

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA- ICET
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS-PPGCTRA

BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS
DA ESPÉCIE *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt

SANAY FEITOSA LIMA RIBEIRO

ITACOATIARA- AM
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS- UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA- ICET
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS-PPGCTRA

SANAY FEITOSA LIMA RIBEIRO

BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS
DA ESPÉCIE *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na área de Ciências e Tecnologia para Recursos Amazônicos.

Área de concentração: Desenvolvimento Científico de Recursos Amazônicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Martins de Oliveira

ITACOATIARA-AM
2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R484b Ribeiro, Sanay Feitosa Lima
BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS BRUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS
DA ESPÉCIE *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt / Sanay Feitosa
Lima Ribeiro. 2015
59 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Camila Martins de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Bactérias Gram-positivas. 2. Gram-negativas. 3.
microorganismos. 4. Loranthaceae. I. Oliveira, Camila Martins de II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título


SANAY FEITOSA LIMA RIBEIRO


Bioprospecção da Atividade Antimicrobiana de
Extratos Brutos de Fungos Endofíticos Isolados da
Espécie *Oryctanthus alveolatus* (Kunth) Kuijt


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 30 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Dra. Camila Martins de Oliveira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Dra. Liane Cristine Rebouças Desmósthene
Universidade Federal do Amazonas


Dr. Ademir Castro e Silva
Universidade Federal do Amazonas

Ao meu pai, minha mãe, meu
esposo minha filha e aos meus
irmãos, pelo incentivo durante
a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Deus por ter me dado o dom da vida, a paciência, a determinação, a sabedoria e principalmente a força de vontade para conseguir alcançar todos os objetivos.

À minha família em especial meu pai Sebastiao Lima e mãe Maria Eliane Lima e meu esposo Jodson Ribeiro por estarem sempre ao meu lado, tanto nos momentos bons quanto nos mais difíceis, me incentivando sempre a estudar e seguir no caminho do bem, me apoiando e ajudando a buscar os objetivos com determinação e força de vontade.

A minha filha Maria Samyra por toda compreensão carinho e companheirismo.
A minhas irmãs Sanayane Lima e Dayane Lima e irmão Ícaro Lima pelo carinho e incentivo aos meus objetivos.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a.Camila Martins de Oliveira por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e incentivo dados durante esta caminhada.

Ao professor Ademir Castro e Silva (UEA- CESIT) por toda ajuda e paciência dados na realização do trabalho.

A todos os amigos do grupo EQUIBIM, pelo apoio e incentivo.

A aluna Hatylla Eduarda Dias dos Santos pelo isolamento e codificação dos fungos usados na pesquisa.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos pelos ensinamentos.

A FAPEAM pelo incentivo com a concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para elaboração deste trabalho.

RESUMO

As plantas pertencentes à família Loranthaceae são popularmente conhecidas como ervas-de-passarinho. Entre as mais diversas plantas conhecidas pertencentes a essa família, destaca-se *Oryctanthus alveolatus*, na qual despertou o interesse, devido aos poucos estudos fitoquímicos e microbianos realizados com esta planta. Os microrganismos são em sua maioria, vistos como agentes fitopatogênicos, principalmente fungos e bactérias. Entretanto, eles também são úteis na produção de substâncias químicas, como antibióticos e antitumorais. Dentre os fungos existentes, os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior das plantas trazendo benefícios às mesmas. Assim o objetivo desse trabalho foi obter e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de 29 fungos endofíticos isolados das folhas e caules da espécie *Oryctanthus alveolatus*, frente às bactérias patogênicas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Todos os extratos foram submetidos a ensaio antimicrobiano utilizando teste de difusão em ágar nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Apenas três extratos; Coa 007, 009a e 014, conseguiram inibir o crescimento bacteriano de uma ou mais cepas testadas na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Posteriormente, os extratos ativos foram testados nas concentrações de 200, 500, 700, 800 e 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que o extrato Coa 007 apresentou CIM nos valores de 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* e CIM no valor de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a bactéria *S. aureus*. O extrato Coa 009a apresentou CIM no valor de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias *S.aureus* e *E.coli* e o extrato Coa 014 apresentou CIM nos valores de 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a bactéria *E. coli* e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os demais fungos testados não inibiram o crescimento bacteriano. Os fungos, em que os extratos apresentaram atividade, também foram avaliados do ponto de vista morfológico. Os fungos Coa 007 e Coa 014 apresentaram características macromorfológicas inicialmente parecidas: ambos possuíam coloração branca, com textura algodonosa e opaca. Com o tempo, o Coa 007 passou a apresentar coloração reversa bege-rosa, diferenciando do Coa 014 que passou a apresentar pontos de pigmentação rosa, com parte reversa de cor bege. O Coa 009a apresentou inicialmente coloração preta, tornando-se negro-acinzentado, algodonoso, e reverso da colônia negro.

Palavra-chave: Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, microrganismos, Loranthaceae.

ABSTRACT

The plants belonging to the family Loranthaceae are popularly known as ervas-de- passarinho. Among the various plants known belonging to this family, there is *Oryctanthus alveolatus*, which sparked interest due to the few phytochemicals and microbial studies with this plant. Microorganisms are mostly seen as pathogenic agents, especially fungi and bacteria. However, they are also useful in the production of chemicals such as antibiotics and antitumor. Among the existing fungi, endophytic fungi are microorganisms that inhabit the interior of plants bringing benefits to them. So the aim of this study was to obtain and evaluate the antimicrobial activity of crude extracts of 29 isolated endophytic fungi of the leaves and stems of *Oryctanthus alveolatus* species, in the face of pathogenic Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* and Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. All extracts were subjected to antimicrobial assay using agar diffusion test at concentrations of 0,5 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ and 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Only three extracts; Coa 007, 009a and 014, were able to inhibit bacterial growth of one or more strains tested at 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Subsequently, the active extracts were tested at concentrations of 200, 500, 700, 800 and 900 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, and the Coa 007 extract showed the CIM values of 900 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ for the bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* and CIM of 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ for the bacteria *S. aureus*. The Coa 009a extract showed CIM of 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ for *S. aureus* and *E. coli* bacteria and Coa 014 extract showed CIM in the amount of 900 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ for *E. coli* and 1000 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ for the bacteria *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The other fungi tested did not inhibit bacterial growth. Fungi in the extracts were active, they were also evaluated the morphological point of view. The Coa 007 and Coa 014 fungi presented macromorfológicas initially similar characteristics: both possessed white coloring, with algodonsa and opaque texture. Over time, the Coa 007 now presents beige-pink color reverse, differentiating Coa 014 that pasou to present pink pigmentation spots, with reverse part of beige. The Coa 009a initially presented black color, becoming black-gray, cotton wool spots, and reverse the black colony.

Keyword: Bacteria Gram-positive and Gram-negative, microorganisms, Loranthaceae

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Fungo filamentosos e fungo leveduriforme.....	19
Figura 02: Modo de transmissão dos fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.....	21
Figura 03: Antibióticos de origem fúngica: penicilina F e cefalosporina C.....	23
Figura 04: Estrutura química do taxol.....	24
Figura 05: Estrutura química da vincristina.....	24
Figura 06: Podofilotoxina.....	25
Figura 07: Talaperoxide B (1) e D (2).....	25
Figura 08: Beauvericina.....	26
Figura 09: Brefeldina A.....	27
Figura 10: Luteolina.....	28
Figura 11: Adenina (1), adenosina (2) e desoxiadenosina (3).....	28
Figura 12: Palmarumicina C3.....	29
Figura 13: (3S)-3,6,7-trihidroxi-alfa-tetralona.....	34
Figura 14: a) ergosta-5,7,22-trien- 3-ol ; b) 2,3-dihidro-5-hidroxi-alfa, alfa - dimetil-2-benzofuranmentanol.....	35
Figura 15: Botrallin.....	35
Figura 16: Dicerandrol A, B e C.....	36
Figura 17: Preservação dos fungos em <i>Castellani</i> e <i>slant</i>	39
Figura 18: Extratos brutos dos fungos endofíticos isolados da espécie <i>Oryctanthus alveolatus</i>	40
Figura 19: Disposição dos discos na placa de petri.....	42
Figura 20: Corrida cromatográfica dos extratos fúngicos.....	47
Figura 21: Isolado Coa 007 morfologia micelial (A); morfologia reversa (B).....	48
Figura 22: Isolado Coa 009a morfologia micelial (A); morfologia reversa (B).....	48
Figura 23: Isolado Coa 007 morfologia micelial (A); morfologia reversa (B).....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Código, fonte de origem e massas dos fungos endofíticos e teste antimicrobiano.....	44
Tabela 02: Resultados da concentração inibitória mínima.....	45
Tabela 03: Análise estatística dos extratos. Média dos halos (média \pm desvio padrão) nas diferentes concentrações dos extratos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- American Type Culture Collection.

AIDS- Acquired Immunodeficiency Syndrome (síndrome da imunodeficiência adquirida).

BDA- Batata Dextrose Ágar.

BOD- Demanda Biológica de Oxigênio.

CIM- Concentração Inibitória Mínima.

Coa- Caule da *Oryctanthus alveolatus*.

DMSO- Dimetilsulfóxido.

DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila.

EQUIBIM- Grupo de Estudos Químicos e Biológicos de Microrganismos da Amazônia.

FAPEAM- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.

Foa- Folha da *Oryctanthus alveolatus*.

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana.

ICET- Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia.

mL- Mililitro.

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ - Micrograma por mililitro.

MBD- Meio de batata dextrose .

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards.

OprD- Porina.

pH- Potencial hidrogeniônico.

UEA- Universidade do Estado do Amazonas.

UFAM- Universidade Federal do Amazonas.

UFC- Unidade Formadora de Colônias.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	05
RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	08
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
INTRODUÇÃO.....	12
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1. Loranthaceae	14
1.2. Fungos: biodiversidade, características e importância.....	16
1.3. Fungos endofíticos.....	19
1.4. Importância dos fungos endofíticos.....	22
1.5. Agentes infecciosos.....	29
1.6. Atividade antimicrobiana de extratos e substâncias puras de fungos endofíticos.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. METODOLOGIA.....	38
3.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos.....	38
3.2. Preparo dos extratos brutos.....	39
3.3. Ensaios antimicrobianos.....	40
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	43
4.1. Perfis químicos dos extratos.....	47
4.2. Caracterização dos fungos endofíticos por macromorfologia.....	48
5. CONCLUSÕES.....	50
6- REFERÊNCIAS.....	51

INTRODUÇÃO

Oryctanthus alveolatus, conhecida por erva-de-passarinho, assim como outras espécies da família Loranthaceae, é uma planta hemiparasita encontrada nos galhos e troncos das árvores (VINOD *et al.*, 2005). Encontra-se distribuída na América Latina principalmente no Peru e em países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador, Panamá, Costa Rica e Nicarágua (COBA; TIVI; VIDARI, 2010). Entre os seus benefícios destacamos sua capacidade antioxidante (WILSON e CALVIN 2006; COBA; TIVI; VIDARI, 2010).

Os fungos fazem parte de um grupo de microrganismos encontrados em todos os nichos ecológicos (BONONI *et al.*, 1999 *apud* MORAIS *et al.*, 2014). Calcula-se que existam em torno de 1,5 milhões de espécies de fungos no mundo, no qual apenas cerca de espécies já foram caracterizadas (HAWKSWORTH, 2004 *apud* MORAIS *et al.*, 2014). Os fungos desempenham um papel importante na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas por meio da decomposição de matéria orgânica, reciclagem e transporte de nutrientes. Possuem grande importância econômica para as indústrias alimentícia, como na fabricação de pães, na farmacêutica como produção de medicamentos e para a agricultura no combate de pragas as plantações. (MUELLER *et al.*, 2004 *apud* MORAIS *et al.*, 2014).

Assim como em outras espécies de plantas, na família Loranthaceae são encontrados microrganismos endofíticos destacando-se os fungos. Os endofíticos são microrganismos que residem nos espaços inter e intracelular de plantas vasculares durante um período do seu ciclo de vida, não causando efeitos patogênicos ao hospedeiro (KHARWAR *et al.*, 2011). Nessa relação simbiótica os fungos podem desempenhar funções relevantes como a proteção contra pragas e patógenos, o que pode aumentar o crescimento e o enraizamento do vegetal, além de propiciar a produção de compostos químicos como enzimas, alcalóides, hormônios e antibióticos, que apresentam diversas atividades

biológicas (PEIXOTO NETO, AZEVEDO, ARAÚJO, 2002).

Várias considerações sobre o potencial de alguns microrganismos endofíticos vem afirmando que, principalmente os restritos a certos hospedeiros, podem ter aplicações biotecnológicas das mais diversas (WIYAKRUTTA *et al.*, 2004).

