32
Figura 10: Frequência relativa de isolamento de endófitos de <i>D. flagellaris</i> por meios de cultura.....	34
Figura 11: Distribuição dos grupos fúngicos isolados de <i>D. flagellaris</i> segundo meio de cultura empregado.	34
Figura 12: Diversidade fúngica isolada de <i>D. flagellaris</i> por meio de cultura empregado.	34
Figura 13: Características macroscópicas e microscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de <i>D. flagellaris</i>	36
Figura 14 : Atividade antimicrobiana dos líquidos metabólitos e extratos fúngicos.....	47
Figura 15: Total de metabólitos intra e extracelulares para 17 isolados de <i>D. flagellaris</i> fermentados em escala analítica com atividade antimicrobiana.	49
Figura 16: Ensaios de atividade antitumoral dos extratos vegetais de <i>D. flagellaris</i>	51

Figura 17: Placa cromatográfica dos extratos vegetais revelada com Dragendorff.	52
Figura 18: Espectro de massa (ESI-IT-MS) do extrato Galho-metanol. Possíveis estruturas dos alcalóides benzoquinolínicos.	54
Figura 19: Espectro de massa (ESI-IT-MS) do extrato Folha-metanol. Possíveis estruturas dos alcalóides benzoquinolínicos.	55
Figura 20: Espectro de massa (ESI-IT-MS) do extrato Flagelo-metanol. Possíveis estruturas dos alcalóides benzoquinolínicos.	56

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. Micro-organismos Endofíticos.....	3
2.2. Relações Micro-organismos x Hospedeiro.....	5
2.3. Aplicações de Micro-organismos Endofíticos.....	6
2.4. Produtos naturais bioativos de origem microbiana.....	7
2.5. Patógenos de importância médica.....	8
2.6. Atividade citotóxica.....	10
2.7. A Família Annonaceae e suas características.....	11
2.8. O hospedeiro vegetal: <i>Duguetia</i>	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Geral.....	14
3.2. Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Área de coleta.....	15
4.2. Amostragem.....	16
4.3. Procedimentos.....	17
4.3.1. Desinfecção do Material Vegetal e Isolamento dos Endófitos.....	17
4.3.2. Purificação e identificação dos isolados.....	18
4.3.3. Obtenção e Caracterização dos Metabólitos Bioativos.....	20
4.3.3.1. Preparação dos extratos vegetais.....	20
4.3.3.2. Preparação dos Líquidos metabólitos e extratos fúngicos.....	20
4.3.3.3. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	21
4.3.3.4. Ensaio para detecção de atividade citotóxica e antitumoral.....	21
4.3.4. Avaliação da presença de alcalóides.....	22
4.3.4.1. Cromatografia em Camada delgada.....	22
4.3.4.2. Espectrometria de massas.....	23

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Isolamento e Taxa de colonização.....	24
5.2. Fatores avaliados no isolamento.....	32
5.2.1 Temperatura de Crescimento.....	32
5.2.2 Meios de cultura.....	32
5.3. Identificação dos grupos	35
5.4. Obtenção e atividade antimicrobiana dos Extratos vegetais.....	39
5.5. Obtenção e atividade antimicrobiana dos metabólitos e extratos fúngicos.....	42
5.6. Atividade citotóxica e antitumoral dos extratos vegetais.....	49
5.7. Cromatografia em camada delgada.....	52
5.8. Espectrometria de massas.....	53
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8. ANEXOS.....	68

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical é imensa. O Brasil possui cerca de 20% da biodiversidade mundial e grande parte é representada pela Floresta Amazônica, a maior floresta tropical úmida do planeta. Contudo, a cada ano o número de espécies ameaçadas de extinção ou extintas aumenta; informações do Banco de Dados Tropical indicam que 2.754 espécies de plantas brasileiras apresentavam algum grau de ameaça nos anos 90, entre as quais 49 são Annonaceae. Estima-se que cada espécie vegetal possua micro-organismos endofíticos ainda não classificados e com propriedades desconhecidas, mas com potencial interesse a ser aplicado. Apesar da enorme biodiversidade presente na Amazônia, as espécies presentes e as relações filogenéticas ainda são pouco conhecidas, e esse quadro fica ainda mais preocupante quando em questão estão os micro-organismos e suas interações com outros seres. (NETO et al., 2002; SOUZA et al., 2004).

Parte dos micro-organismos, principalmente os fungos e bactérias, habita no interior das plantas, e são considerados endófitos. Eles colonizam os variados tecidos vegetais saudáveis e neles permanecem por todo ou determinado período de seu tempo de vida, sem causar danos aparentes. Apesar de exercerem importante papel na vida do hospedeiro, apenas recentemente vêm despertando o interesse de pesquisadores, principalmente devido à produção de substâncias biotecnologicamente importantes (PETRINI, 1991; SOUZA et al., 2004).

Os micro-organismos endofíticos são fontes de novos antibióticos, imunossupressores e substâncias anticâncer (FERRARA, 2006). Os fungos em especial constituem uma fonte excepcionalmente rica de fármacos como antibióticos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos, e estreptograminas), substâncias antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina, e ácidos aureólicos), agentes redutores de colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), etc. (DEMAIN, 1999; NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2000). De todas as substâncias naturais biologicamente ativas conhecidas atualmente, aproximadamente 1/4 é proveniente de fungos (KONGSAEREE et al., 2003).

Nos últimos anos, a dificuldade e alto custo do desenvolvimento de novas drogas com diferenciado poder de atuação tornou-se um grande desafio para a indústria farmacêutica o que desencadeou em um declínio no lançamento de novas drogas no mercado (DEMAIN, 1999). Juntamente com este problema está o aparecimento de resistência aos medicamentos já utilizados, o surgimento de novas doenças e problemas com a toxicidade de algumas drogas (RAMS – reações adversas a medicamentos). Isto demonstra a enorme necessidade e aplicabilidade da triagem de micro-organismos e plantas para o descobrimento de novas classes de antimicrobianos (CAMPOS, 2009).

Nas últimas décadas diversos produtos naturais vêm sendo descobertos e caracterizados, muitos com ação terapêutica, isolados principalmente de micro-organismos e plantas (CLARDY e WALSH, 2004; NEWMAN e CRAGG, 2007). Esses produtos representam uma fonte inestimável para o desenvolvimento de novas drogas. Portanto, a pesquisa de micro-organismos e plantas, de seus metabólitos e das interações existentes entre eles e seus hospedeiros é muito promissora.

Tendo em vista a grande importância que os micro-organismos endofíticos possuem, juntamente com a necessidade do descobrimento de novos produtos naturais, este trabalho se dispõe a pesquisar estes temas tão relevantes para o conhecimento científico e para a sociedade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Micro-organismos endofíticos são aqueles micro-organismos que habitam o interior da planta, sem causar aparentemente nenhum dano ao hospedeiro. Eles tiveram sua primeira menção no século XIX, mas foi Bary (1866) que fez a distinção entre eles e micro-organismos patogênicos. A princípio eles foram definidos como assintomáticos, não produzindo efeitos benéficos ou prejudiciais ao seu hospedeiro. Por esses motivos, e além de não produzirem estruturas externas visíveis e o conhecimento a respeito de suas reais funções ser muito pequeno, esses micro-organismos ficaram por volta de um século esquecidos. Apenas no final dos anos 70, os estudos se intensificaram sendo impulsionados pelas descobertas de funções importantes como a produção de toxinas, antibióticos, alcalóides, enzimas, fatores de crescimento, e outras substâncias com potencial interesse biotecnológico; e a proteção contra insetos-praga, herbívoros e micro-organismos patogênicos. Algumas dessas funções imprescindíveis para a defesa e sobrevivência do hospedeiro (AZEVEDO, 1998; NETO et al., 2002).

A colonização dos micro-organismos endofíticos pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ e BOYLE, 2005). Em geral, para entrar nas plantas os micro-organismos utilizam aberturas naturais ou feridas. As raízes são a principal porta de entrada deles nas plantas, onde durante o crescimento vegetal a própria penetração no solo gera abrasões, e o surgimento das raízes secundárias laterais é acompanhado por uma “ferida”. As aberturas naturais como estômatos, hidatódios, feridas causadas por insetos e fungos patogênicos também são utilizados na entrada dos micro-organismos. Além disso, os próprios endófitos possuem estratégias como a produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração na planta. Após a entrada, eles podem atingir diversos órgãos dentro da planta (folha, caule, etc.), entretanto, usualmente os fungos habitam as partes superiores das plantas como folhas, galhos, casca, pecíolo e estruturas reprodutivas (FAETH & FAGAN, 2002). Os endófitos também podem passar de uma planta para outra nos organismos onde ocorre propagação vegetativa (AZEVEDO, 1998; NETO et al., 2002).

A diversidade dos fungos endofíticos em uma planta pode ser muito alta, podendo ser encontradas mais de 100 espécies em somente um tecido (BORGES, 2008). As plantas tropicais apresentam uma grande diversidade de micro-organismos endofíticos, muitos deles ainda não estudados e que podem pertencer a novos gêneros e espécies (PEIXOTO NETO et al., 2002; STROBEL, 2002).

Dentre os micro-organismos endofíticos, destacam-se os actinomicetos principalmente os pertencentes ao gênero *Streptomyces* spp. Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas que podem desenvolver micélio superficial e submerso e no caso de actinomicetos maiores, as hifas podem ser semelhantes às de fungos com relação ao tamanho e características. Podem ser observados também a formação de esporos aéreos e conídeos, dispostos em cadeia ou em esporângio (STROBEL & DAISY, 2003). Este grupo é bastante conhecido pela produção de metabólitos secundários como antibióticos e enzimas extra-celulares (INBAR et al., 2005).

O gênero *Streptomyces* trata-se de bactérias aeróbias estritas, com micélio aéreo bem desenvolvido, não fragmentado, e cadeias de esporos por segmentação das hifas. Suas colônias são macias, mas à medida de seu crescimento, elas tornam-se algodonosas ou pulverulentas. Podem ser encontradas no interior de plantas e no solo e apresentar aroma característico de solo (HOPWOOD, 2007). Este gênero é um dos maiores produtores de metabólitos ativos que são aplicados na indústria e medicina, e é responsável pela produção de mais de 80% dos antibióticos conhecidos (CHALLIS e HOPWOOD, 2003; INBAR et al., 2005). *Streptomyces* spp. isolados de planta vêm apresentando substâncias de grande interesse como ciclopentanos isolados de *Aegiceras comiclatum* (LIN et al., 2005) e unubicina E4 e E5 (antibiótico de amplo espectro contra patógenos humanos e de plantas) isolados de *Kennedia nigriscans* (CASTILLO et al., 2002).

Existem 50.000 metabólitos secundários de micro-organismos, sendo que 12.000 tratam-se de antibióticos. Dentre esses, 55% foram produzidos por actinomicetos e 22% por fungos filamentosos (DEMAIN, 1999).

De acordo com Hawksworth (2001) estima-se que existem cerca de 300 mil espécies de plantas e que cada uma hospede pelo menos, um ou mais fungos endofíticos, podendo chegar a um milhão de espécies de fungos, considerando apenas os endófitos. Desse total, apenas 10% foram descobertos e descritos até o momento e somente 1% foi examinado quanto ao seu espectro de metabólitos

secundários (ARNOLD et al., 2000; GUO et al., 2008). Portanto, as chances de se encontrar novos micro-organismos endofíticos dentre os milhares de plantas em diversos ecossistemas são enormes (STROBEL e DAISY, 2003).

2.2. RELAÇÕES MICRO-ORGANISMOS X HOSPEDEIRO

Didaticamente aplica-se a distinção entre os micro-organismos endofíticos, epifíticos e patogênicos. Os epifíticos colonizam a superfície dos vegetais, os patogênicos causam dano ao hospedeiro e os endófitos vivem no interior das plantas aparentemente sem causar danos às hospedeiras (NETO et al., 2002; PEIXOTO NETO et al., 2002).

Entretanto, Azevedo e colaboradores (2002) consideram que não há uma exata distinção entre os micro-organismos endofíticos, epifíticos e patogênicos, existindo apenas um gradiente de interfaces entre eles. Ou seja, eventualmente um micro-organismo epifítico pode ser encontrado dentro do vegetal; um endófito, por sua vez, em certas condições pode atuar como patógeno; e um patógeno poderia ser considerado um endófito, quando não afetasse o hospedeiro.

De todas as espécies vegetais estudadas até o momento, todas apresentaram micro-organismos endofíticos, o que demonstra que a presença destes micro-organismos é um fenômeno geral e comum e corrobora com a possibilidade de se encontrar novos e importantes endófitos a partir de estudos nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos (PEREIRA e AZEVEDO, 1993; FAETH, 2002; STROBEL e DAISY, 2003, MOREIRA et al., 2009). Além disso, os micro-organismos endofíticos podem ter uma estreita relação co-evolucionária com seu hospedeiro que pode ser simbiótica, mutualística ou neutra (WILSON, 1993; KRIEL et al., 2000, NETO, 2002). Essas interações podem resultar na indução ou produção de metabólitos primários e secundários que desempenham papéis fundamentais para a sanidade da planta como a proteção contra herbivoria, controle de outros micro-organismos e aumento da tolerância às modificações ambientais (NETO et al., 2002; GUNATILAKA, 2006, KOGEL et al., 2006).

A especificidade entre o endófito e seu hospedeiro pode alcançar o nível de espécie (LECHTMANN e CLAY, 1990; SIEBER-CANAVESI et al., 1991). A composição destas espécies pode variar de acordo com a distribuição geográfica das plantas, a idade dos hospedeiros, as condições ecológicas e sazonais, e o

tecido vegetal (CARROLL e CARROLL, 1978, PETRINI 1991; MOREIRA et al., 2009). Uma maior frequência de endófitos vem sendo encontrada em tecidos mais velhos com relação aos mais novos (MOREIRA et al., 2009).

Entre os micro-organismos, os fungos são os que se encontram mais frequentemente associados às plantas (ZOBERI, 1972). A simbiose entre a planta e o endofítico está associada à proteção e alimentação dos fungos, que por sua vez, produzem substâncias bioativas que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro no meio ambiente, como: hormônios reguladores de crescimento, antibióticos, inseticidas, etc. (LU et al., 2000).

2.3. APLICAÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os micro-organismos endofíticos podem produzir diversas substâncias com potenciais aplicações biotecnológicas e exercer papéis fundamentais para a sobrevivência e o desenvolvimento do seu hospedeiro. Eles podem agir como agentes no controle de pragas e doenças, produzir substâncias bioativas como fitohormônios que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza, induzindo, por exemplo, a produção de sementes (YUE et al., 2000); além de poderem ser utilizados como micoherbicidas no controle de ervas daninhas (CERKAUSKAS, 1987), competirem com fitopatógenos por nutrientes, produzirem substâncias antagônicas, parasitarem o patógeno ou induzirem a planta a desencadear resistência (NETO et al, 2002). Sousa e colaboradores (2006) observaram que bactérias endofíticas tinham potencial de atuar como agentes de controle biológico do nematóide *Meloidoyne incognita* em mudas de tomateiro. Actinomicetos agiram como potenciais agentes de biocontrole de doenças foliares do inhame (SOARES et al., 2006).

Além de possuir genes associados ao controle biológico, os micro-organismos endofíticos podem produzir enzimas, participar na biorremediação de compostos tóxicos e produzir metabólitos secundários com atividades terapêuticas (NETO et al., 2002).

Como resultado da função que os metabólitos secundários bioativos exercem na natureza, eles podem apresentar aplicações na medicina, agricultura e indústria (STROBEL, 2002). Além disso, a produção de enzimas, antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento, etc. por esses micro-organismos impulsiona as

pesquisas para a obtenção dessas substâncias com potencial biotecnológico (AZEVEDO, 1998).

Em programas de triagem, a proporção de substâncias bioativas produzidas por micro-organismos endofíticos e algas foi significativamente superior às produzidas por micro-organismos do solo (SCUHLZ et al., 2002). E cerca de 51% das substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos até 2002 eram previamente desconhecidas (STROBEL, 2002).

Os endófitos também podem ser uma importante estratégia na biologia molecular. Eles podem ser geneticamente modificados para serem aplicados como vetores com o objetivo de introduzir características genéticas de interesse em plantas economicamente importantes (TOMASINO et al., 1995). O uso de pesticidas além de gerar impacto ambiental e causar danos à saúde, eleva o custo da produção, porque devem ser aplicados várias vezes, devido ao fato de sofrerem com as ações dos fatores ambientais, como a chuva. A aplicação de endófitos modificados requer uma menor quantidade destes, visto que eles se multiplicam no interior da planta onde ficam protegidos do ambiente externo (CERIGIOLI, 2005). O primeiro estudo nessa área utilizou um milho inoculado com *Clavibacterxyli* sbsp. *cynodontis* (endófito), que recebeu o gene da endotoxina de *Bacillus thuringiensis* para o controle da broca do colmo (TOMASINO et al., 1995).

2.4. PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS DE ORIGEM MICROBIANA

A busca pelo desenvolvimento e aprimoramento de substâncias e novos produtos é realizada incessantemente pelas indústrias, empresas farmacêuticas e agroquímica. As principais fontes fornecedoras de substâncias com uma maior diversidade química são provenientes de fontes de origem natural (BORGES, 2008).

Aproximadamente 63 e 75% dos fármacos aprovados entre 1981 e 2006 para o combate do câncer e doenças infecciosas, são de produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007). Cerca da metade de todos os fármacos utilizados são de origem natural. Acredita-se que este número seja tão expressivo pelo motivo de que essas substâncias são desenvolvidas pelos organismos produtores para a sua autodefesa (PATERSON e ANDERSON, 2005).

Os produtos naturais provenientes de fungos endofíticos inibem ou matam uma variedade de agentes causadores de doenças nocivas, incluindo fitopatógenos, bactérias, fungos, vírus, protozoários e insetos (DEMAIN, 1999).

Além de terem grande participação na produção dessas substâncias, os micro-organismos compreendem uma enorme diversidade em espécies, e a sua aplicação é mais vantajosa visto que os processos operacionais são relativamente mais simples. Em comparação com as plantas, os fungos possuem crescimento mais rápido, em menor tempo e ocupam menor espaço (BORGES, 2008).

2.5. PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004), a infecção hospitalar atinge todo o mundo e esta relacionada com as condições e complexidade dos centros médicos. No Brasil, a taxa média da infecção hospitalar é de cerca de 15%, maior do que a de países como Estados Unidos da América e europeus onde o índice é de 10%.

O grupo de micro-organismos responsáveis por essas infecções é composto por fungos, bactérias e vírus, no entanto as bactérias ficam com a maior parcela de doenças, dentre elas estão *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O segundo grupo de maior importância são os fungos, sendo representados principalmente por *Candida albicans* e *Aspergillus* spp. Geralmente esses micro-organismos são pertencentes à microbiota humana e que por alguns motivos, dentre eles a supressão imunológica do hospedeiro, são capazes de causar infecções, sendo denominados oportunistas (ANVISA, 2004).

Figueiredo e colaboradores (2007) afirmam que nos últimos anos a multi-resistência de micro-organismos frente aos antimicrobianos vem crescendo, o que resulta em uma preocupante ameaça à saúde pública neste século.

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, oportunista, de importância médica sendo associada a casos de infecções no trato urinário, respiratório, sistêmicas, dermatites e bacteremias, principalmente em imunocomprometidos. (MARQUES et al., 2007). Possui como habitats naturais o solo, água e vegetais e está presente na microbiota natural do homem, como na pele, garganta e até nas fezes (MATA et al., 2007). Procedimentos invasivos, queimaduras e feridas podem servir de porta de entrada para este patógeno. A possibilidade de causar quadros

infecciosos em organismos imunossuprimidos, a resistência a um grande número de antibióticos, a capacidade de formar biofilme e de ser o colonizador mais frequente de um ambiente hospitalar com torna-a um importante patógeno associado às infecções hospitalares. Recentemente as opções de antibióticos no tratamento são limitadas, e geralmente são empregadas betalactâmicos carbapenêmicos, como por exemplo, o imipenem (NEVES et al., 2011). Essa classe de antibióticos é utilizada apenas em último caso quando a amostra apresenta multi-resistência, entretanto observa-se um aumento de cepas com esta característica, inclusive resistente ao imipenem, o que pode levar a um problema de saúde pública (NEVES et al., 2011). O aumento da frequência de cepas resistentes ao imipenem e a ausência de produtos terapêuticos alternativos que possuam espectro maior ou semelhante a este antibiótico, culminam em um grande desafio para a indústria farmacêutica. Além disso, as bactérias Gram-negativas possuem uma maior facilidade do desenvolvimento desta resistência; estas também são consideradas as mais frequentes em infecções hospitalares (MATA et al., 2007).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva em formato de cocos dispostos em cachos, pertencente à microbiota humana podendo ser encontrados na pele e fossas nasais de pessoas saudáveis. As infecções causadas por ela podem ser diversas e em diferentes intensidades abrangendo espinhas, furúnculos até casos mais graves como septicemia, pneumonia e endocardites. Com a descoberta dos antibióticos, infecções causadas por *S. aureus* foram umas das primeiras a serem tratadas com estes medicamentos. Contudo, a capacidade de adaptação e as resistências aos antimicrobianos tornam esta bactéria um importante patógeno em infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS, 2007).

Enterococcus faecalis são bactérias Gram-positivas, comensais, podendo ser isoladas do trato gastrointestinal, genitourinário e da cavidade bucal (PARADELLA, KOGA-ITO&JORGE, 2007). Podem ser encontradas no solo, água e plantas e são considerados contaminantes fecais. (RIBOLDI, 2007). Como na maioria das vezes elas estão presentes no hospedeiro sem causar nenhum sintoma, entretanto, uma imunossupressão pode desencadear uma possível infecção. As infecções causadas por esta bactéria possuem relevante participação nas infecções hospitalares. *E. faecalis* está associada a doenças na cavidade oral como: cáries, infecções endodônticas recorrentes e periodontites apicais (PARADELLA, KOGA-ITO&JORGE, 2007), a doenças nosocomiais, e a infecções

no trato urinário, sendo estas as mais comuns. Elas possuem uma resistência relativa à β -lactâmicos, resistência a baixas concentrações de aminoglicosídeos e lincosamidas. Além da capacidade de sobreviver em condições adversas, esta bactéria pode ser intrinsecamente resistente aos antimicrobianos geralmente empregados. Como em hospitais ocorre uma frequente exposição a diferentes antimicrobianos, observa-se uma emergência de linhagens resistentes (RIBOLDI, 2007).

Candida albicans é uma levedura pertencente à microbiota normal da boca, entretanto em casos de comprometimento imunológico ela pode desencadear infecções principalmente na pele, unhas, mucosas, trato intestinal, urinário e na boca (ALVES et al., 2006). Em imunocompetentes as infecções geralmente são superficiais e em imunodeprimidos podem ser sistêmicas. Para essas infecções, antifúngicos tópicos e sistêmicos são utilizados, como por exemplo, a clorexidina e o fluconazol. Infelizmente, já são registradas amostras que apresentam resistências aos antimicrobianos administrados. (ALVES et al., 2006).

2.6. ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os bioensaios são muito importantes para avaliação da ação de um determinado extrato (vegetal, animal, mineral ou microbiano) frente a um organismo (TEIXEIRA et al., 2011).

Atualmente o ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach – TAS desenvolvido por Meyer e colaboradores (1982) vem sendo utilizado por diversos grupos de pesquisas. Este ensaio utiliza larvas (náuplios) de um microcrustáceo que pode ser *Artemia salina* ou *Artemia franciscana* (TEIXEIRA et al., 2011).

Trata-se de um ensaio biológico, rápido, de baixo custo, simples e confiável, sendo amplamente aplicado na avaliação preliminar de extratos vegetais, e que demonstra uma boa correlação com atividade antitumoral e inseticida (SIQUEIRA et al., 2001).

2.7. A FAMÍLIA ANNONACEAE E SUAS CARACTERÍSTICAS

A família Annonaceae é constituída por 120 gêneros e aproximadamente 2000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais do globo terrestre (FECHINE et al., 2002). Ela está representada nos Neotrópicos por cerca de 40 gêneros e em torno de 650 espécies, com centros de distribuição na Região Amazônica e Guianas. Na América do Sul predominam os gêneros *Annona* L, *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil e *Xylopia* L. No Brasil, encontram-se 29 gêneros, dentre eles *Duguetia* spp. com 50 espécies. (RIBEIRO et al., 2002;)

As anonáceas são potenciais produtoras de substâncias com atividades biológicas, tais como: anti-cancerígena, antiprotozoários (leishmanicida e antimalárica) e inseticida. Estas atividades são atribuídas a dois importantes grupos de moléculas: as acetogeninas, exclusivo destas plantas e os alcalóides, relacionados à atividade antimalárica (FAGUNDES et al., 2005).

As acetogeninas apresentam diversas atividades biológicas como, por exemplo, antitumoral, imunossupressor, pesticida, antiprotozoário, anti-helmíntico e antimicrobiano, o que faz deste constituinte bioativo alvo de diversas pesquisas. Segundo Fagundes e colaboradores (2005), essas substâncias podem inibir seletivamente o crescimento de células cancerosas e células tumorais resistentes a adriamicina, demonstrando uma significativa seletividade entre certas linhagens celulares, especificamente, contra câncer de próstata. Por sua vez, os alcalóides estão sendo largamente estudados devido à sua atividade antimalárica (*Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*), leishmanicida (*Leishmania* spp.), anti-chagásica (*Trypanossoma cruzi*) e anti-helmíntica (*Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*) (ANISZEWSKI, 2007).

Muitas espécies de Annonaceae possuem óleos essenciais que normalmente são constituídos de monoterpenóides, sequiterpenóides, e/ou substâncias aromáticas. Algumas têm importância comercial como: óleo de Cananga (*Cananga odorata* Hook var. *macrophylla*) e o óleo de Ylang-Ylang (*Cananga odorata* Hook var. *Genuina*). No gênero *Duguetia* spp. os principais constituintes dos óleos essenciais são: cariofeno e dois superpenóides (*Duguetia* spp.), limoneno, p-cimeno e α -pineno (*D. asterostricha*), β -elemeno, óxido de

cariofileno e β -selineno (*D. lanceolata*) (CRAVEIRO et al., 1981; LEBOEUF et al., 1982; JURGENS et al., 2000; SOUSA, et al., 2004).

Sousa e colaboradores (2004) demonstraram que o óleo essencial de cascas de *D. lanceolata* possui efeitos antinociceptivo e antiinflamatório decorrentes da atuação dos constituintes sobre o sistema nervoso central e de ações periféricas (SOUSA, et al., 2004).

2.8. O HOSPEDEIRO VEGETAL: *DUGUETIA*

O gênero *Duguetia* compreende cerca de 80 espécies nativas na América. O centro da distribuição encontra-se na Amazônia e Guianas, mas existem representantes também em São Paulo e no Paraguai (SCHULTES e RAFFAUF, 1990). Neste estudo utilizou-se uma espécie pertencente a este gênero: *Duguetia flagellaris*.

A presença de alcalóides tem sido marcante nas espécies estudadas. De oito espécies sul-americanas isolou-se um total de 79 substâncias, dentre essas, 72 são alcalóides (NAVARRO et al., 2001; FECHINE et al, 2002). Fachine e colaboradores (2002) isolaram 6 alcalóides das folhas e galhos de *D. trunciflora*.

Estudos com *D. spixiana*, *D. stelichantha*, *D. eximia*, *D. obovata* e *D. calycina* revelaram a presença de alcalóides como benziltetrahydroisoquinolínicos, aporfinícos e oxoporfinícos (MUHAMMAD et al., 2001). Estudo realizado por Muhammad e colaboradores (2001) os alcalóides do extrato etanólico de *D. hadrantha* revelaram atividade antimalárica de hadrantina A, sampagina e 3-metoxisampagina contra o *Plasmodium falciparum*, e atividade citotóxica de sampagina e handratina B para células humanas de câncer. Siqueira e colaboradores (2001) isolaram em *D. glabriuscula* substâncias como a oxobuxifolina e lanuginosina, que se comportaram como ativas no TAS.

Silva e colaboradores (2007) isolaram 5 alcalóides de *D. furfuracea* e observaram atividades biológicas importantes como: ação antitripomastigota (duguetina, duguetina β -N-óxido, centrinona), antitumoral (duguetina, duguetina β -N-óxido, N-metiltetrahidropalmatina, N-metilglaucina) e leishmanicida (dicentriona, duguetina β -N-óxido).

A espécie *D. flagellaris* é comumente conhecida como castanha-de-cutia, ameju-preto e carniceiro-preto (RIBEIRO et al., 2002). Encontrada frequentemente

nas matas primárias não inundáveis, é uma árvore com altura em torno de 2-7m, com odor característico, floresce no período de outubro a dezembro e frutifica em fevereiro. (CORRÊA, 1984).

Segundo Navarro e colaboradores (2001), a espécie é rica em alcalóides, como vem sendo demonstrado em plantas pertencentes ao mesmo gênero. A partir do extrato etanólico de folhas, galhos finos e da casca do caule de *D. flagellaris* foram isolados 10 alcalóides: nornuciferina, O-metilisopilina, calicinina, duguevanina, oliveridina, duguetina, isopilina, pachipoclantina, oliverolina e oliverolina b-N-óxido, sendo os cinco últimos isolados pela primeira vez no gênero. (NAVARRO et al., 2001). Estudo realizado por Fecini e colaboradores (2002) demonstrou a presença dos mesmos alcalóides e de óleo essencial constituído principalmente por: spantulenol, α -muurolol, germacreno D e cypireno.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Investigar a biodiversidade dos fungos endofíticos e actinomicetos de *Duguetia flagellaris*, pesquisar seu potencial citotóxico e atividades antimicrobianas da hospedeira e de seus endófitos.

3.2. ESPECÍFICOS

- Coletar material biológico de *D. flagellaris* para realizar extrações orgânicas dos metabólitos secundários;
- A partir do material biológico de *D. flagellaris* realizar o isolamento, identificação e conservação de fungos endofíticos e actinomicetos cultiváveis;
- Obter extratos e líquidos metabólitos dos fungos endofíticos de *D. flagellaris* através da fermentação submersa.
- Realizar testes de atividade antimicrobiana dos extratos e líquidos metabólitos fúngicos contra patógenos de interesse médico;
- Avaliar a bioatividade citotóxica e antimicrobiana dos extratos de *D. flagellaris* e seus perfis químicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÁREA DE COLETA

A coleta foi realizada na Fazenda Experimental da UFAM ($02^{\circ} 37' 17.1''$ e $02^{\circ} 39' 41.4''$ S, $60^{\circ} 03' 29.1''$ e $60^{\circ} 07' 57.5''$ W), que abrange uma área de 3.000 ha, e está localizada no Km 38 da rodovia BR-174, fazendo limites ao sul com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e ao norte com a Estação Experimental de Fruticultura Tropical (EEFT) e Estação Experimental de Silvicultura Tropical (EEST), ambas pertencentes ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE, 2011) (Figura 1).

Além de construções e áreas de plantio, a Fazenda conta com uma área de floresta primária classificada como floresta tropical úmida de terra-firme, apresentando igarapés de grande porte, que de acordo com a cheia dos rios inundam grandes áreas; e cabeceiras e igarapés de primeira e segunda ordem que inundam pequenas áreas em resposta às chuvas diárias (AHUMADA, 2010). A altura média das árvores está compreendida entre 35 e 40 m, com árvores emergentes que atingem 50 m (RIBEIRO et al., 2002).

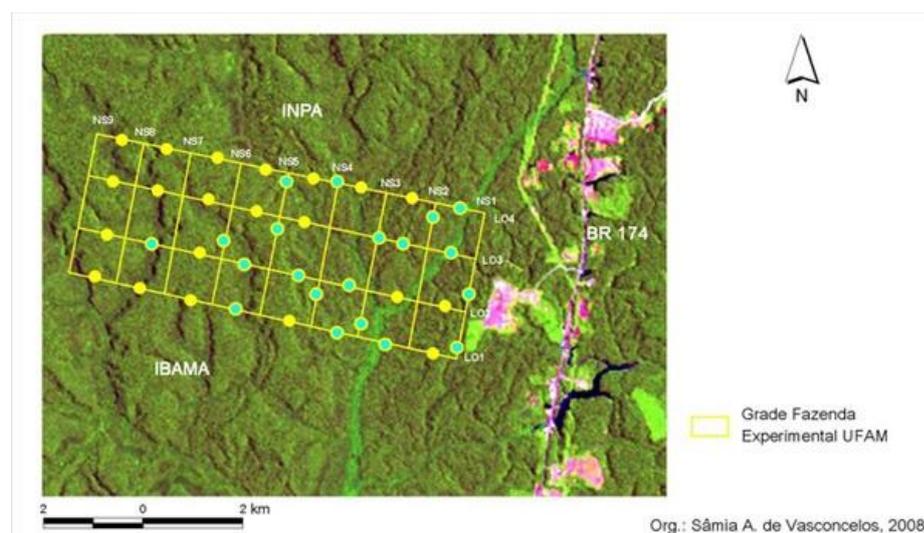


Figura 1: Localização geográfica em que se encontra inserida a Fazenda Experimental da UFAM, com seus limites e acesso. Fonte: Programa de Pesquisa em Biodiversidade, 2011.

Nesta área a temperatura do ar sofre pouca variação tendo valores médios entre 24,6 °C e 26,9 °C; a precipitação média anual é de 2362 mm (MARQUES FILHO et al., 1981) e a média da umidade relativa pode oscilar entre 75%, nos dias secos (junho a outubro), até 92% na estação chuvosa (novembro a maio) (ARAÚJO et al., 2002). O relevo da região é bastante acidentado, compreendendo áreas de vertentes com inclinações bastante acentuadas (AHUMADA, 2010).

4.2. AMOSTRAGEM

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais vegetais: folha, galho e flagelo para o isolamento dos micro-organismos endofíticos e obtenção dos extratos da planta. Os materiais foram obtidos através de uma coleta na Fazenda Experimental da UFAM (2°39,519'S; 60°3,925'O) em janeiro de 2012.

As amostras foram gentilmente identificadas pelo Dr. Antônio Carlos Webber – Departamento de Biologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), permanecendo armazenadas em sacos plásticos estéreis previamente identificados e posteriormente foram processadas em um período de até 24 horas após a coleta no Laboratório de Genética da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e após a secagem do material no Laboratório de Engenharia Química da Escola Superior de Tecnologia (EST/UEA).



Figura 2: *D. flagellaris* (A - Fonte: Neotropical plants image data base), Identificação de *D. flagellaris* (B), Folha de *D. flagellaris* coletada (C).

4.3. PROCEDIMENTOS

4.3.1. DESINFECÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DOS ENDÓFITOS

O material coletado foi lavado com detergente líquido e água corrente. Em seguida, para a remoção dos micro-organismos epifíticos foi realizada, em câmara asséptica, a esterilização superficial com álcool 70 % por 1 min, tratamento com hipoclorito de sódio 4 - 2% por 4 min, imersão em álcool 70 % por 30 segundos e finalmente lavagem em água destilada estéril da qual retirou-se 50 µL para o controle da assepsia (SOUZA et al., 2004).