O uso indiscriminado de antibióticos é um dos principais fatores do surgimento de bactérias resistentes aos fármacos presentes no mercado, por isso, se faz indispensável à busca por substâncias naturais com atividades antimicrobianas (CARVALLO *et al.*, 2002; SADER *et al.*, 2005).

Dentro deste contexto, a prospecção química de metabólitos fúngicos apresenta-se como uma perspectiva de suma importância, pois sabe-se que microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, produzindo uma série de moléculas bioativas que podem atuar no combate a patógenos. Ademais, há possibilidade de que novos compostos de valor econômico sejam descobertos, como novos antibióticos, antifúngicos, agentes terapêuticos, produtos químicos, enzimas, entre outros (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Loranthaceae

A família Loranthaceae possui aproximadamente 73 gêneros e 900 espécies, compreendendo principalmente as plantas hemiparasitadas (VIDAL-RUSSELL; NICKRENT, 2008), com maior diversidade em áreas tropicais (VIEIRA *et al.*, 2005). A família Loranthaceae é popularmente conhecida como erva-de-passarinho (CAZETTA; GALETTI, 2003), cujo nome se dá devido a relação que possui com os pássaros que realizam a dispersão de seus frutos através das fezes ou dos seus bicos ajudando na germinação e proliferação das plantas (LORENZI, 1991; LEAL; BUJOKAS; BIONDI, 2006; CAIRES; UCHÔA-FERNANDENS, 2009). Além dos pássaros, as plantas desenvolveram outras estratégias para sua dispersão, como a balística, na qual o fruto explode arremessando a semente (MARTINS *et al.*, 2005). Assim, as sementes liberadas aderem nas plantas hospedeiras por possuírem uma camada de substância mucilaginosa (LEAL; BUJOKAS; BIONDI, 2006).

Algumas espécies de erva-de-passarinho tem importância econômica, devido aos prejuízos que causam a diversas plantações. A presença dessas plantas hemiparasitas danificam árvores e arbustos de florestas, pomares e jardins. Alguns dos efeitos causados pelas ervas-de-passarinho são: redução do vigor e da produção de frutos e sementes, mau funcionamento dos tecidos lenhosos, folhagem esparsa, morte do ápice, predisposição ao ataque de insetos e doenças e, até mesmo, morte prematura (HARRIS, 1992 *apud* SILVA; CONCEIÇÃO; ALMEIDA *et al.*, 2010).

As espécies da família Loranthaceae são plantas generalistas, podendo parasitar uma variedade de hospedeiros, enquanto outras espécies apresentam uma limitação na quantidade de hospedeiros que parasitam, havendo algumas que são conhecidas por parasitarem apenas uma única espécie de planta as chamadas especialistas

(CONCEIÇÃO *et al.*, 2010).

Dentre as diversas espécies pertencentes a família Loranthaceae, destaca-se a *Oryctanthus alveolatus* que na medicina popular é utilizada para tratar diversas enfermidades, como câncer no estômago (SCUDELLER; VEIGA; ARAÚJO, 2009), malária, no tratamento de fraturas (SALGADO, 2007), além de possuir propriedades antioxidantes. Estudos químicos mostraram a presença de flavonóides, taninos e polifenóis em suas folhas e caules (COBA; TIVI; VIDARI, 2010).

Os flavonóides são metabólicos secundários que no reino vegetal são relacionados com a atração de insetos polinizadores e proteção contra ação de insetos nocivos. Concentrando-se mais na parte aérea das plantas, ocorrendo em menor proporção nas raízes e nos rizomas (SILVA *et al.*, 2015), os flavonóides servem de proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, ação antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibição de enzimas (SILVA *et al.*, 2015).

Os taninos são compostos fenólicos, que em vegetais têm reconhecidamente a função de inibir herbívoros, pois estão presentes em altas concentrações nos frutos, folhas, sementes e demais tecidos (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os polifenóis encontrados em plantas podem participar de processos, que possam ter implicações anticarcinogênicas e antiaterogênicas. Dentre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO., 2007).

Relatos que comprovam a ação antimicrobiana de algumas plantas pertencentes a família Loranthaceae foram encontrados na literatura. Um exemplo foi o estudo *in vitro* realizado com os extratos brutos de fungos endofíticos obtidos da planta *Lorathus ssp.*, no qual seus extratos apresentaram atividades anti-inflamatória e antimicrobiana frente as

cepas bacterianas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* entre outras (GOVINDAPPA, *et al.*, 2011).

Vieira *et al.*, (2005) e seus colaboradores, realizaram ensaios antimicrobianos com extratos hidroalcoólicos da planta *Strutanthus vulgaris* e determinaram que esses extratos apresentaram efeitos positivos frente as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *P. aeruginosa* entre outras. Outro exemplo, foram os resultados obtidos com o extrato aquoso de *Tripodanthus acutifolius* em concentrações que variaram de 100 mg.mL⁻¹ a 0,5 mg.mL⁻¹, e apresentaram potencial antibacteriano contra *S. aureus* evidenciado pelo aparecimento de zonas de inibição do crescimento bacteriano (SOUZA *et al.*, 2014).

1.2. Fungos: Biodiversidade, Características e Importância.

Estima-se que o Reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies, com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (HAWKSWORTH, 2001). Algumas espécies são importantes patógenos de plantas, de animais e do homem, outros são capazes de estabelecer uma relação mutualística com seu hospedeiro, seja ele planta, alga, cianobactéria ou animal (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MUELLER; BILLS; FOSTER, 2004).

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; possuem parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos, desprovidos de clorofila e incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Os fungos são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos. (MINAMI, 2003).

Quanto a biosidversidade, Loguercio (2004), afirma que os fungos estão agrupados em quatro filos: Chytridiomicota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Do primeiro, fazem parte os fungos mais simples e com dimensões muito pequenas, que normalmente

apresentam esporos flagelados. É considerada a linhagem mais primitiva de fungos. O filo Zygomycota apresenta duas classes: Zygomycetes e Trichomycetes. A classe Zygomycetes é distinguida pela produção de um esporo de resistência, de origem sexual, o zigosporo. Tem importância na indústria alimentícia pois, algumas espécies são utilizadas na fabricação de produtos industriais como amilases (*Mucor racemosus*), β -caroteno (*Blakeslea trispora*), ácido cítrico (*Mucor piriformes*), ácido fumárico (*Rhizopus oryzae*) entre outros (LOGUERCIO, 2004)

O filo Ascomycota possui o maior número de espécies até agora encontradas, e devido à variabilidade estrutural e numérica, ainda não existe uma delimitação mais precisa das suas categorias taxonômicas superiores. Existem cerca de nove classes de ascomicetos que continuam em discussões entre os especialistas. Por fim, o filo Basidiomycota onde, a maioria das espécies produz estruturas protetoras macroscópicas. Outros são comestíveis, produtores de antibióticos ou podem ser tóxicos (LOGUERCIO, 2004).

Os fungos retiram o carbono de que necessitam dos compostos orgânicos vivos (parasitismo) ou mortos (saprotismo), das proteínas, dos hidratos de carbono, dos lipídios, dos álcoois. Retiram o nitrogênio de nitratos, de sais de amônio, de ácidos aminados, de uréia, da peptona, do ácido glutâmico. Para utilizarem carbono e nitrogênio, muitos fungos necessitam de fatores de crescimento (nutrilitos), como ácidos aminados e vitaminas, específicos para esta ou aquela espécie, eventualmente um sal orgânico como tauroglicocolato de sódio (para o fungo leveduriforme *Malassezia furfur*, habitante normal de nosso couro cabeludo), quando se deseja cultivá-lo artificialmente, ou ainda o soro fetal bovino, quando também se deseja cultivar no laboratório o *Corynebacterium tenuis* e o *Corynebacterium minutissimum*, agentes de infecções superficiais. Quanto ao oxigênio, os fungos são normalmente aeróbios, podendo desenvolver-se em anaerobiose, sob certas condições (OLIVEIRA, 1999).

Dos Actinomicetos, devemos salientar que os do gênero *Actinomyces*, alguns dos quais vivem na boca do homem e dos animais, são anaeróbicos ou semi-anaeróbios (o mesmo que microaerofílicos). Outros elementos químicos fundamentais são: potássio, magnésio, ferro, fósforo, enxofre e cálcio (menos valor). Quanto ao pH do meio, a sua importância é relativa, mas podemos dizer que, em geral, está em torno de 6,0. A maioria dos fungos que se desenvolvem neste pH também cresce relativamente bem, acima e abaixo deste número (OLIVEIRA, 1999). Os actinomicetos do gênero *Actinomyces*, bem como o *Corynebacterium tenuis* e o *Corynebacterium minutissimum*, comportam-se como as bactérias, sendo mais exigentes quanto ao pH 7 a 7,2 (OLIVEIRA, 1999).

Os fungos podem ser filamentosos (figura 01 A, B), constituídos por filamentos longos e ramificados denominados hifas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Como exemplo o fungo *Fusarium sp.*(ARAÚJO, 2009). E os fungos leveduriformes (figura 02 C, D), constituídos por células individuais que se reproduzem por brotamento ou fissão binária, ou dimórficos, podendo ser filamentosos ou leveduriformes dependendo das condições ambientais, principalmente a temperatura (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Como exemplo a *Candida albicans* (ARAÚJO, 2009).

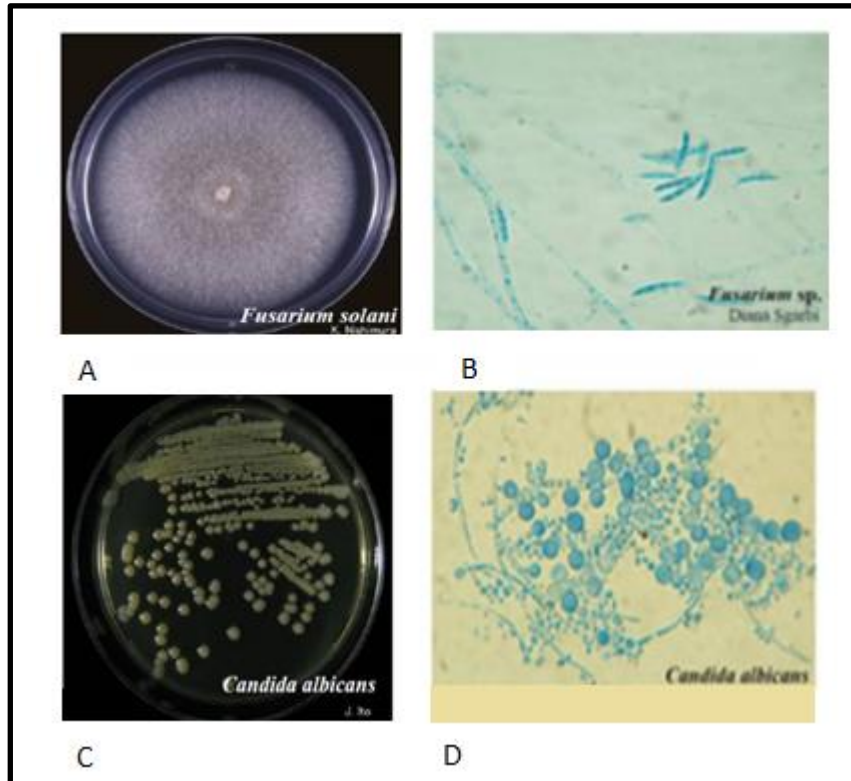


Figura 01: Fungo filamentoso a) imagem macroscópica da colônia fúngica do *Fusarium solani*; b) imagem microscópica de sua colônia, apresentando conídios em forma de foice e multiseptados. Fungo leveduriforme c) imagem macroscópica da colônia de *Candida albicans*, cor creme e aspecto pastoso; d) imagem microscópica de sua colônia apresentando células arredondadas a ovais.

1.3. Fungos Endofíticos

O termo endofitos ou endofíticos originalmente descrito por Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. No entanto, a teoria mais aceita e utilizada, é que endofíticos são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos ao hospedeiro (KHARWAR, *et al.*, 2011). Endofíticos colonizam todos os tecidos de diferentes órgãos das plantas, tais como raízes, flores, folhas, sementes, frutos, pecíolos e caules, podendo a colonização ser específica, e ocorrer em diferentes órgãos, como raízes e folhas (FISHER; PETRINI, 1992; QIN *et al.*, 2012 *apud* SILVA, 2014). Esta especificidade pode ser causada devido à diferença química ou tecidual das estruturas internas dos órgãos vegetais das plantas (SILVA, 2014; WAGNER; LEWIS, 2000).