Com auxílio de um bisturi e uma tesoura, ambos estéreis, as amostras foram cortadas em pequenos fragmentos e inoculadas (quatro fragmentos por placa), em triplicata em placas de Petri contendo: BDA (batata, dextrose, ágar) acrescido de extrato de levedura a 0,2 %, Agar Aveia e Agar ISP2, suplementados com tetracilcina+amoxicilina e tetraciclina+cloranfenicol (100 µg/mL), para isolamento de fungos filamentosos e leveduriformes, e bactérias, respectivamente. Os fragmentos foram incubados a 18 °C por sete dias. Durante esse período observou-se o crescimento dos micro-organismos e repicou-os para tubos de ensaio com BDA, Agar Aveia ou Agar ISP2. Após esse período, as placas foram incubadas a 26 °C por sete dias e em seguida, a temperatura foi aumentada para 40 °C, pelo mesmo tempo (Figura 3). O procedimento de isolamento citado anteriormente foi repetido nas etapas de incubação a 26 °C e 40 °C (SOUZA, 2006).

Todo o material foi datado e identificado para facilitar o uso posterior. Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Genética da UEA.

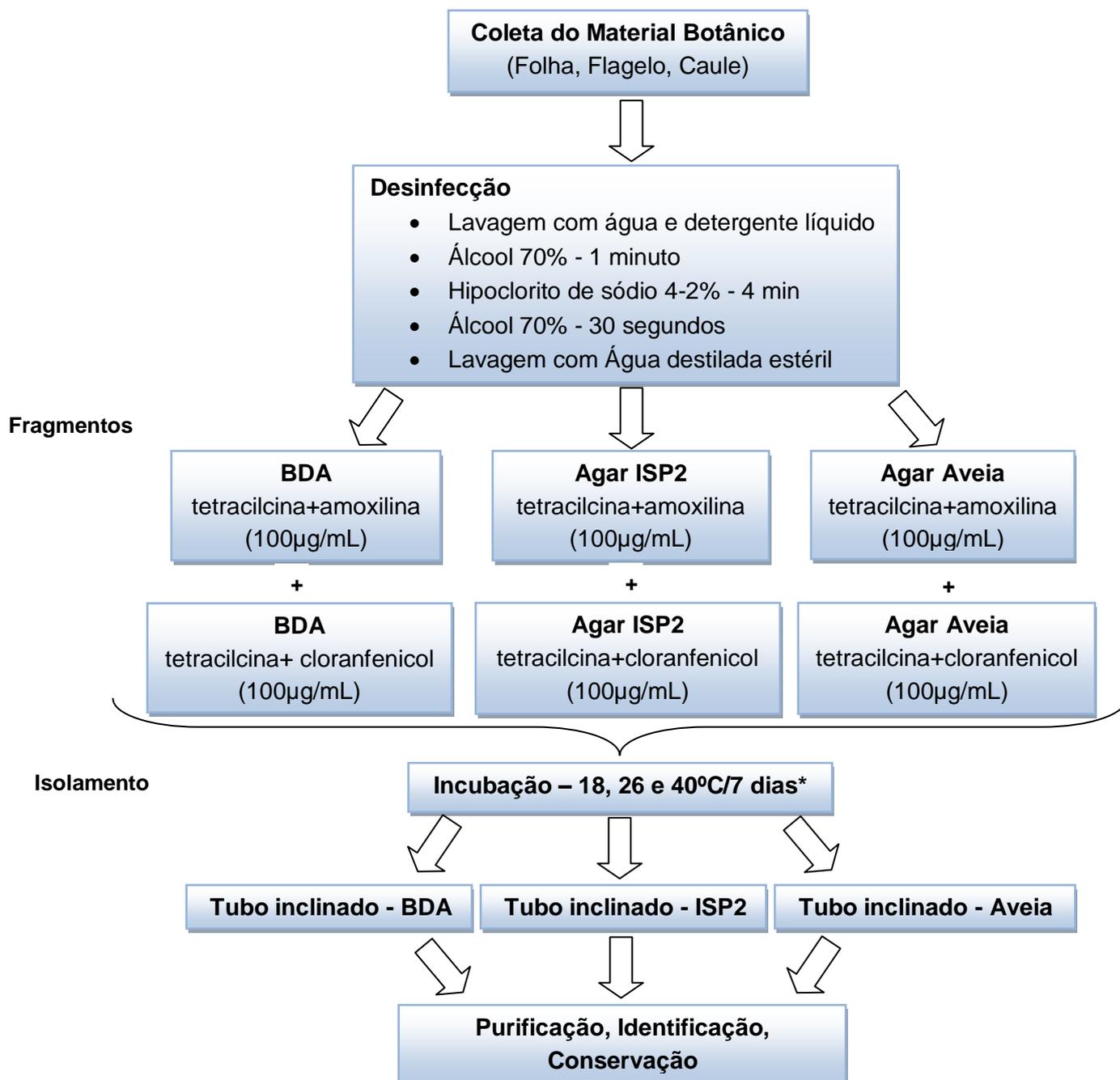


Figura 3: Modelo do isolamento de micro-organismos endofíticos de *D. flagellaris* (SOUZA, 2006).

4.3.2. PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Após o isolamento dos micro-organismos endofíticos foi realizada uma purificação através da técnica de Tween (AZEVEDO e COSTA, 1973) utilizada em fungos que apresentam esporulação (conídios ou esporos). Neste método obtêm-

se colônias monospóricas, provenientes de um único conídeo, a partir da diluição seriada seguida com plaqueamento em triplicata (diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Para fungos classificados como *Mycelia sterilia* e Ascomycetos a purificação ocorreu a partir de repiques sucessivos.

As conservações dos fungos mitospóricos foram realizadas por meio de três métodos: 1) método segundo Castellani (1939), com preservação de cinco pedaços ($4-6 \text{ mm}^2$) de meio contendo fungos crescidos e esporulados, adicionados a frascos tipo penicilina com 10 mL de água destilada estéril, fechados com rolhas de borracha, selados com tampa de alumínio e armazenados à temperatura ambiente; 2) método do glicerol a 20% para a conservação de esporos e armazenamento a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$; 3) preservação em óleo mineral: os fungos foram crescidos em tubos de ensaio contendo meio inclinado onde foi adicionado óleo mineral, o armazenamento foi feito à temperatura ambiente.

As conservações dos fungos *Mycelia sterilia* e Ascomycetos foram realizadas por meio de três métodos: 1) método do glicerol a 20% para a conservação de cinco fragmentos de ágar contendo hifas maduras e/ou ascos, com armazenamento a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2) preservação em óleo mineral, semelhante ao descrito no parágrafo anterior e 3) conservação em palitos onde o fungo foi submetido ao crescimento em placa de petri contendo 2 palitos estéreis dispostos paralelamente. Posteriormente ao crescimento fúngico, os palitos foram recortados com auxílio de um bisturi e transferidos para tubos de ensaio vedados com algodão que serão condicionados em tubos Falcon de 15mL. Acondicionou-se em geladeira a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

As bactérias isoladas foram purificadas através da metodologia de esgotamento com estrias cruzadas. Após seu crescimento, com auxílio de uma alça de inoculação, raspou-se a superfície do meio, para o recolhimento de massa bacteriana, que foi transferida para criotubos contendo o meio de cultura líquido utilizado no isolamento e acrescido de 20% de glicerol.

Foram identificados os fungos endofíticos pela análise das estruturas macroscópicas, observando-se a consistência, a coloração e a forma das colônias; pelo microcultivo para verificação das estruturas microscópicas como hifas, micélio e estruturas de reprodução (sexual e assexual) coradas com lactofenol e pela comparação com literatura específica à taxonomia de cada grupo.

4.3.3. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS

Os metabólitos das plantas hospedeiras e de seus fungos endofíticos foram extraídos por metodologias de fitoquímica clássica e avaliados contra micro-organismos de interesse médico para detecção de antibióticos – Kawamoto e Lorbeer (1976) e contra o microcrustáceo *Artemia salina* pela técnica de TAS descrita por Meyer e colaboradores (1982). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata para que os dados coletados fossem analisados por testes estatísticos apropriados para verificação da veracidade dos dados obtidos. Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório GEMMA - UFAM.

4.3.3.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

A partir das folhas, flagelo e galho de *D. flagellaris* secos a 40 °C por 1 semana obtiveram-se extratos a partir dos solventes: hexano, acetato e metanol. O material vegetal foi triturado em moinho de facas e macerado duas vezes, por dois dias, na presença dos solventes anteriormente citados, de forma subsequente, ao abrigo da luz. Os extratos foram filtrados em papel de filtro com auxílio da bomba de vácuo e evaporado através de um evaporador rotatório a 40 °C e o restante permaneceu em um dissecador até a evaporação do solvente restante (SANTOS et al., 2007).

4.3.3.2. PREPARAÇÃO DOS LÍQUIDOS METABÓLITOS E EXTRATOS FÚNGICOS

Os micro-organismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura apropriado durante 8 dias. Decorrido este tempo, fragmentos do meio com 6 x 6 mm ou uma suspensão de esporos (5 µL 4-5 Mac Farland - fungos mitospóricos) foram retirados para a realização da fermentação submersa utilizando-se 100 mL de BD (acrescido de 0,2% de extrato de levedura) a 26 – 30 °C, a 120 r.p.m., por 8 - 25 dias, em triplicata. Após o crescimento o meio metabólico foi separado do micélio por filtração em papel Whatmann nº 4 e esterilizado com membrana millipore (0,22 µm). Armazenou-se 15 mL do líquido metabólito a -20 °C para a realização dos bioensaios. Ao líquido restante

adicionou-se isopropanol na proporção de 1% (v/v) e submeteu-o a coluna SPE de acordo com as orientações do fabricante. O micélio fúngico obtido a partir da fermentação foi recolhido em um erlenmeyer onde sofreu maceração etanólica, primeiramente com etanol gelado onde permaneceu na geladeira durante toda a etapa, e posteriormente com etanol à temperatura ambiente. A maceração ocorreu em duas etapas de 24 horas para cada temperatura do solvente. Estes extratos também foram evaporados em evaporador rotatório a 40 °C e o restante permaneceu em um dissecador até a evaporação do solvente restante.

4.3.3.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a análise da atividade antimicrobiana dos extratos, foi aplicada a técnica do líquido metabólico, conhecida também como método do filtrado ou para detecção de antibióticos (KAWAMOTO e LOBEER, 1976). Foram realizados testes *in vitro*, semi-quantitativos, em triplicata, utilizando-se cepas padrão de *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, e *E. faecalis*.

Os micro-organismos foram cultivados em meios líquidos e após 24 horas, 100 µL da cultura padronizada na escala 0,5 de Mac Farland foram inoculados em placas de Petri, contendo meio específico para cada um (Agar BHI ou Agar Sabouraud), e com auxílio de uma alça de Drigalski espalhou-se o inóculo na superfície do meio (*spread plate*). Poços de 6 mm foram feitos e 100 µL do líquido metabólico foram inseridos em cada um. Após incubação pelo período de 24 horas, observou-se a formação ou não de halos de inibição, que foram anotados, considerando os valores médios das três repetições. Neste teste, foram utilizados como controle positivo os antibióticos (2mg/mL): tetraciclina para *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, ampicilina para *S. aureus*, e Fluconazol para *C. albicans*.

4.3.4.4 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL

Para a realização do teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach (TAS) utilizou-se a metodologia descrita por Meyer, onde os extratos considerados ativos são aqueles que apresentam $DL_{50} < 1000$ ppm, possuindo um bom potencial de atividade antitumoral.

Os ovos de *Artemia salina* Leach foram eclodidos (náuplios) em placa de Petri contendo água do mar sintética (37g/L) através da incubação por 48 horas sob iluminação artificial. As diluições dos extratos foram feitas utilizando-se água marinha sintética (37 g/L NaCl acrescido de 1 % de DMSO). Após a eclosão, os extratos diluídos nas concentrações 10, 100, 500, 1000 µg/mL foram transferidos para poços de uma placa com 24 poços, em triplicata. Adicionou-se em cada um, 10 espécimes do microcrustáceo e completou-se o volume para 2 mL com água do mar sintética. Após 24 horas sob iluminação artificial, foi realizada a contagem dos organismos mortos e através do software Probit GW-Basic foi feita a determinação do valor da DL₅₀ (concentração capaz de matar a metade dos organismos testes).

Os testes de atividade antitumoral foram realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas coordenado pelo prof Dr. Emerson Lima. Nesses testes empregou-se as células HCT116 e MCF-7, células de linhagem tumoral de cólon e mama, respectivamente. Avaliou-se a viabilidade celular na presença dos extratos vegetais de *D. flagellaris* na concentração de 50 µg/mL. Como controle negativo e positivo utilizou-se DMSO e Doxorubicina (Doxo - 5 µg/mL), respectivamente.

4.3.4. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ALCALÓIDES

4.3.4.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Com os extratos vegetais obtidos realizou-se uma cromatografia em camada delgada (CCD) com o objetivo de verificar a presença de alcalóides. Uma pequena alíquota de cada extrato foi ressuspensa em seu respectivo solvente utilizado na extração. Utilizou-se sílica-gel com espessura 0,20 mm como suporte e Hexano-Acetato de etila 6:4 (v/v) como fase móvel. Com auxílio de capilares aplicou-se as amostras na placa cromatográfica que após foi transferida para uma cuba contendo a fase móvel. Ao término da percolação dos solventes retirou-se a placa da cuba e com um algodão embebido com o reagente Dragendorff realizou-se a revelação.

4.3.4.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os extratos vegetais metanólicos foram submetidos à espectrometria de massas no Laboratório de Massas - UFAM. As análises foram realizadas em Espectrômetro de massa LQCfleet Ion trap Termo scientific fonte ESI sob os seguintes parâmetros: Sheath gas: 12% Auxiliar gas: 5% Sweep gas: 0, Spray current: 4.9, Temperatura capilar: 250 °C, Voltagem capilar: 26 V, Tube LENS: 100 V. Foram preparadas soluções de 5 ppm dos extratos metanólicos que foram posteriormente aplicados por inserção direta no equipamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO E TAXA DE COLONIZAÇÃO

Foram isolados 247 micro-organismos endofíticos de *D. flagellaris* (Figura 4). Desses micro-organismos, 13 foram bactérias e o restante, fungos filamentosos.



Figura 4: Aspectos macroscópicos de micro-organismos isolados de *D. flagellaris*.

O índice de colonização e as taxas de frequência foram calculados conforme Azevedo (1998):

Taxa de colonização:

$$Cr = \frac{\text{Número Total de Isolados} \geq 1}{\text{Número de Fragmentos da Amostragem}} \quad \text{Eq. 1}$$

Frequência Relativa:

$$Fr = \frac{\text{Número Total de Isolados de um grupo}}{\text{Número de Fragmentos da Amostragem}} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Neste trabalho obteve-se como resultado de taxa de colonização dos fungos endofíticos um índice de 108,3% (Tabela 1). De acordo os resultados de

frequência, os grupos mais frequentes isolados neste trabalho foram: *Phomopsis* (45,4%), *Fusarium* (14,8%) e *Colletotrichum* (25,5%) (Figura 5).

Tabela 1: Distribuição dos grupos morfológicos de fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris* segundo os tecidos vegetais. Dados expressos em unidades e frequência relativa (%).

Grupos Morfológicos (Gêneros)	Tecido Vegetal			TOTAL
	Galho	Folha	Flagelo	
DfFo111 BDA+AT	0	1 (0,5%)	0	1 (0,5%)
DfFo311 BDA+CT	0	1 (0,5%)	0	1 (0,5%)
DfGa122 BDA+AT	1 (0,5%)	0	0	1 (0,5%)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	2 (0,9%)
B	2 (0,9%)	0	0	2 (0,9%)
<i>Trichoderma</i>	2 (0,9%)	0	0	2 (0,9%)
1	2 (0,9%)	0	0	2 (0,9%)
J	4 (1,9%)	0	1 (0,5%)	5 (2,3%)
F 4	6 (2,8%)	0	0	6 (2,8%)
A	3 (1,4%)	3 (1,4%)	1 (0,5%)	7 (3,2%)
<i>Xylaria</i>	8 (3,7%)	0	0	8 (3,7%)
<i>Phyllosticta</i>	1 (0,5%)	11 (5,1%)	0	12 (5,6%)
<i>Fusarium</i>	1 (0,5%)	30 (13,9%)	1 (0,5%)	32 (14,8%)
<i>Colletotrichum</i>	10 (4,6%)	5 (2,3%)	40 (18,5%)	55 (25,5%)
<i>Phomopsis</i>	42 (19,4%)	1 (0,5%)	55 (25,5%)	98 (45,4%)
TOTAL	83 (38,4%)	53 (24,5%)	98 (45,4%)	234 (108,3%)

Tabela 2: Distribuição das bactérias endofíticas isoladas de *D. flagellaris* segundo os tecidos vegetais e dados expressos em unidades e frequência relativa (%).

ISOLADOS	Tecido Vegetal			TOTAL
	Galho	Folha	Flagelo	
Bactérias	2 (0,9%)	0	11 (5,1%)	13 (6,0%)

Tabela 3: Distribuição total dos micro-organismos endofíticos isolados de *D. flagellaris* segundo os tecidos vegetais e dados expressos em unidades e frequência relativa (%).