O que determina se um fungo é endofítico ou fitopatogênico é justamente o seu comportamento após a colonização, ou seja, que consequências que esse microrganismo trará para a espécie hospedeira. Em resumo, os fitopatógenos ao entrar em contato com o hospedeiro, germinam com formação do apressório, liberam enzimas que degradam a parede celular e a planta tenta se defender com a produção de proteínas de resistência. (KOGEL; FRANKEN; HUCHELHOVEN, 2006). Entre essas enzimas podemos destacar a lipolítica produzida por fungos endofíticos dos gêneros *Colletotrichum*, *Glomerella* e *Fusarium* (LUZ *et al.*, 2006). Já o fungo endofítico, germina fora da célula vegetal, logo após o contato com a planta ocorre um reconhecimento e uma reprogramação da planta hospedeira para facilitar a entrada do endófito e finalmente o estabelecimento de uma relação simbiótica com a planta (KOGEL; FRANKEN; HUCHELHOVEN, 2006).

Assim, a separação de grupos ditos fitopatogênicos, endofíticos e oportunistas é meramente didática, uma vez que a diferença de um estágio para o outro pode ser muito pequena. Portanto, um microrganismo pode ser considerado endófito, mas com a redução dos mecanismos de defesa da planta, pode se comportar como um patógeno (MAKI, 2006).

A espécie hospedeira pode ser colonizada pelos endófitos horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas (figura 02). A colonização também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida. O modo com que o fungo coloniza uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro (ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011).

Fisher; Petrini; Lappin Scott (1992) isolaram bactérias e fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme, córtex do caule e folha) de plantas de milho sadias, verificando-se que as partes das plantas mais próximas do solo eram mais colonizadas por bactérias do que a parte superior. Já os fungos endofíticos parecem colonizar

preferencialmente as partes suspensa da planta hospedeira e os espaços intercelulares (AZEVEDO; SERAFINI; BARROS, 2001).

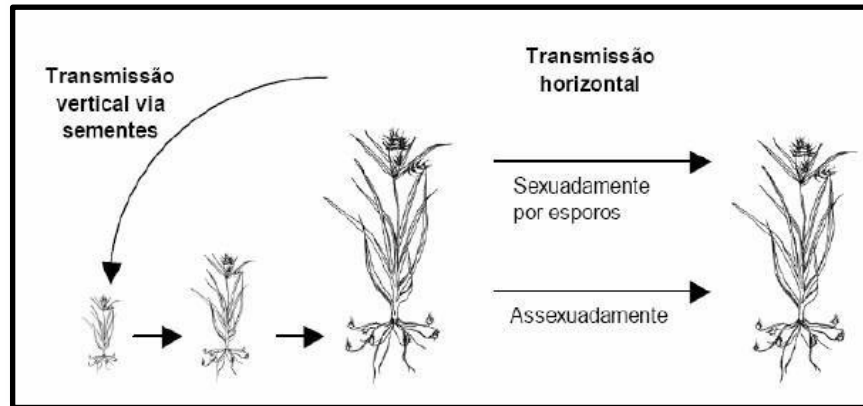


Figura 02: Modo de transmissão dos fungos endofíticos em associação com o hospedeiro.
 FONTE: GUIMARAES, 2006.

A diversidade de fungos associada a uma mesma espécie vegetal não se altera muito quando as amostragens são realizadas em locais de coleta distantes (PETRINI *et al.*, 1992). Entretanto, a frequência relativa das espécies de fungos, mesmo entre plantas de mesma espécie, pode variar bastante de acordo com o regime de chuvas de cada local (CARROL; CARROL, 1978), o método de isolamento dos endófitos a partir do hospedeiro e a idade dos órgãos vegetais utilizados (BERNSTEIN; CARROL, 1977; ARNOLD *et al.*, 2003). Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isolados de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico do hospedeiro (TAN; ZOU, 2001).

Os fungos endofíticos podem oferecer determinadas vantagens à planta hospedeira. Eles são reconhecidos como fonte de substâncias, chamadas de metabólitos secundários, os quais podem apresentar atividades biológicas relevantes (SURYANARAYANAN; KUMARESAN; HOHNSON, 1998). Vários desses metabólitos já foram investigados quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo encontradas com frequência novas estruturas com interessantes atividades biológicas (TAN; ZOU, 2001; GUNATILAKA, 2006). Zhang, Song, Tan (2006) afirmam que fungos endofíticos

conseguem produzir metabólitos secundários em maiores quantidades do que qualquer outra classe de microrganismos endofíticos.

1.4. Importância dos fungos endofíticos

Antibióticos ou substâncias antimicrobianas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, além de prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes e apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química entre outras características (COWAN, 1999).

Inúmeros fármacos comercializados e utilizados atualmente são derivados de metabólitos ou por processos fermentativos realizados por fungos endofíticos (FERRARA, 2006). Esses metabólitos são substâncias de baixo peso molecular que são produzidos pelo microrganismo em resposta às condições ambientais. Acredita-se que esses metabólitos não sejam essenciais ao crescimento do microrganismo, mas que estejam envolvidos em processos de comunicação entre o microrganismo e a planta hospedeira (VIEIRA, 2008).

Os metabólitos secundários já isolados de extratos de fungos endofíticos pertencem a inúmeros grupos estruturais, como: esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados perilenos, quinonas, furandionas, terpenóides, depsipeptídeos e citocalasinas (SCHULZ, 2005). Dentre as funções biológicas de alguns desses compostos pode-se evidenciar as ações antimicrobianas, antiviral, antioxidante, antifúngica, anti-helmíntica, antimalárico, anti-inflamatório, anti-tuberculose, laxativo, antidiabética, imunossupressora, antitumoral, entre outras (STROBEL; DAISY, 2003). Estudos demonstram que novas moléculas produzidas por endofíticos e seus extratos contendo atividades biológicas, ocorrem em número consideravelmente mais elevadas do que as produzidas por microrganismos do solo (SCHULZ *et al.*, 2002; YANG; ZHANG; LUO, 2012).

Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas, destacam-se como os exemplos mais conhecidos, os antibióticos penicilina, produzida por fungos do gênero *Penicillium notatum*, descoberta em 1928 por Alexander Fleming; e a cefalosporina, isolada de culturas de *Cephalosporium acremonium* em 1948 por Brotzu (MENEZES; ALVES; CARDOSO, 2000; PINTO *et al.*, 2002). As estruturas destes antibióticos estão apresentadas na Figura 03.

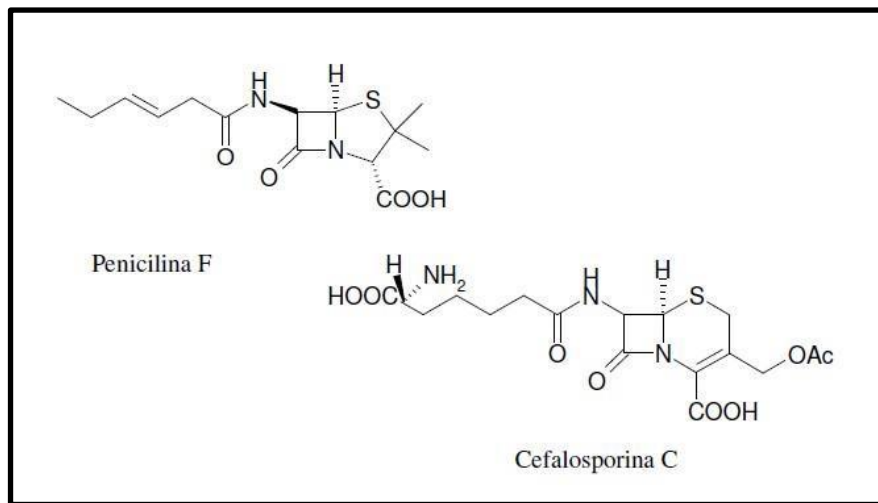


Figura 03: Antibióticos de origem fúngica: penicilina F e cefalosporina C. FONTE: STROBEL, 2003.

Outro exemplo, foi o paclitaxel (figura 04) (Taxol®), uma substância isolada de plantas do gênero *Taxus* e utilizada com sucesso na terapia do câncer de mama e de útero, foi identificado no fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também produz esta substância (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; ZHOU *et al.*, 2010).

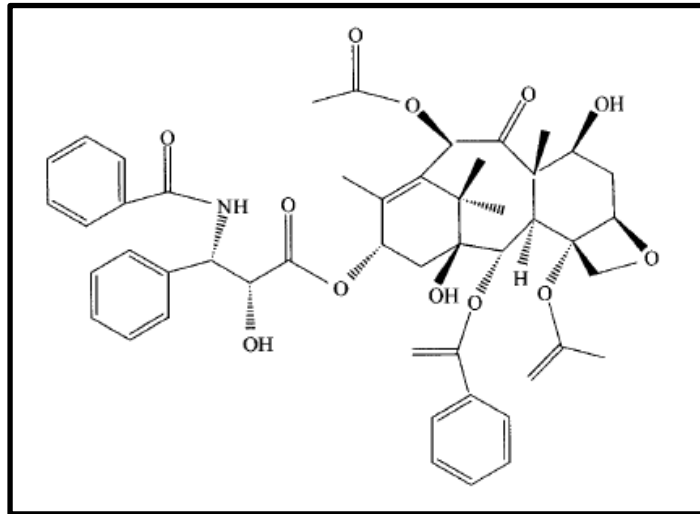


Figura 04: Estrutura química do taxol.
 FONTE: STROBEL, 2003.

A vincristina (figura 05) também se destaca como um importante anticancerígeno isolada da planta *Catharanthus roseus* e recentemente isolada do fungo endófito *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011).

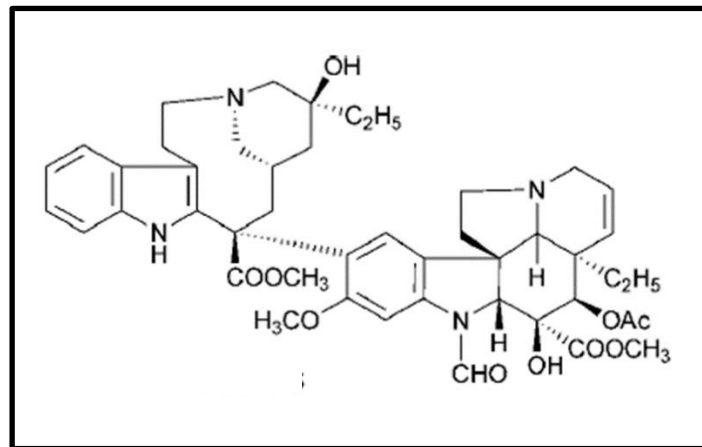


Figura 05: Estrutura química da vincristina.
 FONTE: KHAWAR *et al.*, 2011.

A podofilotoxina (figura 06), também utilizada no tratamento de câncer, é encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophylum* e também relatada nos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011).

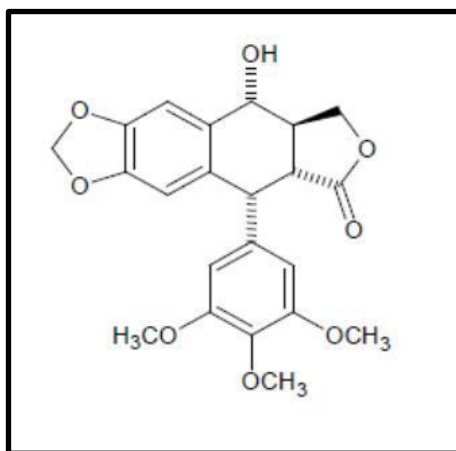


Figura 06: podofilotoxina
 FONTE: PURI *et al.*, 2006 *apud* CANUTO *et al.*, 2012.

Outro importante composto com atividade anticancerígena é o alcalóide camptotecina. Esse potente agente antineoplásico foi primeiramente isolado na China, a partir da madeira de *Camptotheca acuminata Decaisne* (SPECIAN *et al.*, 2014), e já pode ser obtido a partir do fungo endofítico *Fusarium solani*, associado à *Camptotheca acuminata* (KUSARI *et al.*, 2009 *apud* SPECIAN *et al.*, 2014).

Li *et al.*, (2011) e colaboradores, estudaram atividade anticancerígena de dois novos norsesquiterpenos, nomeados de talaperoxide B e D (figura 07), isolado de *Talaromyces flavus*, endofítico de *Sonneratia apétala*, contra cinco linhagens celulares cancerígenas humanas, MCF-7, MDA-MB-435, HepG2, HeLa, e PC-3, encontrando resultados positivos.

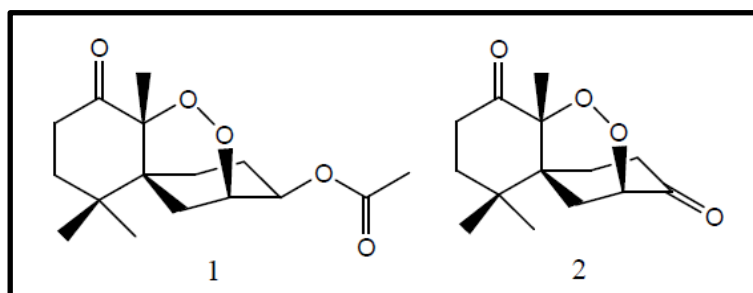


Figura 07: talaperoxide B (1) e D (2).
 FONTE: LI *et al.*, 2011.

Wang *et al.*, (2011) e seus colaboradores, reportaram atividade anticancerígena contra as células PC-3, PANC-1, e A549, a partir de um metabólito chamado Beauvericina (figura 08), isolado do fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, e da planta

Cinnamomum kanehirae.

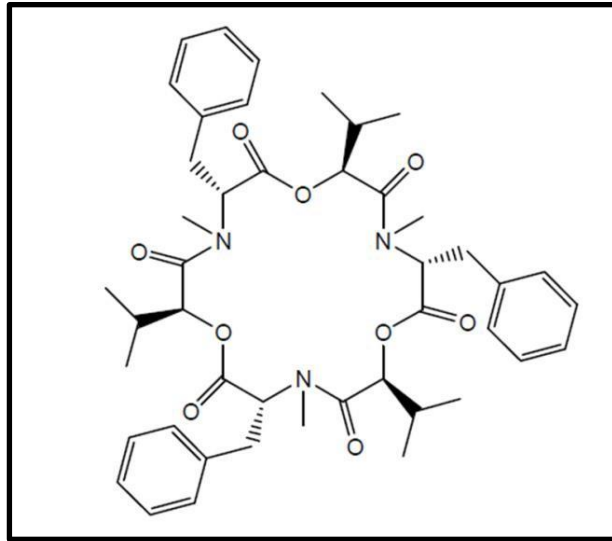


Figura 08: Beauvericina.
FONTE: WANG *et al.*, 2011

Silva *et al.*, (2006) investigaram que fungos endofíticos isolados de *Annona* spp., dos gêneros *Acremonium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Cylindrocladium*, *Chaetomium* e *Fusarium* que promoveram eficiente crescimento vegetal de mudas de pinha. Foi investigado na cultura do cacaueteiro, o fungo *Trichoderma*, e observou que ele tem sido utilizado com sucesso em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa (SILVA *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2005). Já o fungo endofítico *Gliocladium catenulatum*, conseguiu reduzir em 70% a doença nas mudas de cacaueteiro testadas (RUBINI *et al.*, 2005). Foram selecionados 11 fungos endofíticos com potencial de suprimir, quase que completamente os efeitos da infecção de *Verticillium dahliae* em berinjela (NARISAWA *et al.*, 2002).

Uma evidência de associação bem sucedida é a que envolve fungos produtores de Brefeldina A (figura 9), tais como *Aspergillus clavatus* e *Paecilomyces* sp. em *Taxus mairei* e *Torreya grandis*, respectivamente. Brefeldina A é um macrolídeo que protege a planta contra infecção bacteriana, ataques de insetos e de animais; no entanto, essa substância atua sobre o sistema secretor da planta, facilitando a absorção de nutrientes da

planta hospedeira (GUNATILAKA, 2006 *apud* CANUTO *et al.*, 2012).

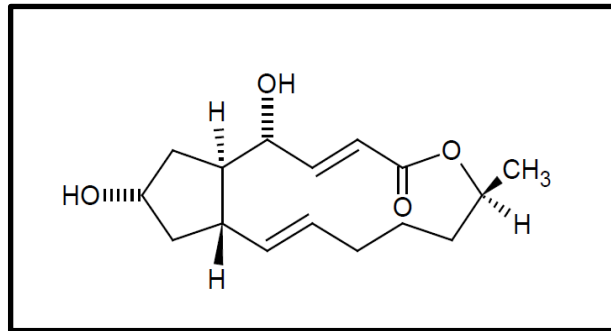


Figura 9: Brefeldina A
FONTE: WEBER *et al.*, 2004 *apud* CANUTO *et al.*, 2012.

Tunali; Marshall; Royo (2000) comprovaram o efeito *in vitro* de quatro isolados de fungos endofíticos de centeio, no controle de patógenos de podridão da raiz. Os nematóides foram controlados pelo endófito *Fusarium oxysporum*, que produz metabólitos contra o nematóide *Meloidogyne incognita*. Os fungos endofíticos produzem alcalóides que podem apresentar atividade inseticida e nematicida, protegendo a planta destes patógenos. (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013).

Zhao *et al.*, (2014) e seus colaboradores, verificaram atividade antioxidante do extrato em acetatado fungo endofítico *Aspergillus fumigates*, obtido de *Pigeon pea*. O ensaio foi realizado através do método do DPPH, captura do radical hidroxila, capacidade de redução, peroxidação lipídica e atividade inibitória de xantina oxidase. Os autores encontraram no extrato analisado o composto antioxidante Luteolina (figura 10).

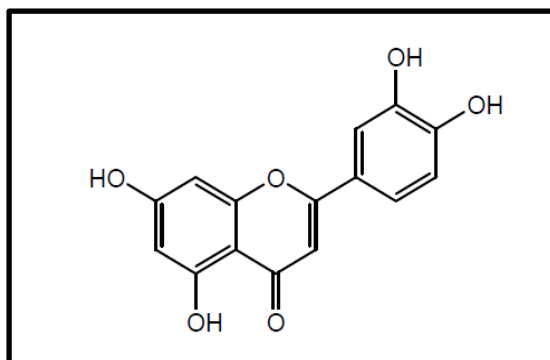


Figura 10: Luteolina.
FONTE: ZHAO *et al.*, 2014

Yuan *et al.*, (2014) isolaram e demonstraram atividade antioxidante, por DPPH, dos compostos Adenina (1), Adenosina (2) e Desoxiadenosina (3) (figura 11) do fungo endofítico *Penicillium sp.*, endofítico de *Ginkgo biloba*.

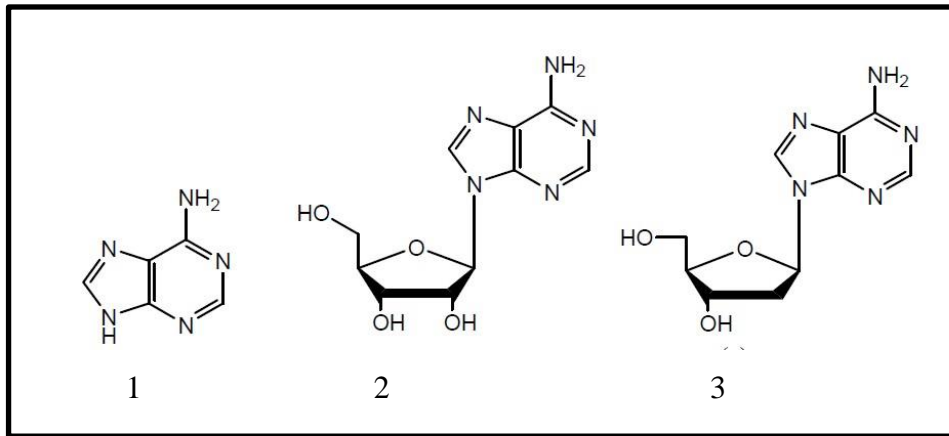


Figura 11: Adenina (1), Adenosina (2) e Desoxiadenosina (3).
FONTE: SILVA, 2014.

Mou *et al.*, (2013) e seus colaboradores conseguiram isolar a Palmarumicina C3 (figura 12), do endofítico *Berkleasmium sp.*, associado à *Dioscorea zingiberensis* e verificaram atividade antioxidante por DPPH.

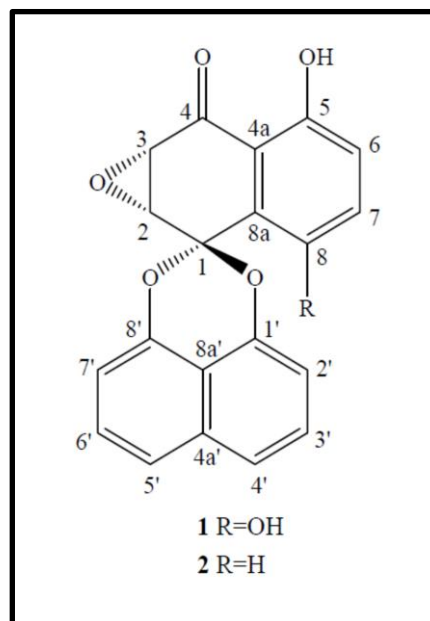


Figura 12: Palmarumicina C3 (1) e C2 (2).
FONTE: MOU *et al.*, 2013.

Wellensiek *et al.*,(2013), verificaram a capacidade de inibição de replicação do vírus HIV-1, em linfócitos T, de extratos em acetato de etila dos fungos *Phoma sp.*, *Alternaria tenuissima e Aspergillus sp.*, associados às plantas *Ephedra sp.*, *Quercus emoryi e Caesalpinia gilliesii*, respectivamente, encontrando resultados positivos.

É enorme a lista de produtos de interesse biotecnológico produzidos por endofíticos. Todas essas possibilidades só existem porque fungos endofíticos produzem metabólitos ativos que são utilizados tanto pelos fungos quanto pela planta hospedeira.

Como resultado direto dessas funções que os metabólitos secundários bioativos exercem na natureza, ou por assim dizer, na espécie hospedeira, eles podem apresentar aplicações na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL, 2002; DEBBAB *et al.*, 2009).

1.5. Agentes infecciosos

Todos os anos, milhões de pessoas vão à óbito por algumas estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Elas levam à intoxicação alimentar, reumática, salmonelose, diarreia e envenenamento (PUERTOA *et al.*, 2006). Dentre os fenômenos que estão definitivamente vinculados à emergência de resistência dessas bactérias, está o uso abusivo, indiscriminado e/ou inadequado de drogas antimicrobianas. Assim, as taxas de resistência estão diretamente relacionadas às características de consumo de antimicrobianos por uma comunidade ou região (WANNMACHER, 2004).

A busca de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA *et al.*, 2001). Das mais variadas bactérias que causam danos a saúde do indivíduo, podemos destacar quatro delas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, e leva este nome devido à pigmentação amarela de suas colônias (*aureus* = dourado). Os estafilococos ocorrem em grupos que se assemelham a cachos de uva. São anaeróbicos facultativos e crescem bem sob alta pressão osmótica e pouca umidade (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). São bactérias frequentemente encontradas em indivíduos saudáveis, mas que pode causar infecção em vários órgãos (TRABULSI *et al.*, 1999). São responsáveis por doenças com baixa morbidade e mortalidade, como por exemplo, foliculite e intoxicação alimentar, mas também por doenças severas e fatais. A *S. aureus* é diferenciada das outras espécies principalmente pela produção de coagulase (enzima que causa a coagulação do plasma por ativação da protrombina). Além disso, normalmente fermenta manitol e hemolisa o sangue, o que não ocorre em outras espécies (LEVINSON; JAWETZ, 2005). O *S. aureus* é o agente mais comum em infecções piogênicas. Estas infecções podem se localizar na pele ou em regiões mais profundas. Além disso, esta bactéria pode causar vários tipos de intoxicações, podendo ser encontradas em várias partes do corpo, como: fossas nasais, garganta, intestinos e pele (TRABULSI *et al.*, 1999). O habitat normal é na pele, especialmente nariz e períneo. Os antibióticos de escolha compreendem as penicilinas beta-lactamases (MIMS *et al.*, 1999).

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva e está principalmente associada as infecções hospitalares como implantes de próteses e infecções intravasculares, relacionadas a uma variedade de infecções pós-operatório (EIFF; PETERS; HEILMANN *et al.*, 2002). Além disso, são isoladas *S. epidermidis* nosocomiais frequentes que exibem resistência a múltiplas drogas, o que limita a quantidade de medicamentos terapêuticos (LIVERMORE, 2000).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa que possui forma de bastonete e tem por habitat o trato gastrointestinal dos seres humanos, porcos e outros animais.

(TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). São parte da flora normal do cólon em seres humanos e outros animais, mas pode ser patogênica dentro ou fora do trato gastrointestinal. Esta bactéria possui fímbrias ou pili, o que frequentemente são importantes para a sua aderência na superfície das mucosas do hospedeiro e as cepas diferentes podem ser móveis ou imóveis. (MIMS *et al.*, 1999; STROHL; ROUSE; FISHER, 2004). Podem entrar no corpo humano através de alimentos mal lavados e água contaminada. Ela pode afetar o corpo humano de várias formas, sendo uma delas causando diarreia. Seu nome se refere ao fato de ser encontrada no trato intestinal de humanos e outros animais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). São produtoras de toxinas que causam distúrbios gastrintestinais, denominado coletivamente de gastroenterite por *E. coli*. Podem ser encontradas em águas contaminadas, sendo responsável por 75% dos casos de pielonefrite (SANTIAGO *et al.*, 2005).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade (PELLEGRINO *et al.*, 2002; SAFDAR; HANDELSMNAN, MAKI, 2004). Uma das características desta bactéria é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). É uma bactéria oportunista que pode causar várias doenças. As infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras, podem resultar em bacteremias severas. Infecções urinárias, associada ao uso de cateter são frequentes. Podem causar ainda pneumonia hospitalar, infecções hospitalares do trato urinário, infecções da ferida operatória e infecções em pacientes recebendo quimioterapia para doenças neoplásicas ou antibioticoterapia (MIMS *et al.*, 1999; STROHL; ROUSE; FISHER, 2004). Normalmente habitam o solo, água e vegetais. Podem ser encontradas na pele e tem sido isolada das fezes e garganta de 3 a 5% dos indivíduos normais. Está amplamente distribuída em áreas úmidas do ambiente. *P. aeruginosa* é suscetível aos aminoglicosídeos, a algumas cefalosporinas e ao imipenem (MIMS *et al.*, 1999; STROHL; ROUSE; FISHER,

2004). Atualmente se posiciona entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, ficando atrás somente das bactérias do gênero *Staphylococcus* (SADER *et. al.* 2001). São capazes de crescer em água contendo traços de nutrientes, por exemplo, água da torneira, o que favorece sua persistência em ambientes hospitalares. A *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas cepacia* possuem uma acentuada capacidade de resistir a desinfetantes, o que aumenta sua incidência em ambientes hospitalares, podendo ser encontradas crescendo em soluções saponáceas contendo hexaclorofeno, em antissépticos e detergentes (LEVISON; JAWETZ, 2005).

A principal diferença entre as bactérias Gram - positivas e Gram- negativas esta na constituição da parede celular. Nas Gram- negativas, a parede celular está composta por uma camada de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente, lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo, sendo a membrana externa rica em lipídios, torna-se dessa maneira impermeável a substâncias hidrofílicas e o único meio de entrada são as proteínas transmembrânicas com função porina (VIGNOLI; SEIJA, 2007). As porinas são canais de proteínas hidrofílicas embutidas na membrana externa apenas de bactérias Gram-negativas e controlam o que passa para dentro e fora da célula com base no tamanho molecular (SCOTT, 2009).

As bactérias Gram-positivas não possuem essa barreira seletiva tão eficaz, pois possuem apenas uma camada externa de peptidoglicanos (SCHERRER 1971 *apud* CARVALHO *et al.*, 2013), tornando-as mais vulneráveis. O peptidoglicano pode ser dividido em duas regiões, um polímero de aminoaçúcares transversais, que consiste na união cíclica e repetitiva de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico mediada por ligações β 1-4, e uma fração de pentapeptídeo que está ligado covalentemente à molécula de ácido N-acetilmurâmico (VIGNOLI; SEIJA, 2007). Esta ligação é garantida pelas proteínas ligadoras de penicilina. Na presença de Penicilina, ocorre interferência na síntese do

peptidoglicano, levando a um grande afluxo de água do meio intracelular para o meio externo lisando a célula bacteriana (SCOTT, 2009).

1.6. Atividade antimicrobiana de extratos e substâncias puras de fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são frequentes fontes de produtos naturais que podem agir como antibióticos, inibindo ou matando uma variedade de agentes causadores de doenças nocivas, como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (STROBEL *et al.*, 2003 *apud* SPECIAN *et al.*, 2014). Abaixo estão alguns trabalhos que relatam a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos frente a diferentes tipos de microrganismos.

Fernandes *et al.*, (2009) conseguiram isolar 22 linhagens de fungos endofíticos a partir de folhas de *Coffea arabica* L., onde todos os extratos brutos obtidos em diclorometano, conseguiram inibir pelo menos um dos microrganismos estudados. Os extratos de *Alternaria alternata* apresentaram um melhor rendimento, inibiram três microrganismos patogênicos, com uma zona de inibição de 16 mm para *Candida albicans* e 27 mm para *Staphylococcus aureus*.

Ramasamy *et al.*, (2010) isolaram 348 fungos endofíticos de 24 plantas medicinais da Malásia e obtiveram seus extratos brutos em acetato e etila, verificando que 16% foram eficientes contra *Bacillus subtilis* e entre 1 a 2% inibiram *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, com áreas de inibição variando de 8 a 24 mm.

Também, foram verificadas atividade antifúngica de extratos de fungos endofíticos de *Myrcia guianensis*. Os extratos apresentaram efeito inibitório frente às cepas patogênicas *Candida albicans* e *Penicillium avellaneum*. Os metabolitos do fungo endofítico do gênero *Blakeslea* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Penicillium avellaneum*, sendo o halo de inibição obtido comparável à observada na presença

de Cetoconazol (BANHOS, 2011).

Hormazabal e Piontelli (2009), mostraram que entre os fungos endofíticos isolados das plantas Gimnospermas nativas do Chile, o extrato bruto do micélio, obtido em aceto de etila, produzido pelo fungo *Curvularia protuberata* teve o melhor efeito sobre o *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, com zonas de inibição de crescimento de 12,9 e 16 mm, respectivamente.

Souza *et al.*, (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana dos caldos obtidos de fungos endofíticos isolados das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*. Dos metabólitos obtidos de 79 linhagens de fungos endofíticos selecionadas para os ensaios *in vitro*, 19 (24%) apresentaram ação contra um ou mais microrganismos testados (*Aspergillus flavus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Trichoderma sp.*).

Wang *et al.*, (2012) e colaboradores, verificaram atividade antimicrobiana do fungo endofítico *Phoma sp.*, obtido de *Arisaema erubescens*. O endofítico produziu um novo derivado de alfa-tetralona, o (3S)-3,6,7-trihidroxi-alfa-tetralona (figura 13). A atividade foi testada contra os fungos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*.

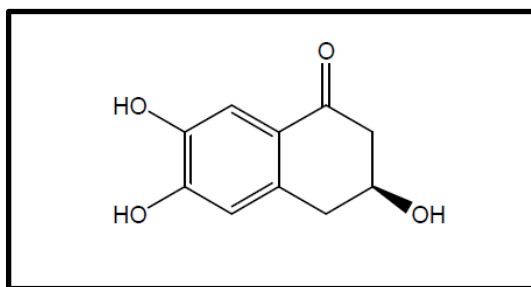


Figura 13: (3S)-3,6,7-trihidroxi-alfa-tetralona.
FONTE: WANG *et al.*,2012.

Estudos recentes, reportaram atividade antimicrobiana dos metabólitos ergosta-5,7,22-trien-3-ol e 2,3-dihidro-5-hidroxi-alfa, alfa-dimetil-2-benzofuranmetanol (Figura 14 A, B), isolados do fungo *Gliomastix murorum*, da planta medicinal *Paris polyphylla var.*

yunnanensis, contra as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus haemolyticus*, e também contra o fungo patogênico *Magnaporthe oryzae*. (SILVA, 2014).

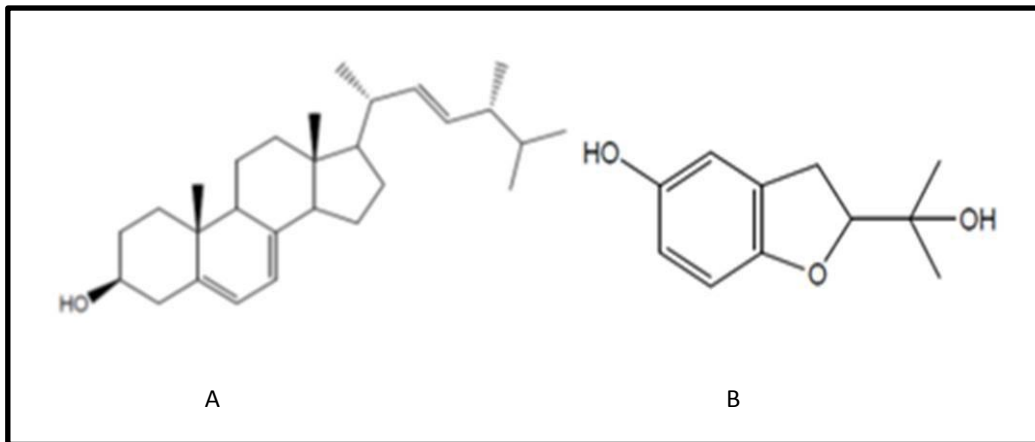


Figura 14: A) ergosta-5,7, 22-trien-3-ol ; b) 2, 3-dihidro-5-hidroxi-alfa, alfa-dimetil-2-benzofuranmetanol.
 FONTE: SILVA, 2014

Um composto denominado de Botrallin (figura 15), obtido do endofítico *Hyalodendriella sp.*, isolado de *Populus deltoides*, demonstrou atividade antimicrobiana contra os patógenos *Bacillus subtilis*, *Magnaporthe oryzae* e *Botryosphaeria dothidea* (ZHONG *et al.*, 2011 *apud* SILVA, 2104).

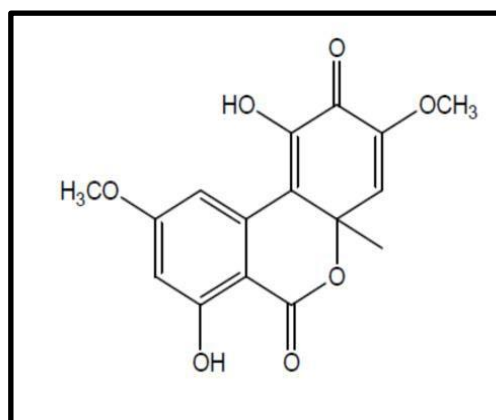


Figura 15: Botrallin.
 FONTE: SILVA, 2104

Outro exemplo são os fungos endofíticos do gênero *Phomopsis* que são encontrados na maioria das plantas, e que possui como metabólitos ativos o Dicerandrol A, B, e C

(figura 16), isolado a partir de *Phomopsis longicolla* obtido da planta *Dicerandra frutescens*. Estas substâncias apresentaram zonas de inibição de 11.0; 9.5 e 8.0 milímetros, respectivamente, contra *Bacillus subtilis* e 10.8; 9.5 e 7.0 milímetros, respectivamente, contra *Staphylococcus aureus*, quando testado em 300µg/disco (DESHMUKH *et al.*, 2015).

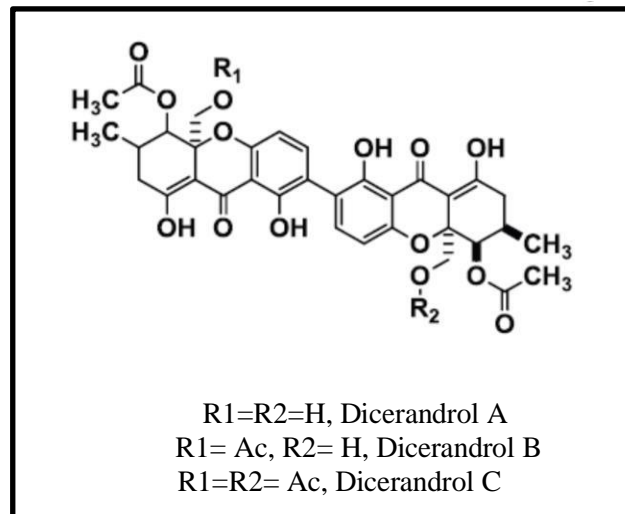


Figura 16: Dicerandrol A, B e C.
 FONTE: DESHMUKH *et al.*, 2015.

Através da literatura evidencia-se a importância dos fungos endofíticos e sua colaboração para descobertas de novas moléculas bioativas. A vantagem da prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes, são que os microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, e não geram prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas de áreas naturais (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Obter e avaliar os extratos brutos de 29 fungos endofíticos isolados das folhas e caules da espécie de *Oryctanthus alveolatus* frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos brutos, utilizando como solvente acetato de etila;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos através do método de difusão em ágar;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos;

3. METODOLOGIA

3.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos.

Amostras das folhas e caules da espécie *Oryctanthus alveolatus* foram coletadas no campus do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET, em duas etapas, uma no mês março e outra em maio de 2012, eles foram retirados de diferentes regiões da planta acondicionadas em sacos de plásticos, e em seguida levadas para o laboratório e lavados com água corrente.

Para o isolamento dos fungos endofíticos foi utilizado uma adaptação da metodologia descrita por MAIER (1997). Os caules coletados após serem lavados, foram imersos na sequência em um béquer contendo etanol 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 1% (5 minutos) e novamente em etanol 70% (3 minutos), seguida de dupla lavagem em água estéril (5 minutos cada). As folhas foram imersas em etanol 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 1% (3 minutos) e novamente em etanol 70% (1 minuto), seguida de dupla lavagem em água estéril (5 minutos cada). A segunda água de lavagem, tanto dos caules quanto das folhas foram plaqueadas para verificar a presença de contaminantes. Com o uso de um bisturi retirou-se fragmentos das folhas e caules medindo aproximadamente 1 cm quadrado. Os fragmentos foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura sólida (BDA – batata dextrose ágar) anteriormente preparado com antibiótico (Gentamicina) para evitar o crescimento de contaminantes. As placas foram incubadas por 24 a 72 horas em estufa BOD e seu crescimento foi monitorado a olho nu. Conforme os fungos cresciam nas placas eram feitos repiques das colônias de modo a obter uma cultura pura. Após isolamento das colônias, os fungos endofíticos foram preservados em tubos inclinados (*slant*) e água destilada (*Castellani*) (figura 17).