ISOLADOS	Tecido Vegetal		
	Galho	Folha	Flagelo
Total Geral dos micro-organismos isolados	85 (39,4%)	53 (24,5%)	109 (50,5%)

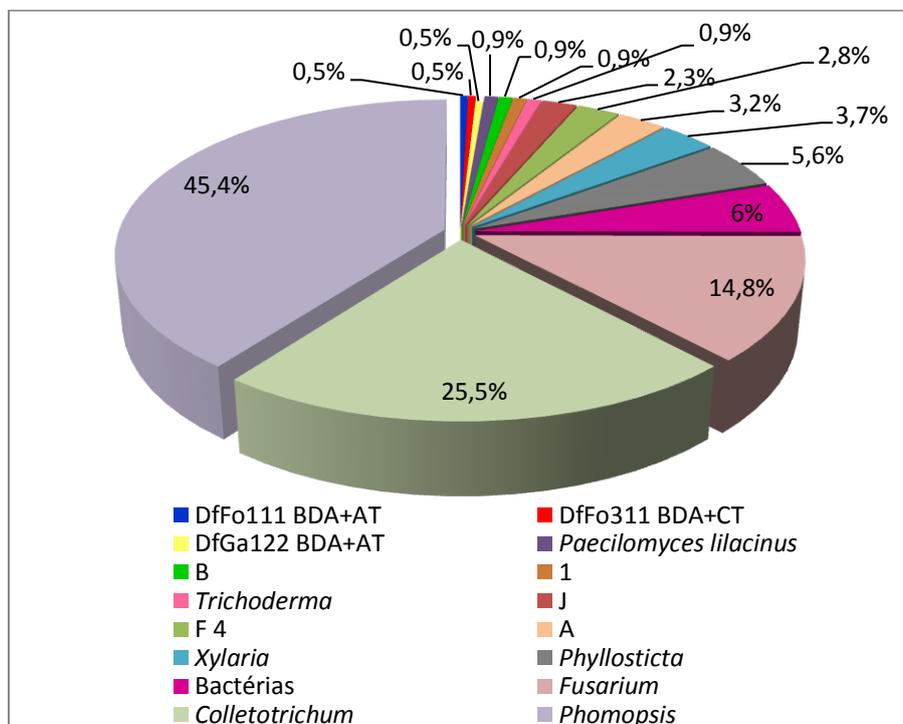


Figura 5: Distribuição dos micro-organismos endofíticos isolados de *D. flagellaris* segundo tecido vegetal e agrupamento macroscópico, dados expressos em frequência relativa (%).

A escassez de dados existentes na literatura referentes à diversidade de fungos endofíticos no gênero *Duguetia* e em Annonaceae dificultam a avaliação quanto à presença de grupos microbianos simbiotes ou facultativos nestes vegetais.

Costa e colaboradores (2008) isolaram de *D. stelechanta* 117 fungos filamentosos, 13 actinomicetos e 82 bactérias, no mesmo local de coleta deste trabalho. Contudo, esta planta é muito mais rara que a nossa e possui reprodução cruzada. Enquanto *D. flagellaris* apresenta flagelos de onde originam-se novos indivíduos (reprodução assexuada). Dos fungos filamentosos isolados encontraram-se grupos que no presente trabalho também foram relacionados com *D. flagellaris*, tratam-se de: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Phomopsis* e *Xylaria*. Contudo, existem 11 grupos não identificados que foram isolados de *D. stelechanta*, que podem ser em comum com alguns endófitos isolados em *D. flagellaris*. Destaca-se

também a presença de 13 actinomicetos em *D. stelechanta*, entretanto, nesta pesquisa não foi isolada nenhuma bactéria pertencente a esta classe, este fato pode ter sido ocasionado pela baixa frequência ou ausência em *D. flagellaris*, pela deficiência na identificação morfológica, que pode ser esclarecida através de futuros estudos de sequenciamento de DNA, ou pela utilização no isolamento de outro tecido vegetal (fruto) (COSTA et al, 2008) não empregados nesta pesquisa.

Em *Annona squamosa* Linnaeus e *A. muricata* (pinha e graviola) Silva e colaboradores (2006) isolaram 110 e 90 fungos endofíticos; dentre estes, encontram-se fungos não isolados neste trabalho como: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cylindrocladium*, *Nigrospora* e *Penicillium*. Além disso, existem gêneros comuns às três espécies: *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Phomopsis*, estes gêneros foram os que apresentaram as maiores taxas de colonização dados que corroboram com nosso estudo. Em *A. squamosa* e *A. muricata* o gênero *Fusarium* possuiu a maior frequência de colonização (31,03%), *Colletotrichum* e *Phomopsis* apresentaram as terceiras maiores frequências (10,34 %). Além de se tratar de espécies vegetais distintas, e serem provenientes de locais distintos, as diferenças nos grupos isolados também podem ter sido ocasionadas por variações observadas no protocolo utilizado por Silva e colaboradores como a temperatura (temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$), o meio de cultura (BDA), o tempo de isolamento (sete dias) e a concentração de hipoclorito de sódio (1,5%) usada para a desinfestação dos micro-organismos epifíticos.

Estudos que possuem como foco o isolamento de micro-organismos endofíticos vêm sendo realizados por todo o mundo, atualmente com maior destaque em florestas tropicais. As mais variadas plantas são utilizadas, provenientes de diversos ambientes, como florestas tropicais, mangues, solos marinhos, de gesso, dentre outros. Sabe-se que a diversidade e frequência dos endófitos pode variar de acordo com a planta, a parte do vegetal, a idade e diferentes épocas do ano, como por exemplo, períodos de chuva ou seca. Por isso é extremamente importante usar as mais variadas plantas em diferentes ambientes, pois podem resultar num conhecimento maior de micro-organismos, muitos deles ainda desconhecidos. Dentre os fungos mais frequentemente isolados estão: *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Phomopsis*, *Fusarium* e *Xylaria* (SILVA et al, 2006). É importante relatar que as pesquisas realizadas para conhecimento de fungos endofíticos de vegetais de clima temperado apresentam *Xylaria* e

Pestalotiopsis como frequentes endófitos isolados, o que tem sido uma surpresa encontrar *Xylaria* em plantas tropicais. Souza (2006) relata que em tecidos mais velhos e próximos ao solo a facilidade de encontrar este gênero é maior. Estudos recentes têm demonstrado a transição de populações microbianas de acordo com o estado fisiológico da hospedeira, e para *Xylaria* spp. foi relatado o importante papel na “reciclagem orgânica” da clorofila.

No Brasil, pesquisas relatam a presença de alguns grupos fúngicos endofíticos em determinadas plantas, como: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium* em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hill), no Paraná (PIMENTEL et al, 2006); *Phomopsis*, *Xylaria*, *Dothiorella*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Aspergillus* endofíticos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) do cerrado brasileiro (MAGALHÃES et al., 2008); *Penicillium*, *Scedosporium*, *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Acremonium* em mamona (*Ricinus communis* L.) proveniente de Curitiba (MOTA, LAGO & OLIVEIRA, 2010); *Nodulisporium*, *Xylaria*, *Glomerella cingulata*, *Guignardia mangiferae*, *Alternaria tenuissima*, *A. arborescens*, *Botryosphaeria parva* e *Hypoxyton stygium* em manga (*Mangifera indica*) (CARVALHO et al., 2005); *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* e *Xylaria* registrados em ixora (*Ixora coccínea*), no estado de Pernambuco (VIEIRA et al., 2012).

O tecido vegetal em que foi isolado o maior número de fungos endofíticos foi o flagelo (45,4%), seguido do galho (38,4%) e da folha (24,5%) (Figura 6). Entretanto, deve-se ressaltar que no galho isolou-se o maior número de grupos (14), e a folha e o flagelo, apresentaram menor diversidade: 8 e 6 grupos, respectivamente (Figura 7).

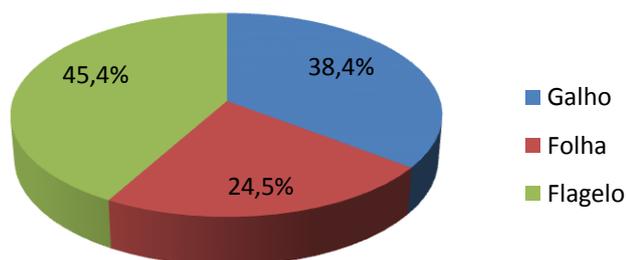


Figura 6: Frequência relativa de isolamento de fungos endófitos de *D. flagellaris* por tecidos vegetais.

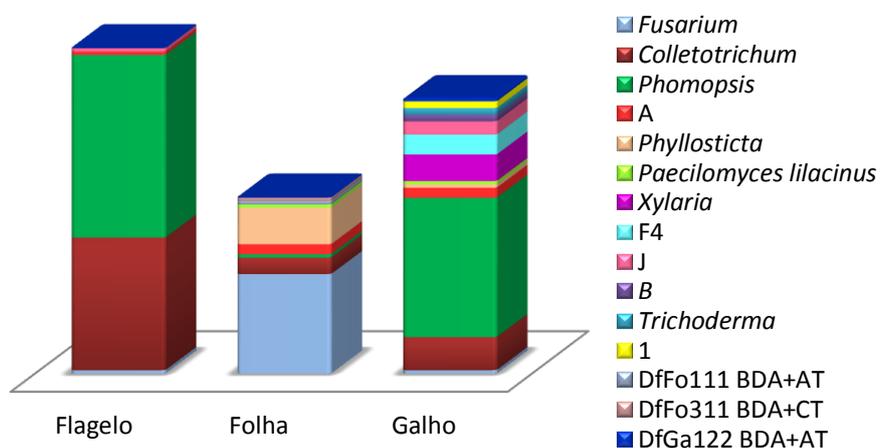


Figura 7: Diversidade fúngica endófitica isolada de *D. flagellaris* por tecido vegetal.

Com relação ao tecido vegetal utilizado, os dados de diferenças significativas em frequência de colonização corroboram com as observações de Silva e colaboradores (2006) em *A. squamosa*, embora em *A. muricata* o mesmo fato não ocorreu.

Nos estudos de Magalhães e colaboradores, houve diferenças significativas entre as taxas de colonização das partes vegetais estudadas de candeia. A taxa de colonização seguiu a seguinte relação: caule > folha > semente (MAGALHÃES et al., 2008). Rodrigues (2010) também observou um maior percentual de colonização em amostras de raízes do que em folhas. A maior colonização destes tecidos, assim como nós observamos para os flagelos, pode ser explicada pela

proximidade ao solo e pelo crescimento radicular no solo, que promove lesões nestes tecidos abrindo portas de entrada para uma colonização horizontal.

Alguns fatores podem ter influenciado nas diferenças de colonização microbiana por tecido, como por exemplo, a concentração de hipoclorito de sódio. O tempo de tratamento e a concentração de hipoclorito de sódio também podem interferir no crescimento microbiano (AZEVEDO, 1998). Neste trabalho, alguns fragmentos foliares após o tratamento com hipoclorito de sódio apresentaram aspecto mais escurecido, o que caracteriza uma oxidação e pode ter influenciado no crescimento de micro-organismos endofíticos presentes nesta parte do vegetal (SOUZA et al., 2004). Uma situação inversa pode ter ocorrido com os fragmentos do flagelo, mais grossos e resistentes, além de estarem presentes no solo.

Alguns grupos apresentaram especificidade por apenas um tecido vegetal, como DfFo111 BDA+AT e DfFo311 BDA+CT que foram isolados apenas em fragmentos foliares. O isolado DfGa122 BDA+AT e os grupos F4, B, *Trichoderma*, 1 e *Xylaria* foram específicos para o galho. Os grupos J, *Paecilomyces lilacinus* e *Phyllosticta* foram isolados em dois tecidos, os dois primeiros em galho e folha, e os últimos em galho e flagelo. Observou-se também a existência de grupos que não apresentaram especificidade, ou seja, são generalistas: Grupo A, *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Phomopsis* (Figura 8).

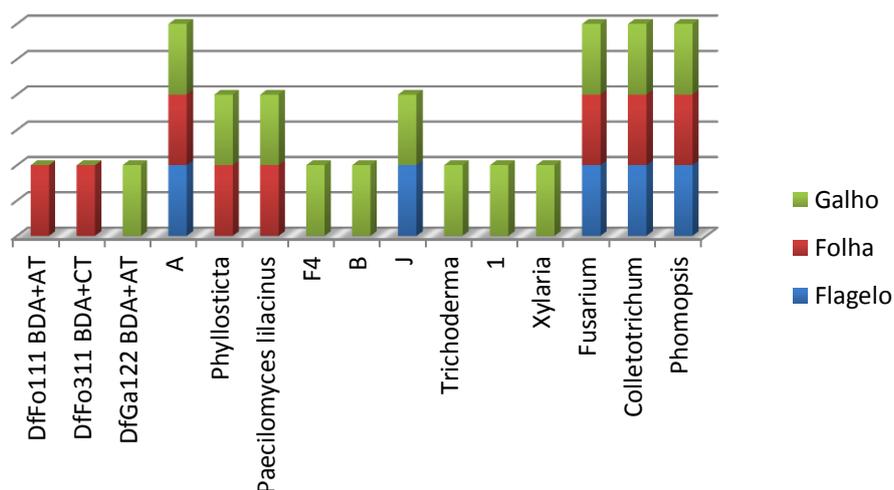


Figura 8: Distribuição dos fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris* segundo tecido vegetal empregado.

Magalhães e colaboradores (2008) observaram que os gêneros *Xylaria* e *Phomopsis* eram generalistas, *Alternaria* e *Fusarium* demonstraram uma especificidade para as sementes, *Nigrospora* e *Aspergillus* em folha e *Dothiorella* em caule decandeia. O que corrobora com a generalidade de *Phomopsis* e é oposto à generalidade de *Fusarium* e à especificidade de *Xylaria*, observados neste estudo. Taylor, Hype e Jones (1999) observaram uma especificidade de *Xylaria* para os tecidos foliares. Contudo não podemos esquecer que vários destes fungos são cosmopolitas e apresentam uma certa especificidade pela hospedeira ou por um tecido específico. Outros micro-organismos, a exemplo de *Fusarium* spp. são além de cosmopolitas, generalistas e sistêmicos, ou seja, são capazes de colonizar toda a planta hospedeira.

O gênero *Phomopsis* também foi encontrado com a maior taxa de colonização (38,9%) em candeia. Entretanto, *Fusarium* representa uma pequena taxa de colonização nesta planta (0,9%) e *Xylaria* uma participação significativa na colonização (37,1%) (MAGALHÃES et al., 2008). *Xylaria* foi o gênero mais frequente (80,7%) em pinheiros amarelos (*Pinus taeda*), seguido de *Colletotrichum*, *Pithomyces* e *Phialophora* (3,7%, 2,4% e 1,8%, respectivamente) (PIMENTEL, FIGURA & AUER, 2010). *Colletotrichum gloeosporioides* foi a espécie de maior predominância em *B. cylindrica* provenientes de uma região de mangue em Pernambuco.

Fusarium spp. são descritos na literatura como saprófitos e fitopatogênicos que podem permanecer por um longo período latente e situações de estresse podem manifestar doenças no hospedeiro. Os gêneros *Phomopsis* e *Colletotrichum* também são relatados como causadores de fitopatologias (MUSSIDIAS et al., 2012; VIEIRA et al., 2012). Como neste estudo isolou-se estes gêneros como endófitos, e com uma elevada taxa de colonização, acredita-se que estes encontram-se em um estado de equilíbrio com o hospedeiro, produzindo substâncias que beneficiam a planta. No item 5.5 algumas atividades biológicas corroboram com esta hipótese nesta pesquisa.

5.2. FATORES AVALIADOS NO ISOLAMENTO

5.2.1 TEMPERATURA DE CRESCIMENTO

Com relação à temperatura de crescimento microbiano, 188 micro-organismos apresentaram crescimento a 18°C, 55 a 26°C e 4 a 40°C, como pode ser verificado na Figura 9. Este fato pode ser explicado pelo isolamento realizado ter sido sequencial, ou seja, os tecidos foram primeiramente expostos a 18 °C e assim sucessivamente, o que aumenta as chances de se isolar mais micro-organismos na primeira temperatura empregada.

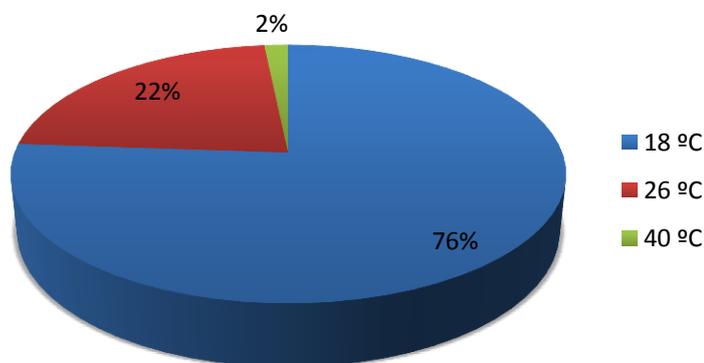


Figura 9: Distribuição dos micro-organismos isolados de *D. flagellaris* a partir da temperatura de crescimento.

5.2.2 MEIOS DE CULTURA

De acordo com os meios de cultura testados, observa-se que os meios de cultura BDA+AT, BDA+CT, Aveia+AT e ISP2+CT apresentaram taxas de frequência de colonização semelhantes (46, 44, 43 e 44), e que foram maiores que a dos meios Aveia+CT e ISP2+AT (30 e 27) que são próximas entre si (Tabela 4 e Figura 10). Entretanto, observa-se a especificidade de alguns grupos, como *Trichoderma* e B (Figura 11), por determinados meios, o que demonstra a necessidade da sua utilização caso seja desejado realizar um novo isolamento destes endófitos. Os meios ISP2+AT e Aveia +CT apresentaram uma diversidade menor, comparada às dos outros grupos (Figura 12).