Figura 17: Preservação de alguns dos fungos em *Castellani* e *slant*.

FONTE: Ribeiro, S.F.L.

3.2. Preparo dos Extratos Brutos

Dos 86 fungos isolados da espécie *Oryctanthus alveolatus* utilizou-se 29 fungos, os quais se apresentaram ativos. Os isolados trabalhados foram codificados da seguinte forma: Foa (003, 007, 008, 018, 024, 025, 027, 031, 034, 036, 038) e Coa (002, 007, 008, 009a, 009b, 014, 016, 019, 020b, 023, 024, 025, 026a, 026b, 028, 029a, 029b, 030), onde Foa corresponde a Folhas de *Oryctanthus alveolatus* e Coa, Caules de *Oryctanthus alveolatus* (figura 17).

Para o preparo dos extratos, cada fungo selecionado foi repicado para duas placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), e incubados a 26°C na BOD, por sete ou dez dias de acordo com o período de crescimento de cada fungo, metodologia adaptada de Oliveira *et al.*, 2011.

Após este período, cada fungo foi repicado para 4 Erlenmeyers de 500 mL cada, contendo 200 mL do meio de cultura (Meio de Batata e Dextrose - MBD), totalizando 800 mL de cultivo por fungo. O crescimento foi realizado de modo estático em temperatura ambiente por um período de 20 dias.

Após o período de crescimento foi adicionado em cada Erlenmeyer 200 mL de acetato de etila, e após 24 horas o caldo foi separado do micélio por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila. A fração em acetato de etila foi colocada no evaporador rotatório para evaporação do solvente obtendo-se os extratos brutos (figura 18).



Figura 18: Extratos brutos em acetato de etila dos fungos endofíticos da espécie *Oryctanthus alveolatus*.
 FONTE: Ribeiro, S.F.L.

3.3. Ensaio Antimicrobianos

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas cepas-padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) (OPLUSTIL *et al.*, 2004) sendo Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) através da parceria com a professora Ilia Gilmará (ICET- UFAM).

O teste para determinação da atividade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em ágar, utilizando discos contendo o extrato bruto, segundo descrição original de BAUER *et al.*, (1966) e atualizações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2009).

Foi preparado o meio Mueller Hinton Ágar (38g/L) desidratado e reconstituído, utilizando água deionizada como solvente, de acordo com as especificações do fabricante. O meio liquefeito foi vertido para placas de Petri esterilizadas de 150 x 10 mm, até atingirem uma espessura de 4 mm. Uma placa foi colocada em estufa a 36°C para controle de esterilidade e as demais, armazenadas em geladeira (2–8 °C) até o momento do uso (BAUER *et al.*, 1966).

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, colônias bacterianas provenientes de culturas puras de 24 horas foram suspensas em tubos de ensaio contendo 7 mL de solução salina estéril e, então, homogeneizadas. A suspensão foi ajustada por meio

turbidimétrico através da escala MacFarland, a uma concentração de 1×10^6 UFC/mL (BAUER *et al.*, 1966).

Após a homogeneização do inóculo, um swab alginatado estéril foi embebido na solução bacteriana e em seguida, comprimido contra a parede do tubo. O inóculo bacteriano ficou distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, e deixado em repouso em temperatura ambiente, por aproximadamente cinco minutos (BAUER *et al.*, 1966).

Os 29 extratos brutos obtidos foram testados inicialmente na concentração de $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. As bactérias utilizadas foram: Gram- positivas: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, como controle positivo foi utilizado ciprofloxacina a $5 \mu\text{g}$. Para as bactérias Gram- negativas: *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foi utilizado discos de amicacina a $30 \mu\text{g}$.

Os discos de antibiótico foram colocados sobre a superfície da placa contendo as bactérias com o auxílio de uma pinça esterelizada. Posteriormente, foi colocado $10 \mu\text{L}$ de extrato liquefeito em discos de papel filtro com aproximadamente 6mm de diâmetro. Em outro disco de papel foi colocado $10 \mu\text{L}$ de DMSO como controle negativo. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C , por 24 horas. Atribuiu-se o termo ativo aos discos de papel contendo extratos brutos que apresentaram qualquer halo de inibição do crescimento bacteriano, “área sem crescimento bacteriano detectável a olho nu” (NCCLS, 2003). As zonas de inibição foram registradas em mm de diâmetro com o auxílio de um paquímetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foi considerada a média dos diâmetros dos respectivos halos de inibição (BAUER *et al.*, 1966).

Como os extratos não apresentaram resultados positivos no teste antimicrobiano na concentração de $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, estes, foram novamente testados na concentração de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Essa concentração foi escolhida através de dados encontrados na literatura.

Dos 29 extratos brutos testados, três Coa 007, Coa 009a e Coa 014 apresentaram

resultados positivo. Os três extratos ativos foram testados em concentrações diferentes para determinar a menor concentração inibitória, utilizando os seguintes valores de concentração: 200, 500, 700, 800, 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A figura 19 ilustra disposição dos discos utilizados no ensaio antimicrobiano para um extrato bruto.

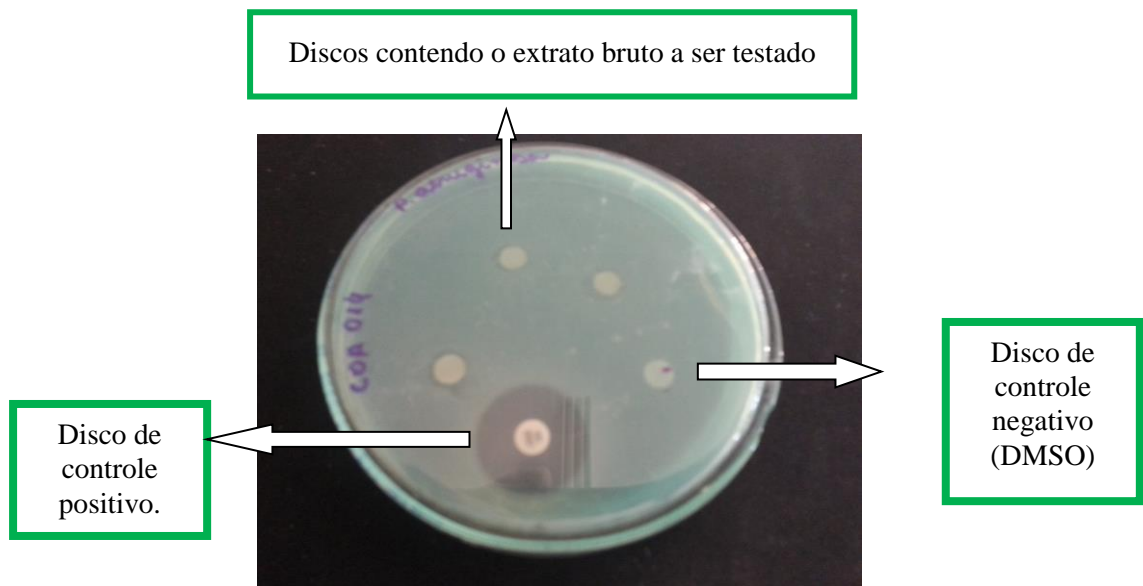


Figura 19: Disposição dos discos nas placas.
FONTE: RIBEIRO, S.F.L

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Dos 86 fungos isolados dos caules e folhas de *Oryctanthus alveolatus*, 57 fungos não responderam ao estímulo dado para se desenvolverem, como exposição a altas temperaturas. Apenas 29, responderam a este estímulo. Destes, 11 fungos foram isolados das folhas e 18 dos caules da *Oryctanthus alveolatus*. Os 29 fungos endofíticos foram cultivados em MBD e extraídos com acetato de etila, um solvente de média polaridade muito utilizado nestes estudos, pois possui baixo custo quando comparado com outros solventes de polaridade próxima, baixa toxicidade e baixo ponto de ebulição quando colocado em vácuo. A partir dos valores obtidos para os extratos, pode-se concluir que o rendimento foi suficiente para a realização dos ensaios biológicos, já que foram cultivados apenas 800 mL de caldo.

Posteriormente os extratos foram testados na concentração de $0,5 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$, valor este próximo a concentração dos antibióticos utilizados como controle positivo. Na ausência de atividade nesta concentração, os extratos foram novamente testados na concentração $1000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, média obtida dos valores encontrado na literatura.

Os ensaios foram feitos em triplicata, e dos vinte e nove extratos testados, apenas três apresentaram atividade nos ensaios antimicrobianos na concentração de $1000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ são eles: Coa 007, Coa 009a e Coa 014. Nota-se que apenas os extratos obtidos dos fungos isolados do caule apresentaram atividade frente a duas ou mais bactérias. Provavelmente as possíveis razões para este resultado, se deve a diferença química ou tecidual das estruturas internas dos órgãos vegetais da planta encontradas pelo fungo (RODRIGUES, 1994 *apud* SILVA 2014). Sugere-se baseado nos artigos de Nascimento *et al.*, (2015) e Sebastianes *et al.*, (2013), que o caule, por ser o órgão mais vascularizado do vegetal, permite uma maior obtenção de nutrientes, o que favorece o desenvolvimentos de outros microrganismos como bactérias. A tabela 01, demonstra as massas dos extratos brutos dos 29 fungos endofíticos selecionados, bem como o material de origem e o resultado dos testes antimicrobianos.

Códigos dos extratos fúngicos	Material de origem	Massa (g)	Bactérias testadas			
			<i>E.coli</i> Gram-negativa	<i>P.aeruginosa</i> Gram-negativa	<i>S. aureus</i> Gram-positiva	<i>S.epidermidis</i> Gram-positiva
Foa 003	Folha	0,357	-	-	-	-
Foa 007	Folha	0,3623	-	-	-	-
Foa 008	Folha	0,3633	-	-	-	-
Foa 018	Folha	0,2485	-	-	-	-
Foa 024	Folha	0,3795	-	-	-	-
Foa 025	Folha	0,3385	-	-	-	-
Foa 027	Folha	0,4050	-	-	-	-
Foa 031	Folha	0,3398	-	-	-	-
Foa 034	Folha	0,1294	-	-	-	-
Foa 036	Folha	0,2586	-	-	-	-
Foa 038	Folha	0,2883	-	-	-	-
Coa 002	Caule	0,2345	-	-	-	-
Coa 007	Caule	0,4447	+	+	+	-
Coa 008	Caule	0,1007	-	-	-	-
Coa 009a	Caule	0,1077	+	-	+	-
Coa 009b	Caule	0,0327	-	-	-	-
Coa 014	Caule	0,092	+	+	+	-
Coa 016	Caule	0,3097	-	-	-	-
Coa 019	Caule	0,1103	-	-	-	-
Coa 020b	Caule	0,0841	-	-	-	-
Coa 023	Caule	0,1069	-	-	-	-
Coa 024	Caule	0,2873	-	-	-	-
Coa 025	Caule	0,099	-	-	-	-
Coa 026a	Caule	0,0782	-	-	-	-
Coa 026b	Caule	0,0924	-	-	-	-
Coa 028	Caule	0,1663	-	-	-	-
Coa 029a	Caule	0,1052	-	-	-	-
Coa 029b	Caule	0,1469	-	-	-	-
Coa 030	Caule	0,0229	-	-	-	-

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

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

Tabela 01: Código, material de origem, massas dos fungos endofíticos e resultados dos testes antimicrobiano.

FONTE: RIBEIRO, S.F.L.

Para a bactéria Gram- negativa *E.coli* os extratos Coa 007, Coa 009a e Coa 014 apresentara atividade inibitória e para a bactéria também Gram- negativa *P. aeruginosa*, somente o extrato proveniente do isolado Coa 009a não apresentou atividade inibitória. Para a bactéria Gram- positiva *S. aureus* todos os extratos apresentaram atividade inibitória. Nenhum desses extratos mostraram atividade inibitória frente à bactéria Gram- positiva *S.*

epidermidis. A maior susceptibilidade dos extratos nas bactérias Gram-negativas, pode estar relacionada com as diferenças morfológicas existentes entre elas e as bactérias Gram-positivas. Em especial, as Gram-negativas possuem uma camada externa fosfolipídica, tornando-a impermeável a solutos lipofílicos, enquanto as porinas formam uma barreira seletiva contra solutos hidrofílicos (NIKAIDO *et al.*, 1985 *apud* CARVALHO *et al.*, 2013). As bactérias Gram-negativas apresentaram maior sensibilidade, indicando que os extratos brutos possuem ação seletiva frente à constituição química da parede celular bacteriana. Sugerindo que talvez essa ação positiva se deva a polaridade do extrato.

A CIM foi realizada com os três extratos ativos nos testes por difusão em ágar nas seguintes concentrações: 200, 500, 700, 800 e 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 02). De modo geral, as concentrações de 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, se mostraram ativas nos ensaios realizados.

Extratos dos fungos	0,5 $\mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Coa 007	Não	Não	Não	Não	Não	Sim <i>E. coli</i> <i>P.aeruginosa</i>	Sim <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>
Coa 009a	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
Coa 014	Não	Não	Não	Não	Não	Sim <i>E. coli</i>	Sim <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>

Tabela 02: Resultados da Concentração Inibitória Mínima.

FONTE: RIBEIRO, S. F. L.

O extrato Coa 007 apresentou atividade antimicrobiana para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* no valor de 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e atividade frente a bactéria *S. aureus* na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato Coa 009a na concentração de 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não apresentou nenhuma atividade inibitória frente as bactérias testadas. O extrato Coa 014 apresentou atividade

inibitória para a bactéria *E. coli* no valor de 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para as bactérias *P. aeruginosa* e *S.aureus* no valor de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Análise estatística utilizando-se o teste de Tukey (Tabela 03) para contraste das médias dos halos, evidenciou não haver diferença estatística ao nível de 1% de significância, demonstradas pelas letras **a**, **b**, **c** e **d**, para os extratos testados.

Assim o extrato Coa 007 não apresentou diferença significativa de suas atividades antimicrobianas, e age de maneira semelhante frente as cepas bacterianas testadas, já que para todas as bactérias testadas, foram definidas a mesma letra; **a**. Da mesma maneira, o extrato Coa 009a age diante das bactérias *S. aureus* e *E. coli*. O extrato Coa 014 mostrou haver diferença estatística entre as médias dos halos, onde o maior halo produzido ocorreu no teste realizado com a bactéria *E. coli*, e que foi visualizado pelas diferentes letras atribuídas pelo teste. Para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* não houve diferença significativa, demonstradas pela letra **a**, mas para as bactérias *S. aureus* e *E. coli* houve uma diferença evidenciado pelas letras **a** e **b**, e entre *E. coli* e *P. aeruginosa* ocorreu diferença significativa demonstrado pelas letras **c** e **d**.

Extratos*	COA007 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	COA007 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	COA009 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	COA009 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	COA 014 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	COA 014 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Bactérias						
<i>S. aureus</i>	8,3 \pm 2,8 ^a	-	7,7 \pm 1,2 ^a	-	6 \pm 0,0 ^a	-
<i>E. coli</i>	6,7 \pm 1,1 ^a	6,6 \pm 0,4 ^a	7 \pm 0,0 ^a	-	9 \pm 0,0 ^{b,c}	7,02 \pm 0,50
<i>P. aeruginosa</i>	7 \pm 0,0 ^a	7,2 \pm 0,16 ^a	-	-	8,3 \pm 0,57 ^{a,d}	-

*Média dos halos (média \pm desvio padrão) nas diferentes concentrações dos extratos. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância ($P>0,01$).
Tabela 03: Análise estatística dos extratos.

FONTE: RIBEIRO, S.F.L.

4.1. Perfis Químicos dos Extratos.

O ensaio de CCDC foi realizado para comparar o perfil cromatográfico dos extratos ativos. Baseado na análise do perfil químico obtido através da CCDC, foi possível observar que todos os extratos brutos, possuem perfis químicos diferentes, ou seja, podem apresentar metabólitos secundários diferentes. O sistema de solvente utilizado foi acetato de etila e n-hexano (8:2). A solução reveladora utilizada foi anisaldeído/ ácido sulfúrico, e esta solução é usada para visualizar esteróides, saponinas, fenóis entre outros. Assim é possível sugerir que os extratos obtidos possuam um, ou mais desses metabólitos secundários.

Como a sílica retém substâncias polares, pela corrida cromatográfica podemos sugerir que o Coa 014 é o mais polar, pois foi o extrato que apresentou menor valor de R_f . Os extratos Coa 007 e Coa 009a são mais apolares, já que os mesmos ficaram menos retidos na sílica, obtendo um valor de R_f , maior quando comparado ao Coa014 (figura20).

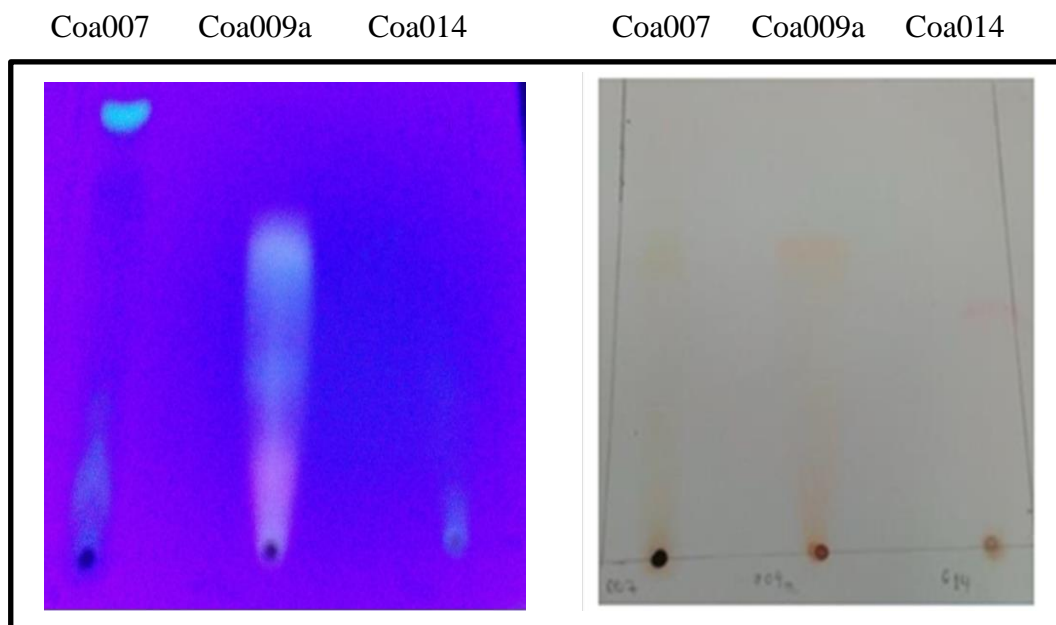


Figura 20: Corrida cromatográfica dos extratos fúngicos que apresentaram atividade inibitória, bandas de absorção UV 365nm.

FONTE: RIBEIRO, S. F. L.

4.2. Caracterização dos fungos endofíticos por macromorfologia.

Os fungos Coa 007 e Coa 014 apresentaram característica macromorfológica inicialmente parecidas: o Coa 007 possui coloração branca, com textura algodonosa, opaca, na parte reversa coloração bege – rosa, com aspecto de colônia apiculadas (figura 21).

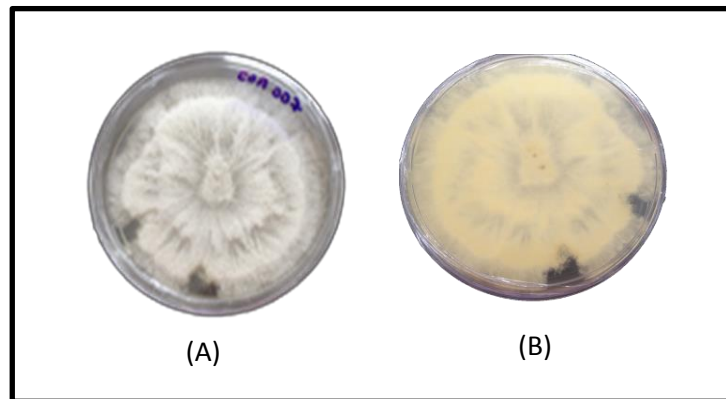


Figura 21: Isolado Coa 007 mor fologia micelial (A); morfologia reversa (B).
 FONTE: RIBEIRO, S.F.L.

A cepa Coa 014 possui coloração branca, algodonosa e opaca, com pontos de pigmentação disperso ao longo da colônia, parte reversa da colônia têm a cor bege com alguns pontos de pigmentação rosa, apresenta relevo com aspecto cerebriiformes (figura 22).

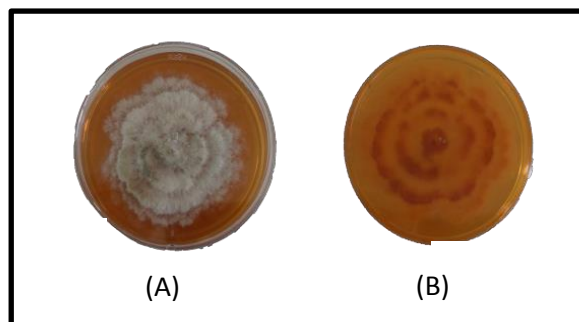


Figura 22: Isolado Coa 014 morfologia micelial (A); morfologia reversa (B).
 FONTE: RIBEIRO, S.F.L.

O fungo Coa 009a apresentou como característica macromorfológica das colônias inicialmente de coloração preta, tornando-se negro-acinzentado, algodonosa, relevo com aspecto cerebriiformes. O reverso da colônia é negro (figura 23).

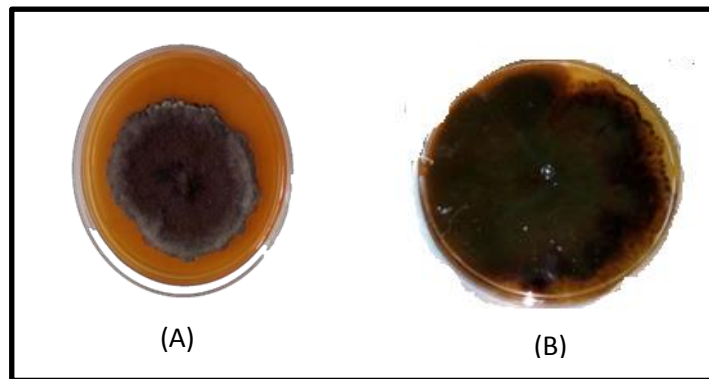


Figura 23: Isolado Coa 009a morfologia micelial (A); morfologia reversa (B).
FONTE: RIBEIRO, S.F.L.

5. CONCLUSÕES

O trabalho foi desenvolvido em um período de dois anos e propiciou a obtenção de vinte e nove extratos brutos obtidos a partir do cultivo de fungos endofíticos. Dos vinte e nove extratos brutos estudados, três demonstraram ser ativos frente à bactérias patogênicas. No entanto, todos os extratos estudados neste trabalho, merecem destaque, por serem os primeiros obtidos a partir de fungos endofíticos isolados da espécie *Oryctanthus alveolatus*. Os três extratos ativos Coa 007, Coa 009a e Coa 014, apresentaram perfis químicos diferentes, evidenciados pela análise da CCDC, e características morfológicas também diferentes, visualizados através da análise de suas colônias.

Assim, os resultados obtidos mostraram que os extratos brutos dos fungos endofíticos da *O. alveolatus* possuem potencial atividade antimicrobiana e que novos estudos são necessários para isolar e caracterizar os compostos bioativos encontrados nestes extratos.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALEKSHUN, M. N; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v.128, p. 1037–1050, 2007.
- ALY, A. H; DEBBAD, A; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.90, p.1829 – 1845, 2011.
- ALVES, L. F. A, et al. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviários comerciais de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p.507-510 , 2005.
- ARNOLD, A. E, et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p.15649–15654, 2003.
- ARAÚJO, F. C. A. **Atlas de auxílio às aulas práticas em micologia**. Cadastro PROAC n. ° 487. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Niterói, p.16-25, 2009.
- ARAÚJO, W. L, et al. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, p.167. 2010
- AZEVEDO, J. L; SERAFINI, L.A; BARROS, N. M. Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. **Agropecuária**, Guaíba, p. 463, 2001.
- BANHOS, E. F. **Atividade antimicrobiana de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae) e de seus fungos endofíticos**. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.
- BAUER, A. W; KIRBY, W. M; SHERRIS, J. C; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n. 4, p. 493–496, 1966.
- BERNSTEIN, M. E; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v.55, p. 644-653, 1977.
- BONONI, V.L.R; GRANDI R.A.P. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos noções Básicas de Taxonomia e Aplicações Biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, São Paulo, 1999.
- CAIRES, C. S; UCHÔA-FERNANDES, M. A. Frugivoria de larvas de *Neosilba McAlpine* (Diptera, Lonchaeidae) sobre *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Santalales, Loranthaceae) no sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.53, n. 2, p. 272-277, 2009.