Tabela 4: Distribuição dos fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris* de acordo com o Meio de cultura e agrupamento macroscópico, dados expressos em unidades e frequência relativa (%).

ISOLADOS	Meios de Cultura						TOTAL
	BDA		Aveia		ISP2		
	AT	CT	AT	CT	AT	CT	
DfFo111 BDA+AT	1 (0,5%)	0	0	0	0	0	1 (0,5%)
DfFo311 BDA+CT	0	1 (0,5%)	0	0	0	0	1 (0,5%)
DfGa122 BDA+AT	1 (0,5%)	0	0	0	0	0	1 (0,5%)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0	0	0	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	2 (0,9%)
B	0	0	0	0	0	2 (0,9%)	2 (0,9%)
<i>Trichoderma</i>	2 (0,9%)	0	0	0	0	0	2 (0,9%)
1	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	0	0	0	2 (0,9%)
J	1 (0,5%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	0	0	1 (0,5%)	5 (2,3%)
F 4	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	2 (0,9%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	6 (2,8%)
A	0	0	3 (1,4%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	7 (3,2%)
<i>Xylaria</i>	0	0	5 (2,3%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	8 (3,7%)
<i>Phyllosticta</i>	3 (1,4%)	5 (2,3%)	0	1 (0,5%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	12 (5,6%)
<i>Fusarium</i>	4 (1,9%)	4 (1,9%)	11 (5,1%)	4 (1,9%)	4 (1,9%)	5 (2,3%)	32 (14,8%)
<i>Colletotrichum</i>	13 (6,0%)	9 (4,2%)	7 (3,2%)	10 (4,6%)	11 (5,1%)	5 (2,3%)	55 (25,5%)
<i>Phomopsis</i>	19 (8,8%)	21 (9,7%)	16 (7,4%)	10 (4,6%)	7 (3,2%)	25 (11,6%)	98 (45,4%)
TOTAL	46 (21,3%)	44 (20,4%)	43 (19,9%)	30 (13,9%)	27 (12,5%)	44 (20,4%)	234 (108,3%)

*At=amoxicilina+tetraciclina (100µg/mL); CT=cetoconazol+tetraciclina (100µg/mL)

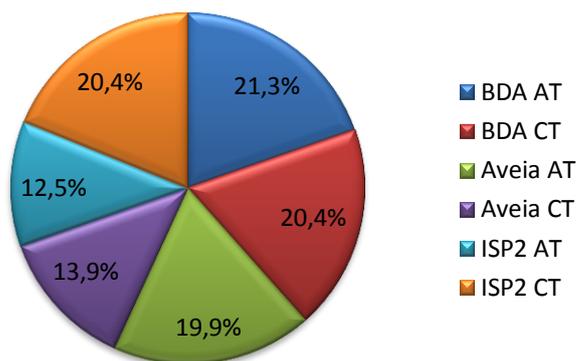


Figura 10: Frequência relativa de isolamento de endófitos de *D. flagellaris* por meios de cultura.

CT= Cetoconazol+Tetraciclina (100µg/mL); AT= Ampicilina+Tetraciclina (100µg/mL).

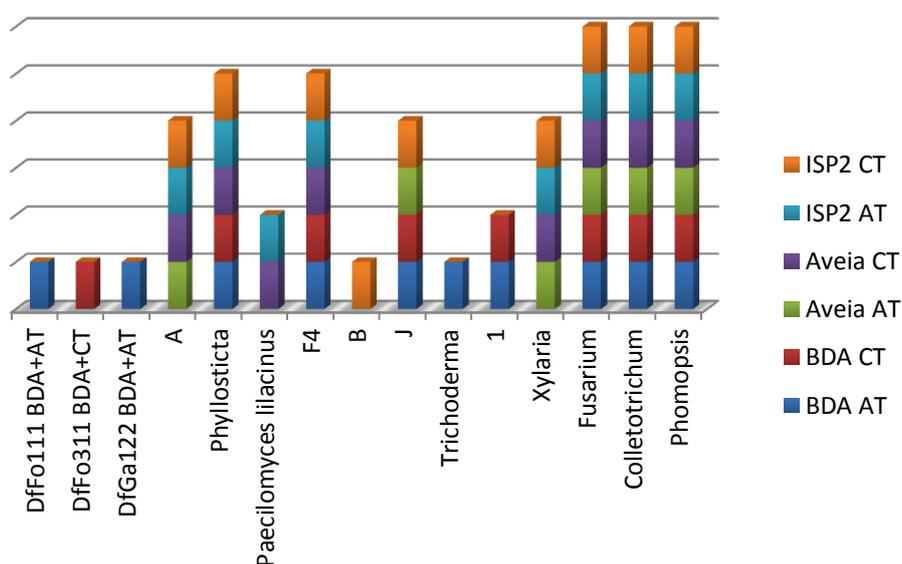


Figura 11: Distribuição dos grupos fúngicos isolados de *D. flagellaris* segundo meio de cultura empregado.

CT= Cetoconazol+Tetraciclina (100µg/mL); AT= Ampicilina+Tetraciclina (100µg/mL).

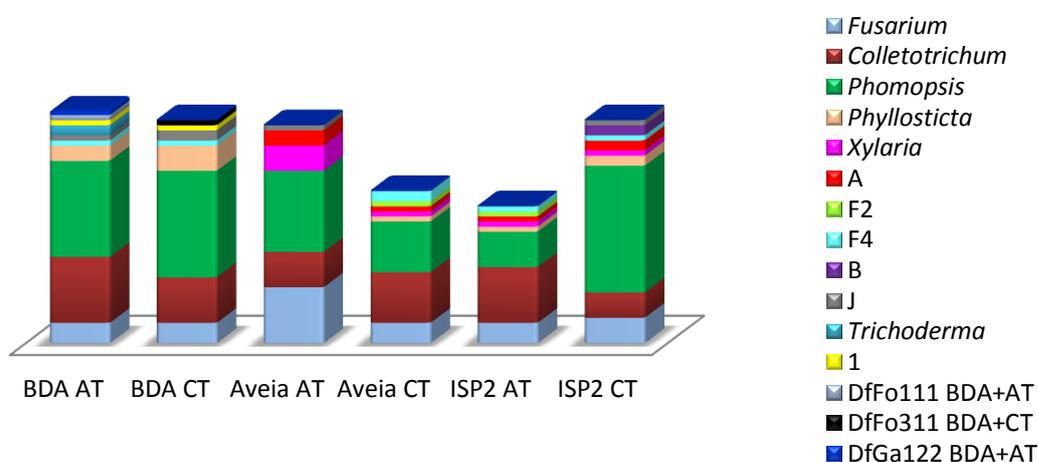


Figura 12: Diversidade fúngica isolada de *D. flagellaris* por meio de cultura empregado.

CT= Cetoconazol+Tetraciclina (100µg/mL); AT= Ampicilina+Tetraciclina (100µg/mL).

A temperatura, tempo de incubação e meio de cultura empregados no isolamento de micro-organismos endofíticos são fatores determinantes para o estudo. A utilização de meios de cultura não seletivos, emprego de um curto tempo de incubação podem ser decisivos para o isolamento dos micro-organismos que possuem um crescimento mais lento, ou que esse crescimento não é tão expressivo (AZEVEDO, 1998). Os autores podem utilizar diversos tipos de meios de cultura nos seus isolamentos de acordo com os seus objetivos, dentre eles encontram-se BDA (MUSSI-DIAS et al., 2012), Agar Sabouraud (COSTA, 2003), Ágar-água, ágar cenoura e meio YPD (MACHADO, 2009).

O emprego de apenas uma temperatura também pode interferir no isolamento de outros micro-organismos que não apresentam crescimento na faixa utilizada no estudo, ou outros micro-organismos coexistentes no hospedeiro podem possuir crescimento ótimo na temperatura utilizada e assim poderão mascarar o crescimento de outros.

5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS

A distribuição dos fungos endofíticos isolados segundo a observação das características macro e microscópicas está representada na figura 13.

Figura 13: Características macroscópicas e microscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris*.

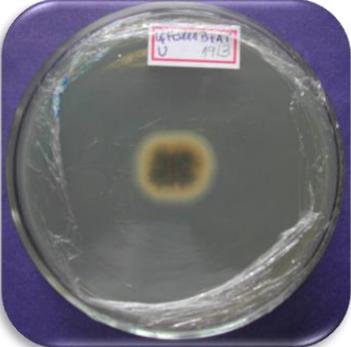
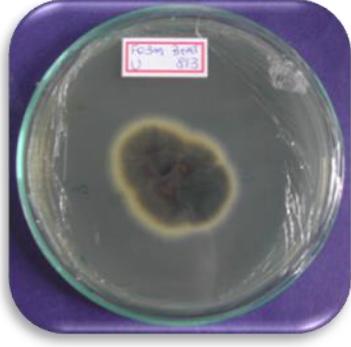
Grupos	Macroscopia – Frente	Macroscopia – Dorso	Microcultivo
DfFo111 B+AT			 Objetiva 20X
DfFo311 B+AT			 Objetiva 20X
DfGa122 B+AT			 Objetiva 20X
<i>Paecilomyces lilinaceus</i>			 Objetiva 20X

Figura 13: Características macroscópicas e microscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris*.

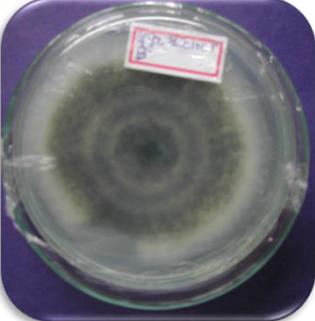
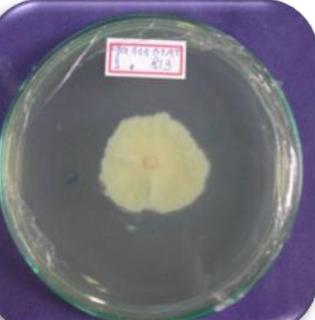
Grupos	Macroscopia – Frente	Macroscopia – Dorso	Microcultivo
B			 Objetiva 20X
<i>Trichoderma</i>			 Objetiva 20X
1			 Objetiva 20X
J			 Objetiva 20X

Figura 13: Características macroscópicas e microscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris*.

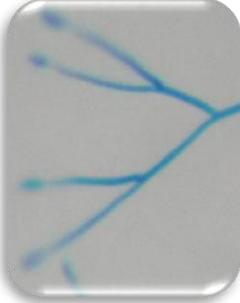
Grupos	Macroscopia – Frente	Macroscopia – Dorso	Microcultivo
F 4			 Objetiva 20X
A			 Objetiva 20X
Xylaria			 *www.ascofrance.com
Phyllosticta			 *SURYANARAYANAN, T. S.

Figura 13: Características macroscópicas e microscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *D. flagellaris*.

Grupos	Macroscopia – Frente	Macroscopia – Dorso	Microcultivo
<i>Fusarium</i>			 Objetiva 20X
<i>Colletotrichum</i>			 Objetiva 20X
<i>Phomopsis</i>			 Objetiva 20X

*fotos ilustrativas, identificação apenas macroscópica.

5.4. OBTENÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS VEGETAIS

As extrações que resultaram num maior rendimento foram as provenientes do solvente Metanol. Dentre estas, na extração das folhas obteve-se o maior rendimento (25,9%) (Tabela 5).

Os extratos em sua maioria demonstraram atividade pelo menos contra dois agentes patogênicos, exceto folha-hexano, onde não evidenciou-se nenhuma atividade antimicrobiana, e os extratos metanólicos onde a atividade foi observada apenas contra *E. faecalis*. Os extratos folha-acetato e galho-acetato tiveram

atividade contra três micro-organismos. Nenhum extrato foi eficiente contra todos os micro-organismos testados, entretanto, uma atividade antimicrobiana significativa foi apresentada pelo galho-hexano, onde observou-se um halo de 18 mm contra *E. faecalis* (Tabela 6).

Tabela 5: Peso e rendimento dos extratos de *D. flagellaris*.

Extrato		Peso (g)	Rendimento (%)
Folha	Hexano	3,93	7,9
	Acetato	4,69	9,4
	Metanol	12,95	25,9
Flagelo	Hexano	0,87	0,4
	Acetato	0,52	0,3
	Metanol	2,97	5,9
Galho	Hexano	1,85	3,7
	Acetato	2,62	5,2
	Metanol	5,63	11,3

Os extratos do flagelo e galho resultantes da extração com hexano e acetato de etila demonstraram atividade antifúngica contra *C. albicans*, o que não ocorreu nos extratos de folhas e na presença de metanol. Uma inibição do crescimento de *P. aeruginosa* ocorreu apenas no extrato folha acetato. Todas as partes vegetais apresentaram atividade contra *S. aureus*, entretanto, observou-se que os extratos metanólicos, folha-hexano e flagelo-acetato não promoveram essa ação. Apenas o extrato folha-hexano não apresentou atividade contra *E. faecalis* (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados dos testes de Difusão em Ágar dos extratos vegetais (2mg/mL) contra *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*.

Extrato		Halo frente aos micro-organismos (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Folha	Hexano	0	0	0	0
	Acetato	10	13	10	0
	Metanol	0	11	0	0
Flagelo	Hexano	11	11	0	9
	Acetato	0	12	0	10
	Metanol	0	12	0	0
Galho	Hexano	9	18	0	10
	Acetato	9	12	0	10
	Metanol	0	10	0	0

Como observado na planta empregada neste estudo, atividades antimicrobianas com extratos de plantas do mesmo gênero ou família de *D. flagellaris* são descritas por diversos grupos de pesquisa. Menezes e colaboradores (2012) observaram atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Xylopia laevigata* (Annonaceae) contra *C. albicans* e *C. labrata*.

Extratos de cascas do tronco de *Cleistopholis patens* (Annonaceae) utilizando diclorometano demonstraram atividade antimicrobiana contra espécies do gênero *Candida* inclusive *C. albicans* (AKENDENGUÉ et al., 2009).

De acordo com Au e colaboradores (2003), extratos etanólicos dos frutos de *A. squamosa* Linnaeus possuem atividade contra importantes patógenos, inclusive alguns empregados nessa pesquisa. A atividade foi observada contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e também em leveduras. Os patógenos que foram susceptíveis à ação antimicrobiana foram: *S. aureus*, *E. faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Candida albicans*.

Almeida e colaboradores (2010) ao realizarem testes antimicrobianos com óleos essenciais de folhas de *D. gardneriana* Mart. e *D. moricandiana* Mart. (Annonaceae) verificaram atividade contra *S. aureus* e *Candida guilliermondii*, e *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente.

Óleos essenciais de *D. lanceolata* St. Hil. barks apresentaram capacidade de inibição do crescimento de *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* e *C. albicans* (SOUSA et al., 2012).

Extratos etanólicos e aquosos de *Duguetia furfuraceae* apresentaram atividade contra *S. aureus* com halos de 13 e 12 mm (PASCOAL et al., 2003).

Extratos aquosos de *A. muricata* L. (graviola) demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Vibrio colerae*, enquanto com os extratos etanólicos não foi possível observar resultados positivos (VIEIRA et al., 2010). Todavia, Silva e colaboradores (2011) ao realizar testes de atividade antimicrobiana com extratos hidroalcoólicos e aquosos de cascas, folhas e frutos de graviola não observaram nenhuma atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, o que em parte, não corrobora com Vieira e colaboradores (2010).

Vieira e colaboradores (2010) ao realizarem testes antimicrobianos com óleos essenciais de *Xylopiá nitida* Dunal (Annonaceae), verificaram atividade contra *S. aureuse* resultado negativo para *P. aeruginosa*.

Apesar dos extratos metanólicos terem apresentado um maior rendimento, o que é desejável para a produção em larga escala, eles não demonstraram um amplo espectro de ação, sendo eficientes para apenas contra um ou dois micro-organismos testados.

5.5. OBTENÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS METABÓLITOS E EXTRATOS FÚNGICOS

De acordo com a metodologia aplicada, obteve-se o líquido metabólito dos grupos, cada um incubado por um determinado período de acordo com as observações morfofisiológicas no decorrer do experimento. Os líquidos metabólitos obtidos, em sua maioria, apresentaram um pH mais básico do que o inicial (5,5), exceto DfFo111 BDA + AT e F4 (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos grupos de acordo com o período de incubação e pH final do líquido metabólito.

Grupos	Número de Indivíduos Avaliados	Período de incubação (dias)	pH
DfFo111 BDA+AT	1	25	5,0
DfFo311 BDA+CT	1	25	6,0
DfGa122 BDA+AT	1	15	8,0
<i>P. lilacinus</i>	1	15	8,0
B	1	20	8,0
<i>Trichoderma sp.</i>	1	25	8,0
1	1	25	8,0
J	1	15	8,0
F 4	2	8	5,0; 7,0
A	1	25	7,0
<i>Fusarium spp.</i>	1	10	7,0
<i>Colletotrichum spp.</i>	3	15	7,0; 8,0
<i>Phomopsis spp.</i>	2	15	8,0

Os grupos fúngicos em sua maioria apresentaram atividade contra pelo menos dois micro-organismos testados, exceto o grupo B que não demonstrou nenhuma atividade antimicrobiana.

O uso da extração em fase sólida (coluna SPE C18) foi fundamental para a obtenção de resultados, visto que nenhum líquido metabólito antes de ser submetido à coluna apresentou atividade frente aos micro-organismos testes. Portanto, a coluna empregada foi eficiente na extração, concentração e pré-purificação das substâncias, que anteriormente poderiam estar em menores quantidades e na presença de impurezas (CAVALCANTE et al., 2007) (Tabela 8).

Atividades antimicrobianas contra *P. aeruginosa* foram menos frequentes sendo observadas apenas nos grupos 1, F4 (amostra Ga211 I+AT), *Fusarium* sp., *Colletotrichum* spp. (amostras Ga222 B+CT e Fo221 B+CT) (Tabela 8 e Figura 14).

Dez amostras apresentaram atividade contra *C. albicans*: Fo111 B+AT, Fo311 BDA+CT, Ga122 BDA+AT, *P. lilacenus*, grupo F4 (duas amostras), *Colletotrichum* sp. (amostra Ga222 B+CT) e *Phomopsis* spp. (duas amostras) (Tabela 9 e Figura 14).

Observou-se que nove amostras possuem ação contra *S. aureus*: Fo111 B+AT, Fo311 BDA+CT, Ga122 BDA+AT, *P. lilacenus*, grupo J, grupo F4 (duas amostras), *Colletotrichum* sp. (amostra Ga222 B+CT) e *Phomopsis* sp. (amostra Ga321c B+CT) (Tabela 8 e Figura 14).

Todas as amostras apresentaram alguma atividade contra *E. faecalis* (Tabela e Gráfico 9).

Ressalta-se que mesmo amostras semelhantes e pertencentes ao mesmo grupo, em alguns casos houve atividade contra um determinado patógeno que não foi inibido pela outra amostra e vice-versa (Tabela 8 e Figura 14).

Tabela 8: Resultados dos testes de Difusão em Ágar dos líquidos metabólitos fúngicos contra *C.albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Diâmetro dos halos em mmm

Grupos	Amostra	Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Únicos	Ga122 B+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	14	10	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	14	0	10
		Mac Etanol TA	13	16	0	10
	Fo111 B+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	15	15	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	14	0	12
	Fo311 B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	10	14	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	12	0	11
		Mac Etanol TA	0	10	0	0
	Fo221 B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	0	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	14	11	0
Mac Etanol TA		-	-	-	-	
<i>P. lilacinus</i>	Ga212 I+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	17	18	0	18
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	15	0	15
B	Ga312c I+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	0	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	0	0	0
Trichoderma	Ga322 B+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	12	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	13	0	0
1	Ga211 B+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	14	11	0
		Mac. Etanol Gel	0	15	0	0
		Mac Etanol TA	0	12	0	0

Tabela 8: Resultados dos testes de Difusão em Ágar dos líquidos metabólitos fúngicos contra *C.albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Diâmetro dos halos em mmm

Grupos	Amostra	Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
J	Ga321b B+AT	LM*	0	0	0	0
		SPE*	14	14	0	0
		Mac. Etanol Gel [#]	9	19	0	0
		Mac Etanol TA [#]	0	16	0	14
F4	Ga211 I+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	12	12	12	9
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	13	0	13
	Ga322A+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	12	11	0	13
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	0	0	0
A	Fg312 A+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	11	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	15	0	0
		Mac Etanol TA	0	14	0	0
<i>Fusarium</i>	Fo322 B+AT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	0	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac. Etanol TA	0	11	9	0
<i>Colletotrichum</i>	Ga222 B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	10	10	14	10
		Mac. Etanol Gel	10	17	0	10
		Mac Etanol TA	0	15	0	0
	Fg312B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	0	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	14	0	0
		Mac Etanol TA	0	10	0	0
	Fo221 B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	0	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	14	11	0
		Mac Etanol TA	-	-	-	-

Tabela 8: Resultados dos testes de Difusão em Ágar dos líquidos metabólitos fúngicos contra *C.albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Diâmetro dos halos em mmm

Grupos	Amostra	Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Phomopsis	Ga321c B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	15	16	0	9
		Mac. Etanol Gel	9	16	0	9
		Mac Etanol TA	0	12	0	0
	Fg322b B+CT	LM	0	0	0	0
		SPE	0	0	0	0
		Mac. Etanol Gel	0	0	0	0
		Mac Etanol TA	0	13	0	11

Controles	<i>S.aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Positivo	36	20	37	20
Negativo	0	0	0	0

*=intracelular, #= extracelular, LM= Líquido metabólito, Mac. Etanol Gel= Maceração Etanol Gelado, Mac Etanol TA= Maceração Etanol Temperatura ambiente.

Controles positivos (2mg/mL): Amoxicilina (*S. aureus*), Tetraciclina (*E. faecalis* e *P. aeruginosa*), Cetoconazol (*C. albicans*), Controle Negativo= Dimetilsulfóxido (DMSO).

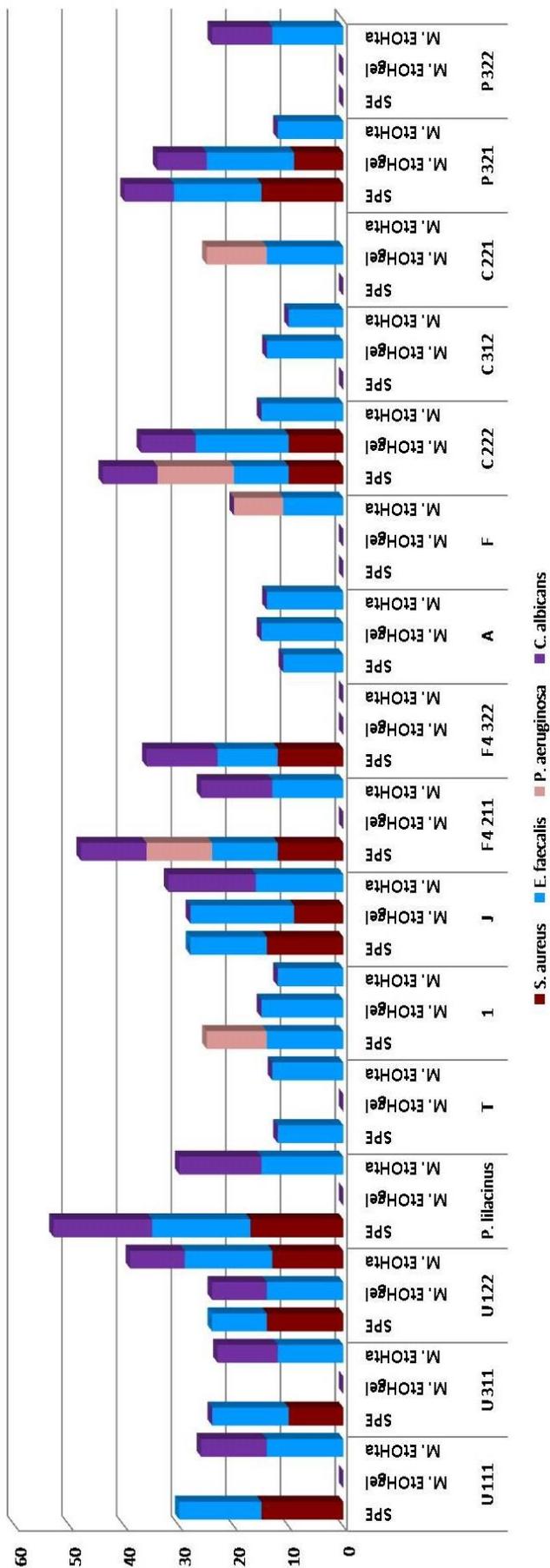


Figura 14 : Atividade antimicrobiana dos líquidos metabólitos e extratos fúngicos. U – único; T – *Trichoderma*, F – *Fusarium*, C – *Colletotrichum*, P – *Phomopsis*, M.EtOHgel- Maceração etanol gelado, M.EtOHta- Maceração etanol temperatura ambiente.

A produção de compostos bioativos por fungos endofíticos como ocorreu neste estudo também é relatada em diversas pesquisas envolvendo diferentes patógenos de importância médica.

Souza e colaboradores (2004) realizaram testes antimicrobianos com metabólitos extracelulares de endófitos de *Paulicourea longiflora* (aubl.) e *Strychnos cogens* bentham. Da primeira planta o endofítico *Colletotrichum* sp. apresentou atividade contra *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (halos de 24, 36 e 21 mm, respectivamente) e o endofítico *Xylaria* sp. demonstrou atividade contra *Bacillus* sp. (halo de 15 mm). Da segunda planta resultados positivos foram observados com os metabólitos provenientes de duas linhagens de *Trichoderma* sp. testados contra *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e ainda contra *Aspergillus flavus* apenas de uma linhagem (halos de 24/21, 26/27, 23/22 e 22 mm, respectivamente).

Chapla (2012) ao cultivar *Phomopsis* sp. isolado de *Senna spectabilis* e posteriormente fracionar os extratos brutos, obteve dicetopiperazinas, uma classe de substâncias com diversas atividades, inclusive antimicrobiana.

Ferreira e colaboradores (2012) observaram atividade antimicrobiana de *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp. isolados de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) (andiroba) contra *E. coli* e atividade tripanossomicida, respectivamente.

O endófito *Colletotrichum crassipes* associado à *Casearia sylvestris*, demonstrou atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, principal agente da tuberculose (CAFÊU et al., 2006). A partir de extratos deste fungo também foram isoladas dicetopiperazinas (CAFÊU et al., 2006).

Pileggi (2006) ao avaliar atividade antimicrobiana de treze linhagens de *Phomopsis* spp. endofíticos de folhas de *Aspidosperma tomentosum*, observou atividade contra bactérias, fungos filamentosos e leveduras de três linhagens.

Fusarium sp. isolado de *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) apresentou atividade contra amostras clínicas de *Paracoccidioides brasiliensis*, causador de micoses endêmicas em países da América Latina (CAMPOS, 2009).

Santos e colaboradores (2010) ao estudarem fungos endofíticos de *Indigofera suffruticosa* Mill. destacam a capacidade de *Colletotrichum gloeosporioides* atuar contra bactérias inclusive *P. aeruginosa* (halos de 11 e 12 mm).

Zou e colaboradores (2000) descreveram um novo metabólito antimicrobiano denominado ácido coletótrico. Ele foi isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico de *Artemisia mongolica* e apresentou atividade contra *B. subtilis*, *S. aureus* e contra o fungo *Helminthosporium sativum*.

Bonants e colaboradores (1995) observaram que uma serina-protease produzida por *Paecilomyces lilacenus* possui atividade contra ovos de *Meloidogyne hapla*, um importante fitopatógeno.

Observou-se uma diferença entre a quantidade de metabólitos extracelulares e intracelulares que possuem atividade contra os patógenos. Para *E. faecalis* e *C. albicans* os metabólitos extracelulares foram os que em maior quantidade inibiram o crescimento destes micro-organismos, diferente de *S. aureus*, onde isso ocorreu com os metabólitos extracelulares e de *P. aeruginosa*, onde não houve diferença entre eles (Figura 15). Esses dados são muito relevantes para situações nas quais forem repetidas as obtenções dos metabólitos.

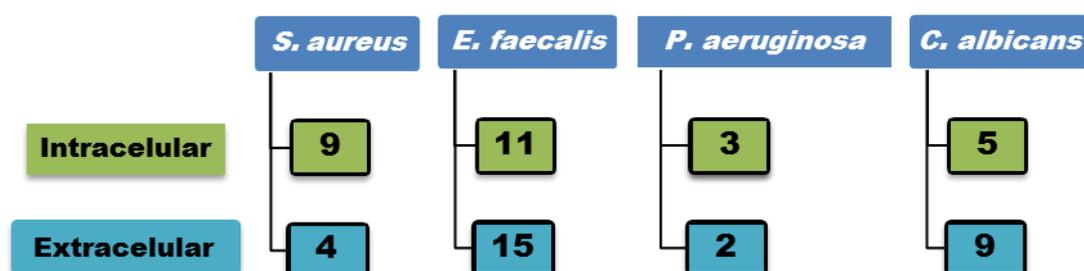


Figura 15: Total de metabólitos intra e extracelulares para 17 isolados de *D. flagellaris* fermentados em escala analítica com atividade antimicrobiana.

5.6. ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os resultados de atividade citotóxica dos extratos de *D. flagellaris* frente à *Artemia salina* estão descritos na Tabela 9. Os extratos Galho-Metanol, Folha-Metanol, Folha-Acetato, Flagelo-Metanol e Flagelo-Acetato por apresentarem DL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e por isso, segundo Meyer e colaboradores (1982) não possuem indicativos de atividade antitumoral.

Todos os extratos hexânicos provenientes das três partes vegetais (galho, folha e flagelo) apresentaram citotoxicidade à *A. salina* abaixo de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Além desses extratos, o Galho-Acetato também apresentou atividade (869,3 $\mu\text{g/mL}$) com possível relação com atividade tumoral. O extrato que possui a menor DL_{50} é o Galho-Hexano (146,0 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 9: Resultado da DL₅₀ de extratos de *D. flagellaris* no teste de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach – TAS .

Extratos Vegetais		DL₅₀ (µg/mL)
Galho	Metanol	>1000
	Acetato	869,3
	Hexano	146,0
Folha	Metanol	>1000
	Acetato	>1000
	Hexano	381,1
Flagelo	Metanol	>1000
	Acetato	>1000
	Hexano	311,6

Os resultados de atividade antitumoral dos extratos de *D. flagellaris* contra as células HTC 116 e MCF-7 encontram-se na Figura 16. O extrato Folha-Acetato apresentou resultado menor (21,4%) que o do controle (23,6%) contra as células HTC 116, enquanto os menores resultados contra as células MCF-7 foram respectivamente: Galho-Hexano (42%), Folha-Metanol (46%) e Folha-Acetato (50,3%) que apresentaram resultados maiores que o controle (33,4%). Acredita-se que esses extratos são promissores na pesquisa de substâncias antitumorais porque mesmo tratando-se de extratos vegetais brutos os resultados são relevantes.

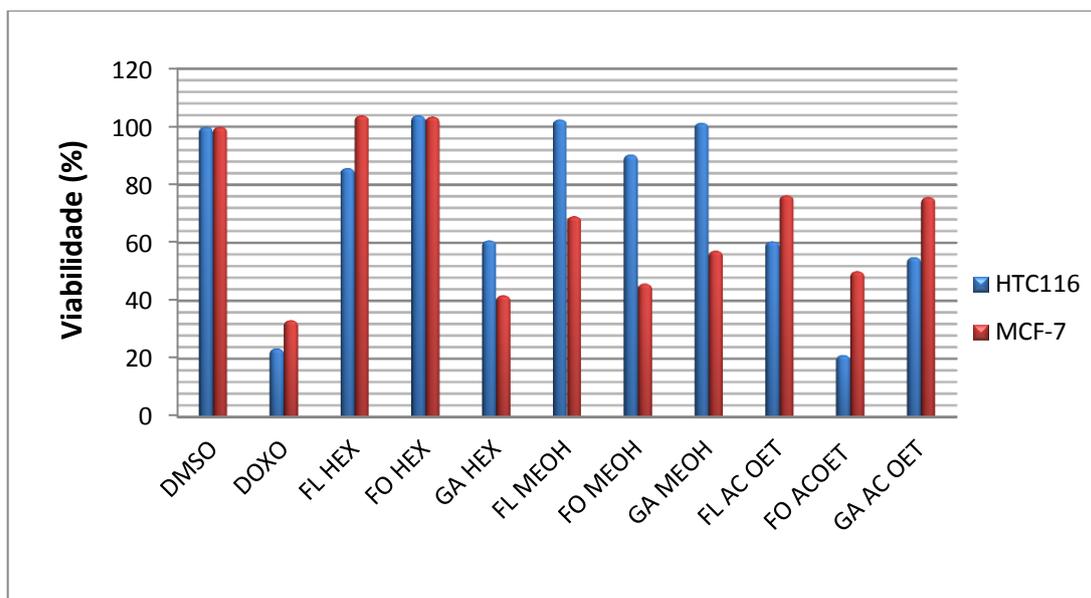


Figura 16: Ensaios de atividade antitumoral dos extratos vegetais de *D. flagellaris*. HTC116 e MCF-7: células teste, Controle negativo (DMSO), Controle Positivo: Doxorubicina (Doxo) 5 µg/mL, Extratos vegetais (50 µg/mL): FIHex: Flagelo-Hexano, FoHex: Folha-Hexano, GaHex: Galho-Hexano, FIMeOH: Flagelo-Metanol, FoMeOH: Golha-Metanol, GaMeOH: Galho-Metanol, FIAcoEt: Flagelo-Acetato, FoAcoEt: Folha-Acetato e GaAcoEt: Galho-Acetato.

Atividades citotóxicas e antitumorais de extratos de *D. flagellaris* e plantas do gênero e família encontram-se descritas na literatura.

Citotoxicidade de extratos de *D. flagellaris* estão citadas no banco de dados PubChemBioAssay (NCBI) onde pode-se observar atividade contra cultura de células humanas como SKOV3, BT549, KB, SK-MEL, o que corrobora com os nossos resultados.

Sousa e colaboradores (2012) ao realizarem testes contra *A. salina* observaram a atividade citotóxica de dois extratos de óleos essenciais de *D. lanceolata* St. Hil. barks, e obtiveram como resultados LC_{50} 49 e 60,7 µg/mL.

Arruda (2009) evidenciou uma atividade citotóxica no teste TAS de DL_{50} 4,9 µg/mL do extrato hexânico de *D. riparia*.

Extratos alcaloídicos e etanólicos de cascas de *D. furfuraceae* apresentaram-se tóxicos no teste com *A. salina* (SILVA et al., 2007).