- CANUTO, K. M; CANUTO, T. H. S. R; OLIVEIRA, F. S. A; GONÇALVES, F. J. T. Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. **Agroindústria Tropical**. Fortaleza, 2012
- CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v 56, n. 24, p. 3034-3043, 1978.
- CARVALLO, J. D, et al. Mechanisms of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of Opr -Mover producing strains in a French multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.1039-1043, 2002.
- CARVALHO F.S, et al. Estudo in vitro da atividade antimicrobiana *Aristolochia Galeata* Mart. & Zucc. (Aristolochiaceae) frente as bactérias gram positivas e gram negativas. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n. 2, p. 42-44, 2013.
- CAZETTA, E; GALETTI, M. Ecologia das ervas-de-passarinho. **Ciências Hoje**, v. 94, p.72-74, 2003.
- CERQUEIRA, F. M; MEDEIROS, M. H.G; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, 441-449, 2007
- CHAPLA, V. M; BIASETTO, C. R; ARAÚJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual Química**, v. 5, n.3, p. 421-437, 2013.
- COBA, P; TIVI, L. M; VIDARI, G. Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. **La Granja**, v. 11, n.1, p. 22-30, 2010.
- CONCEIÇÃO, G. M; RUGGIERI, A. C; BARBOSA, F. C; ARAUJO, M. F. V. Erva- de - Passarinho: Substratos Vegetais, Uso e Aplicações na Medicina Popular, Caxias, Maranhão. **Revista Scientia Plena**, v.6, 2010.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology**. Reviews, v. 12, p.564–82, 1999.
- DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology**. Reviews, v.74, p.417-433, 2010.
- DEBBAB et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. **Journal of Natural Products**, v.72, n.4, p.626-631, 2009.
- DESHMUKH, S.K; VEREKAR, S.A; BHAVE, S.V. Endophytic fungi. A reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p. 1- 43, 2015.
- EIFF, C.V; PETERS, G; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.677– 685, 2002.
- ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010.

FERNANDES, M. R, et al. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Braz. Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.4, p.677-686, 2009.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. **Revista Fitos Eletrônica**, v.2, n.1, p.73-79, 2006.

FISHER, P. J; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, v.120, n. 1, p.137–143, 1992.

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

GOVINDAPPA, M, et al. Phytochemical Screening, Antimicrobial and in vitro Anti-inflammatory Activity of Endophytic Extracts from *Loranthus* sp. **Pharmacognosy Journal** , v.3, 2011.

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.

HARRIS, R.W. **Arboriculture**: integrated management of landscape trees, shrubs and vines. New Jersey: Prentice-hall, 1992.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies In Mycology**, v. 50, n. , p. 9-18, 2004.

HORMAZABAL, E; PIONTELLI, E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.813-819, 2009.

JALGAONWALA, R. B; MOHITE, B.V; MAHAJAN, R.T.J. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal Microbiology Biotechnology Research**, 2011.

KHARWAR, R. N, et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, 2011.

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

KUSARI, S; ZUHLKE, S; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal Natural Product**, v.72, p. 2-7. 43, 2009.

LEAL, L; BUJOKAS, W.M; BIONDI, D. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba, PR. **Floresta**, v. 36, n.3, p.323-330, 2006.

LEVINSON, W; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**, trad. José Procópio M. Senna- 7ª ed. Porto Alegre. Artmed, 2005.

LI, H, et al. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*. **Journal of natural products**, v. 74, n. 5, p.1230–1235, 2011.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus*. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.16 (Suppl.1), p.S3–S10, 2000.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**: erva-de-passarinho (*Struthanthus concinnus* Mart. Loranthaceae). Nova Odessa: Editora Plantarum Ltda, p.302,1991.

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

LUZ, J. S; SILVA, R. L. O; SILVEIRA, E. B; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 128- 134, 2006.

MAIER, W. Accumulation of sesquiterpenoid Cyclohexenone derivatives induced by *Arbuscular Mycorrhizal* fungus in members of the Poaceae. **Planta**, v. 202, 36- 42, 1997.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 127p. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MARTINS, L.G.S; VALE L.S; LAINETTI, R; PEREIRA, N.A. Um estudo sobre a toxidade da erva-de-passarinho (*Struthanthus marginatus*, Loranthaceae), parasitando trombeteira (*Datura suaveolens*, Solonaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.87, n. 2, p. 63-64, 2005.

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

MIMS, C. et al. **Microbiologia Médica**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1999.

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

MONTEIRO, J. M. M, et al. Taninos: uma abordagem Química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.892-896, 2005.

MORAIS, J. F; YOSHIMOTO, M; RHODEN, S. A; PAMPHILE, J.A. Bioprospecção de microrganismo produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ**. Review, v.17, n.1, p. 27-34, 2014.

MOU, Y, et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities and Effect of 1-Hexadecene Addition on Palmarumycin C2 and C3 Yields in Liquid Culture of Endophytic Fungus

Berkleasium sp. Dzf12. **Molecules**, v. 18, n. 12, p.15587–15599, 2013.

MUELLER, G.M; BILLS, G.F; FOSTER, M.S. **Biodiversity of Fungi** – Inventory and monitoring methods. In: Stone J.K, Polishook J.D.; White J. F. J. *Endophytic Fungi*. Elsevier Academic Press; 2004.

NASCIMENTO, T.L; OKI, Y; LIMA, D.M.M; ALMEIDA-CORTEZ, J.S; FERNANDES G.W; SOUZA-MOTTA, C.M. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal ecology**, v.14, p.79-86, 2015.

NARISAWA, K; KAWAMATA, H; CURRAH, R. S; HASHIBA, T. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p. 103–109, 2002.

NIKAIDO, H; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological reviews**, v. 49, n. 1, p.1, 1985.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, nineteenth informational supplement**. Approved Standard M100-S19 National Committee for Clinical Standards. Wayne, P.A, January. 2009.

OLIVEIRA, J. C. **Micologia Médica**. Control lab - Rio de Janeiro, p. 21, 1999.

OLIVEIRA, C.M ; SILVA, G. H ; REGASINI, L. O ; FLAUSINO JUNIOR, O ; LOPEZ, S. N; ABISSI, B. M; BERLINCK, R. G. S; SETTE, L. D; BONUGLI-SANTOS, R. C; RODRIGUES, A; BOLZANI, V. S; ARAUJO, A. R. Xylarenones C–E from an Endophytic Fungus Isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v.74, p. 1353-1357, 2011.

OPLUSTIL. C. P; ZOCCOLI, C. M; TOBOOUTI, N. R; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo. Sarvier, 2004.

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

PELLEGRINO, F. L, et al. Occurrence of a multi- drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p. 2420-2424, 2002.

PENNA,C, et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal Ethnopharmacology**, v.77, p. 37- 40, 2001.

PETRINI, O; SIEBER, T. N; TOTI, L; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, .v. 1, p.185-196, 1992.

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

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de**

- produtos Farmacêuticos**, Correlatos de Cosméticos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, p.325, 2003.
- PUERTO A, S.A. G. J; FERNANDEZA, L. D. J; CASTILHOB, M. J. S; PINOA, P. G. Naguloa Diagnostic. **Microbiology and Infectious Disease**, v.54, p.135–139, 2006.
- QIN, S, et al. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Environmental microbiology reports**, v. 4, n. 5, p. 522–31, 2012.
- RAMASAMY, K, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. **Phytotherapy Research**, v.24, p.640-643, 2010.
- RUBINI, M.R, et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of 'Witches' Broom Disease. **International Journal Biological Science**, v.1, p.24–33, 2005.
- SADER H.S, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Brazilian. **Journal of Infectious Diseases**, v.5, p.200-214, 2001.
- SAFDAR, N; HANDELSMNAN, J; MAKI D. G. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram- negative bacteraemia. A meta- analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 2004.
- SALGADO, E. R. Las ramas floridas del bosque. Experiencias em el manejo de plantas medicinales amazônicas. **Instituto de investigaciones de la Amazonía peruana**, 149, 2007.
- SANTIAGO, M. L; LINARES, S; SANCHEZ E; RODRIGUEZ-SANOJA, R. Functional characteristics of the starch-binding domain of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase. **Biologia**, v. 60, p. 111-114, 2005.
- SCHERRER, R; GERHARDT, P. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. **Journal of Bacteriology**, v. 107, n. 3, 718-735, 1971.
- SCOTT, G. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 37, p. 551-556, 2009.
- SCUDELLER, V. V; VEIGA, J. B; ARAÚJO, J, L. H. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal nas comunidades São João do Tupé e Central (Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé). **Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central**, UEA Edições, v. 2, Manaus, 2009.
- SCHULZ, B, et al. 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. **Mycology Research**, 2005.
- SEBASTIANES, F. L. S; ROMA-DUMARESQ, A.S; LACAVALA, P.T; HARAKAVA, R; AZEVEDO, J. L; MELO, I. S; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current genetics**, v. 59, p.153–166, 2013.

- 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 Botânica Brasileira**, v.20, p.649–655, 2006.
- SILVA, I.L.S.S. Efeito de nutrientes combinados com indutores de resistência na proteção contra a vassoura-de-bruxa no cacauzeiro. **Ciência Agrotécnica**, 2008. v.32, 61-67, 2008.
- SILVA, F. N. S; CONCEIÇÃO, G. M; ALMEIDA, D. B. Ocorrência da família Loranthaceae no município de Caxias, Maranhão, Brasil. **Cadernos de Geociências**, v.7, n. 2, p.131 - 135, 2010.
- SILVA, I. P. Fungos Endofíticos: Fonte Alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18, p. 3888-3905, 2014.
- SILVA, J. C. B, et al. Efeito da adubação no teor de flavonóides totais e caracteres agrônômicos do mestrato. **Revista Online**, ano 1, n. 1, 2015.
- SORENSEN, S. J, et al. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 700–710, 2005.
- SOUZA, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n.2, p. 185-195, 2004.
- SOUZA, T. K, et al. Atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Tripodanthus acutifolius* frente a *Staphylococcus aureus*. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, n. 1, 6-18, 2014.
- SPECIAN,V, et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.16, n.4, p. 345-351, 2014.
- STROBEL, G. A, et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v.60, 179-183, 2002.
- STROBEL, G; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology**. Reviews. v. 67, n. 4, 491-502, p. 2003.
- STROHL, W. A; ROUSE, H; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- SURYANARAYANAN, T. S; KUMARESAN, V; HOHNSON, J. A. Foliar fungal endophytes from two species of the *Mangrove rhizophora*. **Canada Journal Microbiology**, 1998.
- TAKAHASHI, J. A; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v.31, n. 7, 1807-1813, 2008.
- TAN, R. X; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v.18, p.448–459, 2001.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C.L. **Microbiologia**. Artmed, Porto Alegre, 2005.

TRABULSI, L.R, et al. **Microbiologia**, Editora Atheneu, 3ª edição, 1999.

TUNALI, B; MARSHALL, D; ROYO, C. Antagonistic effect of endophytes against several root-rot pathogens of wheat. **Proceeding of a Seminar**. v.40, p.381-386, 2000.

VIDAL-RUSSELL, R; NICKRENT, D. L. The Biographic History of Loranthaceae. **Redalyc de Revista Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, p.34-53, 2008.

VIEIRA, O. M. C; SANTOS, M. H; SILVA, G.A; SIQUEIRA, A.M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 2, p. 149-154, 2005.

VIEIRA, M.L.A. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* vell. (Solanaceae)**. [Dissertação]: Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

VINOD, R. H, et al. A new antitumor compound from the plant *Oryctanthus sp.* a VEGF receptor binding inhibitor. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.4907-4909, 2005.

VIGNOLI, R; SEIJA, V. Principales mecanismos de resistencia antibiotica. In: **Temas De Bacteriología Y Virología Médica**, cap. 35, p. 649-662, 2007.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. ASM Press, Washington, 2003.

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

WANG, Q. X, et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia**, Milano, v. 82, n. 5, p.777-781, 2011.

WANG, L. W, et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?** *Uso Racion Medicam*, v.1, n.4, p.1-6, 2004.

WELLENSIEK, B. P, et al. Inhibition of HIV-1 Replication by Secondary Metabolites From Endophytic Fungi of Desert Plants. **The open virology journal**, v. 7, p. 72-80, 2013.

WILSON, C. A; CALVIN, C. L. An origin of aerial branch parasitism in the mistletoe family, Loranthaceae. **American Journal of Botany**, v.93, n.5, p. 787-796, 2006.

WIYAKRUTTA, S, et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti- cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

YANG, X; ZHANG, J; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Products Reports**, v. 29, n. 6, p. 622-641, 2012.

- YUAN, Y; TIAN, J. M; XIAO, J; SHAO, Q; GAO, J. M. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium sp.* YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 4, p. 278-281, 2014.
- ZHANG, H. W; SONG, Y. C; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.
- ZHAO, J, et al. In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from *Pigeon pea* [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, v. 56, p. 243–251, 2014.
- ZHOU, X, et al. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 86, n. 6, p.1707-1717, 2010.