Siqueira e colaboradores (2001) a partir do extrato etanólico de *D. glabriuscula* observaram que a DL_{50} nos ensaios TSA foi de 131,7 µg/mL, e após realizarem uma partição deste extrato, a fração clorofórmica apresentou DL_{50} de 56,6 µg/mL.

Siqueira e colaboradores (1998) observaram resultados ativos (TAS < 1000 µg/mL) de extratos de cascas de *Unnonopsis lindmanii* (Annonaceae), posteriormente, ao realizarem um fracionamento, a fração clorofórmica demonstrou um resultado de TAS = 19,4 ppm, nesta fração também foi verificado a presença de alcalóides.

Lúcio e colaboradores (2011) em um estudo com cultura de células leucêmicas observaram uma atividade antitumoral K562 (IC₅₀ de 18,97 e 10,95 µg/mL) de alcalóides isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, pertencente à mesma família de *D. flagellaris*.

Muhammad e colaboradores (2001) observaram um efeito citotóxico de alcalóides isolados de *D. hadrantha* contra células de melanoma humano (IC₅₀ = 0,37 µg/mL) e linhagens celulares de câncer humano (IC₅₀ = 3-6 µg/mL).

5.7. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A partir da cromatografia em camada delgada observou-se que *D. flagellaris* possui alcalóides em sua composição. Os extratos que apresentaram presença de alcalóides foram todos os provenientes de metanol (Figura 17).

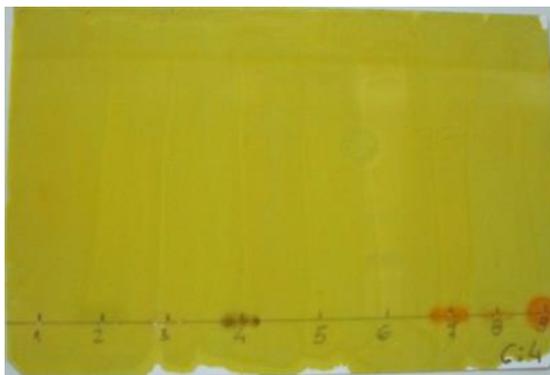


Figura 17: Placa cromatográfica dos extratos vegetais revelada com Dragendorff. 1:Flagelo-Acetato, 2: Flagelo-Hexano, 3: Flagelo-Metanol, 4:Folha-Acetato, 5: Folha-Hexano, 6: Folha-Metanol, 7:Galho-Acetato, 8: Galho-Hexano, 9: Galho-Metanol.

A presença de alcalóides verificada nessa pesquisa corrobora com os dados existentes na literatura, a qual indica que a família Annonaceae, inclusive *D. flagellaris*, é rica desses compostos (FAGUNDES et al., 2005; NAVARRO et al., 2001).

Na extração empregada neste trabalho realizaram-se sucessivas extrações com solventes que apresentam grau de polaridade crescente, resultando na presença de alcalóides em metanol, solvente de maior polaridade, pois os alcalóides são mais solúveis em substâncias de maior polaridade (FONSECA, 2005).

5.8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após as análises dos extratos metanólicos no espectrômetro de massas foram obtidos os espectros e os fragmentos dos íons mais abundantes (Figuras 18, 19 e 20). A análise preliminar dos extratos resultou na detecção de 5 alcalóides benzilisoquinolínicos predominantes. Os extratos galho-metanol e flagelo-metanol apresentaram picos semelhantes entre si, entretanto o primeiro extrato possui um pico a mais que está localizado em m/z 257, porém não identificado através da literatura utilizada. O extrato folha-metanol possui um pico m/z 342 em comum com os outros extratos e outro pico (m/z 328) foi observado neste extrato e em menor intensidade relativa em galho-metanol (Tabela 10).

De acordo com a literatura foram obtidas possíveis identificações dos alcalóides: m/z 328 esculerina ou corituberina, m/z 342 magnoflorina, N-metilesculerina ou romneina, m/z 344 laudamidina e m/z 358 laudanosina (LISCOMBE et al, 2009; ZIEGLER et al., 2009).

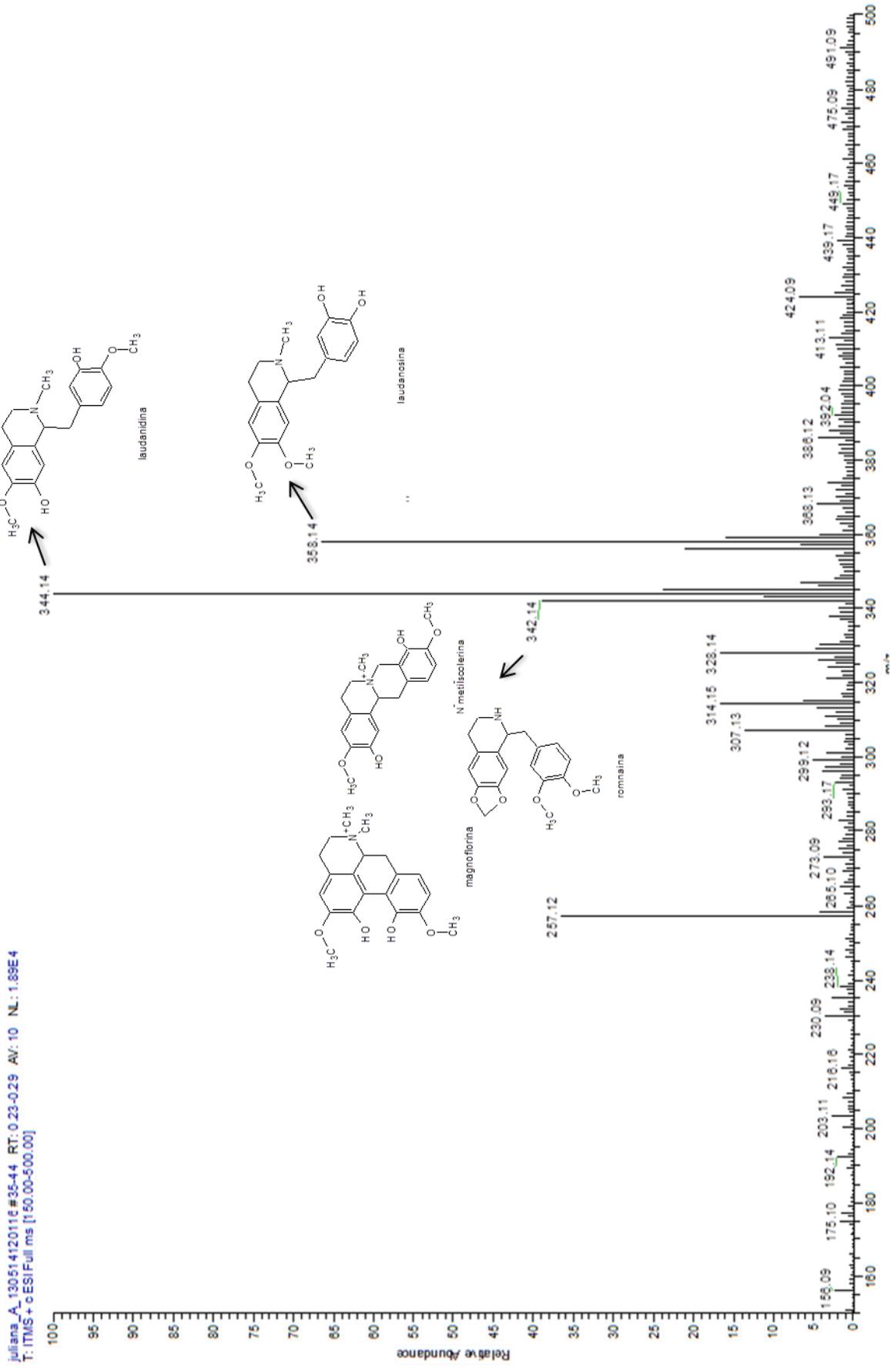


Figura 18: Espectro de massa (ESI-IT-MS) do extrato Galho-metanol. Possíveis estruturas dos alcalóides benzoquinólicos.

juliana_d_130514120116#10-26 RT: 0.05-0.15 AV: 17 NL: 6.12E4
T: ITMS+ c ESIFull ms [9000-500.00]

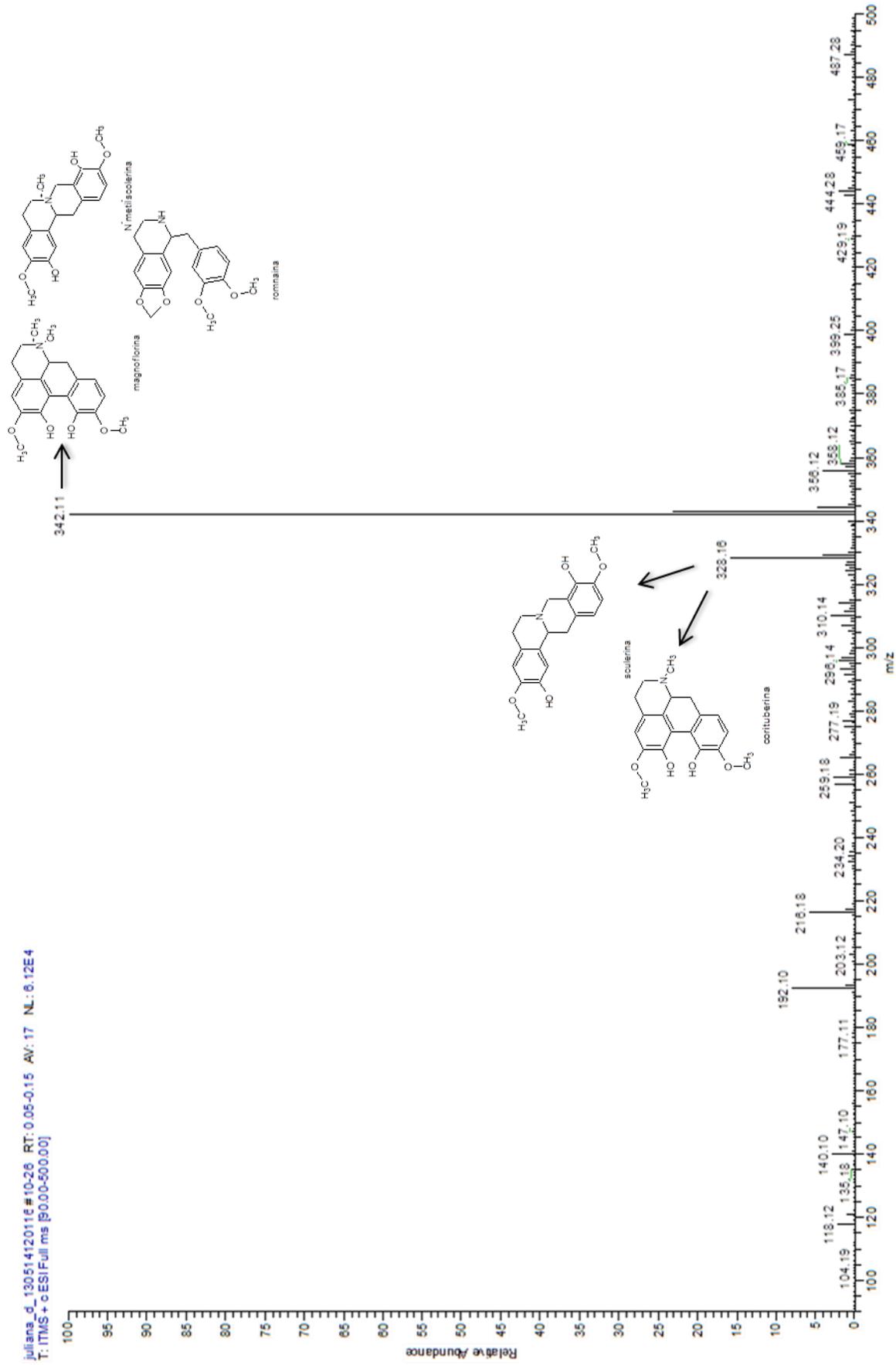


Figura 19: Espectro de massa (ESI-IT-MS) do extrato Folha-metanol. Possíveis estruturas dos alcalóides benzoquinólicos.

juliana_g_130514120116 #33-44 RT: 0.22-0.29 AV: 12 NL: 6.61E4
T: ITMS + c.ESI/Full ms [50.00-500.00]

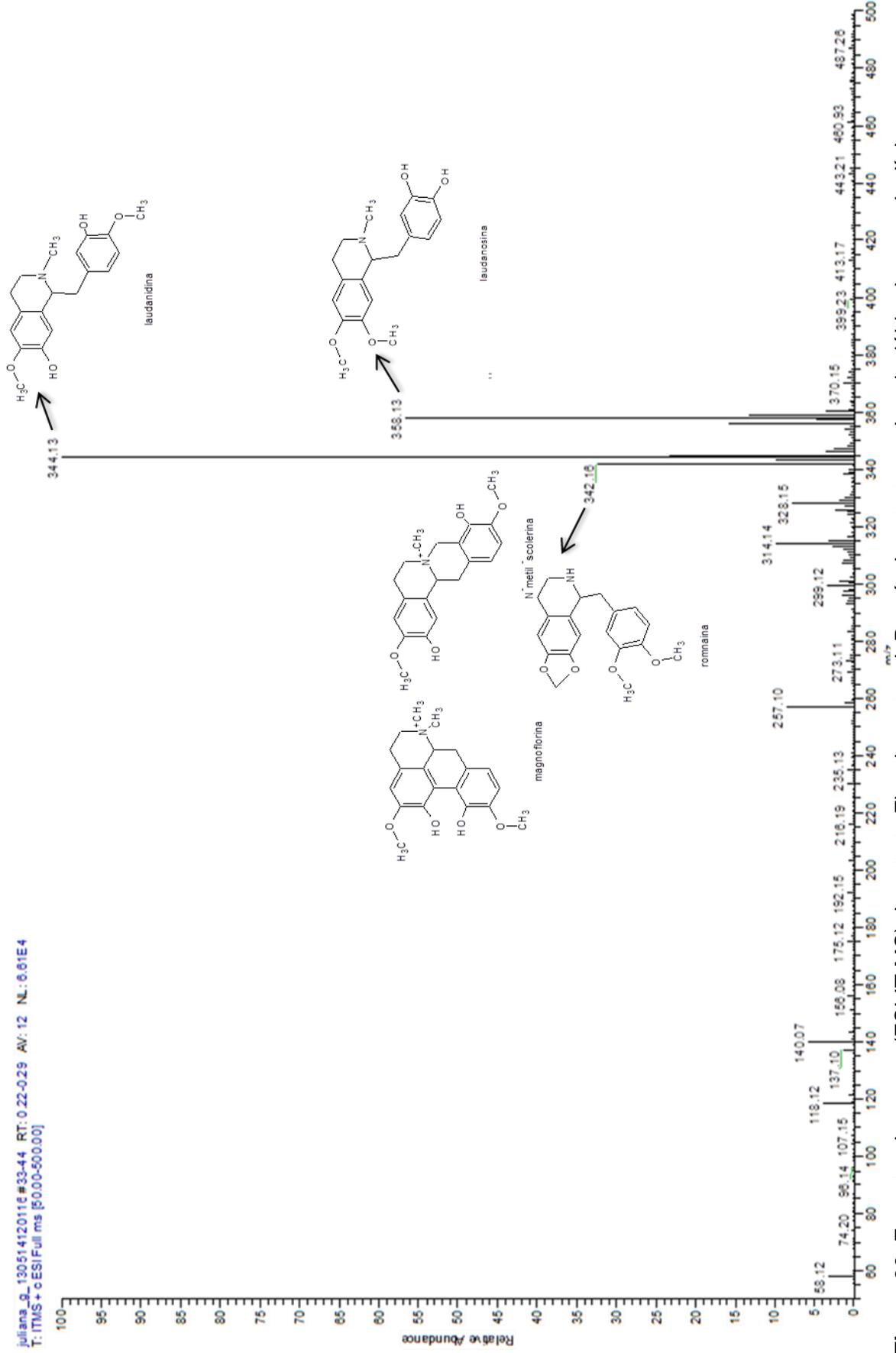


Figura 20: Espectro de massa (ESI-IT-MS) do extrato Flagelo-metanol. Possíveis estruturas dos alcalóides benzoquinolínicos.

Tabela 10: Principais íons detectados no espectro de massas (ESI-IT-MS) dos extratos vegetais metanólicos de *D. flagellaris*.

Amostras	Principais íons [M+H] ⁺ m/z
Galho-Metanol	257, 342, 344, 358
Folha-Metanol	328, 342
Flagelo-Metanol	342, 344, 358

Os alcalóides benzilisoquinolínicos são frequentemente isolados em espécies de Annonaceae (RINALDI, 2008). Neste estudo, através de uma análise preliminar de extratos metanólicos, detectou-se 5 alcalóides benzoquinolínicos, diferentes dos detectados por Navarro e colaboradores (2001) que a partir de extratos etanólicos das folhas, galhos e casca de *D. flagellaris* encontraram 10 alcalóides aporfínicos.

Os alcalóides encontrados nestes estudos já foram relatados em outras pesquisas com espécies da mesma família ou não. O alcalóide esculerina já foi isolado de *Annona hypoglauca* Mart (RINALDI, 2008) e apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*). A corituberina já foi detectada em folhas de *A. cherimolia* (VILLAR et al., 1985). O alcalóide laudanosisa também já foi encontrado em anonáceas como *Guatteria amplifolia*, e existe citação de atividade *L. mexicana* e *L. panamensis* (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001). Laudanidina encontra-se presente no gênero *Xylophia*, magnoflorina em *Enantia* spp (ROCHA, LUZ E ROGRIGUES, 1981). Romáina foi encontrada em *Romneya coulteri* var. *trichocalyx* (Papaveraceae) (MANSKE, 1970).

6. CONCLUSÕES

A partir desta pesquisa conclui-se que:

Duguetia flagellaris possui um alto índice de colonização fúngica (108,3%), sendo *Phomopsis* (45,4%), *Fusarium* (14,8%) e *Colletotrichum* (25,5%) os gêneros mais frequentes.

A maior taxa de frequência de colonização fúngica foi observada no flagelo (45,4%), seguido do galho (38,4%) e da folha (24,5%), contudo a maior diversidade encontrou-se no galho que resultou no isolamento de 14 grupos fúngicos.

Os extratos vegetais e fúngicos apresentaram atividade contra pelo menos dois agentes patogênicos, cada um. Dentre esses os extratos vegetais, o extrato galho-hexano destacou-se com uma atividade significativa contra *E. faecalis* e o extrato-SPE de *Paecilomyces lilinaceus* apresentou a melhor atividade contra bactérias Gram-positivas e para a levedura *Candida albicans*.

Os extratos metanólicos apresentaram indicação de alcalóides nas análises de cromatografia em camada delgada. Através de uma análise preliminar desses extratos detectou-se a presença de 5 alcalóides nesses extratos.

De acordo com o teste de citotoxicidade à *Artemia salina* observou-se DL₅₀ abaixo de 1000 µg/mL em todos os extratos hexânicos e no extrato galho-acetato. Dentre esses, a melhor atividade foi detectada no extrato Galho-Hexano (146,0 µg/mL).

A presente pesquisa demonstrou a biodiversidade de fungos endofíticos de *Duguetia flagellaris*, seu potencial antimicrobiano e citotóxico, e ação antimicrobiana de seus fungos endofíticos contra importantes patógenos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**, Salvador, BA, 2004, 381p.

AHUMADA, D. P. R. **Distribuição e abundância de anuros de floresta de terra firme na Fazenda Experimental Da Universidade Federal do Amazonas – Amazônia Central**. 72 p. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 2003.

AKENDENGUÉ, B.; CHAMPY, P.; NZAMBA, J., ROBLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Antifungal and anthelmintic activities of *Cleistopholis patens* (Annonaceae). **Planta Medica**, v.75, n10, p. 1143-1145, 2009.

ALMEIDA, J. R. G. S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; LIMA, E. O.; AGRAC, M. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oils of *Duguetia gardneriana* Mart. and *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 3, p. 275-278, 2010.

ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 192–196, 2006.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids – Secrets of Life**. Hardbound, Finland, 2007. 316 p.

ARAÚJO, A.C.; NOBRE, A.D.; KRUIJT, B.; ELBERS, J. A.; DALLAROSA, R.; STEFANI, P.; VON RANDOW, C.; MANZI, A. O.; CULF, A. D.; GASH, J. H. C.; VALENTINI, R.; KABAT, P. Comparative measurements of carbon dioxide fluxes from two nearby towers in a central Amazonian rainforest: The Manaus LBA site. **Journal of Geophysical Research**, v. 107, p. 8066-8091, 2002.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARRUDA, L. M. **Estudo fitoquímico e biológico de *Duguetia riparia* (Annonaceae)**. 157 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2009.

AU, T. S.; YUSOF, M. Y.; WIART, C.; HASSAN, H.; HANIFAH, Y. A.; KAMARUDDIN, M. Y. Antibacterial activity of *Annona squamosa* Linnaeus (Annonaceae). In: Investing in Innovation, v. 3, **Bioscience and Biotecnology**, p. 7-10, 2003.

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

BERGEY, D.H. **Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology**. v. 4, Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA., 1989.

BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; THIJS, H.; BELDER, E.; WAALWIJK, C; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v. 141, n. 4, 775-784, 1995.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 40 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP, 2008.

CAFÊU, M. C., SILVA, G. H., ARAUJO, A. R., BOLZANI, V. S., PRINCE, K., LEITE, C. Q., PFENNING, L. H. Substâncias bioativas contra *Mycobacterium tuberculosis* produzidas pelo fungo endofítico *Colletotrichum crassipes*. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2006.

CAMPOS, F. F. **Isolamento e identificação de substâncias produzidas por fungos endofíticos associados a *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**. 172p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2009.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous endophyte in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

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

CASTILLO, U.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennediana nigricans*. **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

CAVALCANTE, R. M.; FILHO, N. S. M.; VIANA, R. B.; OLIVEIRA, I. R.; NASCIMENTO, R. F. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 560-564, 2007.

CERKAUSKAS, R. F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp. – Implications for mycoherbicides. **Phytopathology**, v. 77, p. 1703, 1987.

CERIGIOLI, M. C. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zeamays L.*) e potencial para promoção de crescimento**. 149p. Tese (Doutorado em Ciências – Ciências Biológicas). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo, 2005.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceeding of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 179 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2012.

CHRISTENSEN, B.T. Carbon in primary and secondary organomineral complexes. In: CARTER, M.R. e STEWART, B.A., eds. **Structure and organic matter storage in agricultural soils**, Boca Raton, CRC Press, 1996. p. 97-165.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.

COSTA, I. P. M. W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Micologia Básica) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, RE, 2003.

COSTA, M. S. T.; GAMA, A. M.; PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. D. L. População endofítica de fungos filamentosos, bactérias e actinomicetos de *Duguetia stelechantha*, uma Annonaceae da floresta amazônica. **54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, BA**, 2008.

CRAVEIRO, A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**, Fortaleza: Edições UFC, 1981, 209 p.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p. 455-463, 1999.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 360-368, 2002.

FAETH, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, v. 98, p. 25-36, 2002.

FAGUNDES, F.A; OLIVEIRA; L. B. de; CUNHA; L.C; VALADARES; M.C; *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, p.24-29, 2005.

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

FECHINI, I. M.; NAVARRO, V. R.; DA-CUNHA, E.V. L.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 267-269, 2002.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. **Revista Fitos**, p.73-79, 2006.

FERREIRA, M. C.; VIEIRA, M. L. A.; GALLIZA, I. V.; ROMANHA, A.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; SALES-JÚNIOR, P. A.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Atividade antimicrobiana e tripanosomicida de fungos endofíticos associados à *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) – Andiroba, **XX Congresso Latino Americano de Microbiologia**, 2012.

FIGUEIREDO, E. A. P. DE; RAMOS, H.; AMÉLIA, M.; MACIEL, V. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, p. 421-427, 2007.

FONSECA, S. G. C. **Farmacotécnica de fitoterápicos**, Fortaleza, Ceará, 2005, 64 p.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, B., WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.44, p. 136-142, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v.105, p. 1422-1432, 2001.

HAMZE, A. A. L.; KALIL FILHO, A N.; SOUSA, V. A.; SANTOS, A. F.; NEVES, E. J. M. Metodologia de extração de DNA para análise genética de populações de pupunha (*Bactris gasipaes*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 47, 2003, p. 117-122.

HOPWOOD, D. A. Therapeutic treasures from the deep. **Nature Chemical Biology**, v.3, n. 8, p. 457-458, 2007.

INBAR, E. GREEN, F. J.; HADAR, Y.; MINZ, D., Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. **Microbial Ecology**, v. 50, p. 71-81, 2005.

JURGENS, A.; WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry**, v. 22, p. 551-558, 2000.

KAWAMOTO, S. O.; LORBEER, J. W. Protection of Onion Seedling from *Fusarium oxysporum* sp. cepae by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. **Plant Disease**, v. 60, p. 189-191, 1976.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidiodes*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 709-711, 2003.

KRIEL, W. M.; SWART, W. J.; CROÚS, P. W. Foliar endophytes and heir interactions with host plants, with specific reference to the Gymnospermae. **Advances in Botanical Research**, v. 33, p. 1-34, 2000.

KÜCHMEISTER, H.; WEBBER, A.C.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. A polinização e sua relação com a termogênese em espécies de Arecaceae e Annonaceae da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v.28, n.3, p.217-245, 1998.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKERJEE, B.; MUKERJEE, R. The phytochemistry of Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LECHTMANN, A.; CLAY, K. Isozyme variation in the *Acremonium epichloe* fungal endophyte complex. **Phytopathology**, v. 80, p. 1133-1139, 1990.

LIN, W.; LI, F.; FU, H.; SATTLER, I.; HUANG, X.; GRABLEY, S. New ciclopentenone derivates from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the Mangrove plant *Aegiceras comiculatum*. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 594-598, 2005.

LISCOMBE, D. K.; ZIEGLER, J.; SCHMIDT, J.; AMMER, C.; FACCHINI, P. J. Targeted metabolite and transcript profiling for elucidating enzyme function: isolation of novel N-methyltransferases from three benzyloisoquinoline alkaloid-producing species. **The Plant Journal**, v. 60, p. 729-743, 2009.

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

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Azaphenanthrene alkaloids with antitumoral activity from *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7125–7131, 2011.

MACHADO, M. A. B. L. Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). 143 p. Tese (Doutorado em Química e Biologia) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Maceió, 2009.

MAGALHÃES, W. C. S.; MISSAGIA, R. V.; COSTA, F. A. F.; COSTA, M. C. M. Diversidade de fungos em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne**, v. 14, n. 3, p. 267-273, 2008.

MANSKE, R. H. F. **The alkaloids – Chemistry and Physiology**, Elsevier, vol. 12, 1970, 657 p.

MARQUES, P. B.; BENEDITA, A.; VIEIRA, R. *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no centro de diagnóstico da Unimed Belém – Pará. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 3, p. 175–177, 2007.

MARQUES FILHO, A.O., RIBEIRO, M.N.G.; SANTOS, H.M.; SANTOS, J.M. Estudos climatológicos da Reserva Florestal Ducke – Manaus – AM. IV. Precipitação. **Acta Amazônica**, v. 11, p. 759-768, 1981.

MATA, P. T. G.; ABBEG, M. A. descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2007.

MATSSURA, T. **Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*)**. 69p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, 1998.

MENEZES, L. R. A.; NEPEL, A.; SALVADOR, M. J.; BARISON, A.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F.R.; COSTA, E. V. Alcalóides isoquinolínicos isolados do caule de *Xylopia laevigata* (Annonaceae) e investigação das atividades tripanocida e antimicrobiana. **52º Congresso Brasileiro de Química**, Recife, PE, 2012.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 405-411, 2009.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial, cytotoxic, and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*. **Journal of**

Natural Products, v. 64, p. 559-562, 2001.

MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A.; ARAÚJO, K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

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

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

NETO, P. Q. C. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução), Universidade Federal de São Carlos, Convênio de Cooperação Institucional com a Universidade Federal do Amazonas - Manaus, Amazonas. 2002, 103 p.

NEVES, R. P; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p. 409-420, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

PASCOAL, A. M.; RESENDE, E. C.; LIÃO, L. M. Atividade antibacteriana de *Duguetia furfuraceae*. **26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Poços de Caldas, MG, 2003.

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451-453, 2005.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 163-168, 2007.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

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

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (ed). **Microbial ecologyleaves**. New York: Spring Verlag, 1991, p. 179-197.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de Micro-organismos Endofíticos por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

PRODIVERSITAS. **Plantas medicinales del Amazonas**. Disponível em: <www.prodiversitas.bioetica.org/plantas.htm>; acesso em 23 de fevereiro de 2011.

PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE. **Fazenda Experimental – UFAM**. Disponível em: <<http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/ufam/>>; acesso em 19 de fevereiro de 2011.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: INPA/SEBRAE, v.1, 2002, 532 p.

RIBEIRO, J. E. L.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Guia da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Editora INPA, 2002, 816p.

RIBOLDI, G. P. **Perfil de resistência antimicrobiana e análise genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos em Porto Alegre, RS**. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart**. 125 p. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

ROCHA, A. I.; LUZ, A. I.; ROGRIGUES, W. A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. III – Annonaceae. **Acta Amazonica**, v. 11, n. 3, p. 537-546, 1981.

RODRIGUES, R. L. **Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae) presentes em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins**. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2010.

SANTOS, I. P.; SILVA, A. P. S.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M.; CAVALCANTI, M. S.; LIMA, V. L. M. atividade antibacteriana do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* isolados da planta *Indigofera suffruticosa* Mill. **62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Natal, RN, 2010.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana do extrato *in vitro* de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 215-219, 2007.

SANTOS, D. O.; LEAL, B.; FERREIRA, A.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Hospitalar**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. **The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of Northwest Amazonia**, Dioscorides Press. Portland, 1990, p. 57-58.

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

SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109,

p. 661-686, 2005.

SIEBER-CANAVESI, F.; PETRINI, O.; SIEBER, T. N. Endophytic leptostroma species on *Piceaabies*, *Abiesalba*, and *Abiesbalsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. **Mycologia**, v. 83, n.1, p. 89-96, 1991.

SILVA, F. R.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 6, n. 2, p. 27-36, 2011.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B. & CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.), **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SOARES, A. C. F. et al., Soil streptomycetes with in vitro activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Brasilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 456-461, 2006.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALVES, M. S. et al. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. barks. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 11056–11066, 2012.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, G. M. C. O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 1, p. 1759–1766, 2006.

SOUSA, O. V.; SOARES JÚNIOR, D. T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOD, R. G.; GATTASS, C. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 11-14, 2004.

SOUZA, A. Q. L. **Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. 155 p. Tese. (Doutorado em Ciências – Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2006.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnoscogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

SOUZA, A. Q. L. **Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, 155p. 2006.

STROBEL, G. A. Rain forest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p. 491- 502, 2003.

TAYLOR, J. E.; HIDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, p. 335-346, 1999.

TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE, H. M. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)**. Edua, Manaus, 2011, 255 p.

TOMASINO, S. F.; LEISTER, R. T.; DIMOK, R. M.; BEACH, R. M.; KELLY, J. L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA* (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, v. 3, 442-448, 1995.

VIEIRA, P. D. S.; SILVA, F. G.; SILVA, W. M. T.; CAVALCANTI, P. A.; LIMA, D. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2012.

VIEIRA, G. H. F.; MOURÃO, J. A.; ÂNGELO, Â. M.; COSTA, R. A.; VIEIRA, R. H. S. D. F. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129–132, 2010.

VIEIRA, M. G. S.; QUEIROZ, V. A.; FREITAS, J. V. B.; GOMES, C. L.; COSTA NETO, A.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V. Constituintes voláteis de *Xylopiá nitida* Dunal (Annonaceae). **50º Congresso Brasileiro de Química**, Cuiabá, MT, 2010.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. **Journal of Products**, v. 48, p. 151-152, 1985.

WILSON, D. Fungal endophytes – out of sight but should not be out of mind. **Oikos**, 68, p. 379-384, 1993.

YUE, Q., MILLER, C. J.; WHITE, J. F. Jr., RICHARDSON, M. D. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichoe festucae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4687-4692, 2000.

ZIEGLER, J.; FACCHINI, P. J.; GEIßLER, R.; SCHMIDT, J.; AMMER, C.; KRAMELL, R.; VOIGTLÄNDER, S.; GESELL, A.; PIENKNY, S.; BRANDT, W. Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1696-1707, 2009.

ZOBERI, M. H. **Tropical microfungi**. 1ª ed. London: The Mac Millan Press, 1972, 158 p.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.

8. ANEXOS

Meios de cultura utilizados nesta pesquisa:

a) Ágar Batata Dextrose – BDA

Batata descascada	-----	200 g
Dextrose	-----	20 g
Ágar	-----	15 g
Água destilada	-----	1000 mL

pH final a 25 °C: 5,6 ±0,2.

b) Ágar Aveia

Aveia	-----	10 g
Extrato de Malte	-----	10 g
Extrato de Levedura	-----	4 g
Dextrose	-----	4 g
Ágar	-----	15 g
Água destilada	-----	1000 mL

c) Ágar ISP2

Amido	-----	10 g
Extrato de Malte	-----	10 g
Extrato de Levedura	-----	4 g
Dextrose	-----	4 g
Ágar	-----	15 g
Água destilada	-----	1000 mL

d) Caldo BD

Batata descascada	-----	200 g
Dextrose	-----	20 g
Água destilada	-----	1000 mL

pH final a 25 °C: 5,5 ±0,2.

e) Ágar Brain Heart Infusion (BHI) – HIMEDIA

Ágar BHI	-----	52 g
Água destilada	-----	1000 mL

pH final a 25 °C: 7,4 ±0,2.

f) Ágar Sabouraud – HIMEDIA

Ágar Sabouraud	-----	65 g
Água destilada	-----	1000 mL

pH final a 25 °C: 5,6 ±0,2.

g) Caldo Brain Heart Infusion (BHI) – HIMEDIA

Ágar	-----	37 g
Água destilada	-----	1000 mL
pH final a 25 °C: 7,4 ±0,2.		

h) Caldo Sabouraud – HIMEDIA

Ágar	-----	g
Água destilada	-----	1000mL
pH final a 25 °C: 5,6 ±0,2.		

Soluções e Reagentes empregados neste trabalho:

a) Álcool 70%

Álcool 92,8°INPM	-----	730 mL
Água destilada	-----	270 mL

b) Tween 80 a 0,02%

Tween 80	-----	2 mL
Água destilada	-----	100 mL

c) Glicerol a 20%

Glicerol	-----	20 mL
Água destilada	-----	100 mL

d) Água do mar sintética

Sal marinho	-----	37 g
DMSO	-----	1 mL
Água destilada	-----	1000 mL

Esterilização – A esterilização dos meios de cultura e soluções preparadas foi realizada em autoclave a 121°C, 1 atm durante 15 minutos, de acordo com a especificação dos fabricantes.