

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS – MBT**

ELISSANDRO FONSECA DOS BANHOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE) E
DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Manaus – AM

2011

ELISSANDRO FONSECA DOS BANHOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE) E
DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

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

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

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Antonia Queiroz Lima de Souza

Manaus – AM

2011

ELISSANDRO FONSECA DOS BANHOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE) E
DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

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

Banca Examinadora

.....
Prof.^a. Dr.^a. Patrícia Melchionna Albuquerque - EST/UEA

.....
Prof.^a. Dr.^a Antonia Queiroz Lima de Souza - ESA/UEA

.....
Prof. Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves - INPA

.....
Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza - UFAM

Conceito:.....

Manaus, 28 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

A Minha querida esposa Ariela, por toda a paciência e dedicação, pelo amor, carinho e estímulo que me ofereceu, dedico-lhe essa conquista com todo meu amor, respeito e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em seu infinito amor, tem me abençoado e abençoado minha família, com saúde e sabedoria, e possibilitando momentos como este de grande alegria, vitória e realização.

A minha família, que nos momentos mais difíceis de minha vida tem me apoiado e ajudado a compreender que grandes vitórias só são possíveis quando se enfrentam grandes desafios.

A minha orientadora Professora Patrícia, por ter me dado a oportunidade de ser seu orientado, pela amizade que construímos, pela paciência e contribuição na realização desse trabalho.

A minha coorientadora Professora Antonia, pela enorme contribuição com minha formação, e por me abrir as portas da microbiologia, área essa que deve tomar conta de minha vida profissional.

Ao Professor Sergio, pelas nossas conversas, pela amizade que construímos e pela contribuição para realização desse trabalho.

Ao Professor Afonso, pela acolhida no laboratório de química da UFAM e pelas várias contribuições com este trabalho.

Ao Professor Lozano, pelas nossas conversas, pelos conselhos, e por ter exigido sempre o máximo de seus alunos, mostrando que os nossos limites somos nós mesmos que criamos.

Aos meus amigos Rafael, Renah, Douglas e Celina, pela amizade que ao longo desses dois anos conseguimos construir, e pela contribuição que todos deram para a realização desse trabalho.

Aos colegas da turma de biotecnologia 2009, Andrei, Marcia, Dulci, Paula e Eunice pelo coleguismo que conseguimos construir nesses dois anos.

Aos colegas Hector e Fátima da química Universidade Federal do Amazonas que contribuíram enormemente para realização desse trabalho.

Aos colegas do LabGema, Hector, Fátima, Adriana formiga, Adriana Silva, Larissa, Priscila, Cássia, Felipe, Mara, Edson e Carol, pelos bons momentos de convivência, e pela contribuição de todos para a realização desse trabalho.

RESUMO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE) E DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Interações benéficas entre plantas e microrganismos têm sido investigadas sob diferentes aspectos ecológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos. No entanto, a prospecção sistemática de biomoléculas com potencial para resultar em produtos biotecnológicos oriundos dessa interação ainda é relativamente escassa. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários que compõem o óleo essencial e extratos de *Myrcia guianensis*, assim como dos metabólitos secundários de seus fungos endofíticos. Para tanto, foram coletados no Município de Santarém-Pará, folhas de *M. guianensis* para obtenção dos extratos etanólico, metanólico, hexânico, acetado de etila e óleo essencial, além de fungos endofíticos isolados de raiz, caule e folha dessa planta. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados utilizando como cepas teste as bactérias *Pseudomonas aureuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, e os fungos *Candida albicans* e *Penicillium avelani*. Os fungos endofíticos isolados foram separados em grupos considerando suas características macro e micro-morfológicas. O número de 156 isolados foram obtidos e distribuídos em 14 grupos. As características revelaram a presença de gêneros como: *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Xylaria*, *Penicillium* e *Fusarium*. Nenhum dos extratos das folhas da planta e nem o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas teste. Dos 46 meios metabólicos dos fungos testados, três apresentaram resultado positivo frente a *S. aureus*, três apresentaram atividade contra a *E. faecalis*, um apresentou atividade frente a *C. albicans* e dois mostraram atividade inibitória frente ao fungo *P. avelani*. Os resultados da atividade antimicrobiana dos metabólitos permitiu selecionar a linhagem **MgRe2 2.3 B** para as etapas subseqüentes, uma vez que o meio líquido metabólico dessa linhagem apresentou halos de inibição médios de 12,5 mm contra *S. aureus*, 15,0 mm contra *E. faecalis* e de 43,3 mm contra *P. avelani*. Os extratos AE1 e AE11 obtidos da linhagem **MgRe2 2.3 B** foram os que apresentaram os resultados mais promissores e foram então fracionados para dar início à identificação da molécula bioativa. As frações obtidas foram novamente testadas, obtendo-se os melhores resultados de atividade antimicrobiana nas frações 1 e 2. A análise por CLAE permitiu concluir que a substância 2, componente da fração 1 e substância 3, componente da fração 2 são provavelmente a mesma substância. Nos testes para determinação da DMI, tanto a fração 1 quanto a fração 2 demonstraram possuir capacidade inibitória frente a *S. aureus* até a dose de 0,250 mg/mL. Essas frações também mostraram capacidade inibitória frente a *P. avelanni* até a dose de 0,125 mg/mL. Já contra *E. faecalis* a fração 1 demonstrou capacidade inibitória até a dose de 0,50 mg/mL, enquanto que a fração 2 até a dose de 1,0 mg/mL. Tanto a fração 1 quanto a fração 2 não demonstraram possuir capacidade bactericida frente a *E. faecalis*. Para a bactéria *S. aureus*, as frações demonstraram ação bactericida até a dose de 0,50 mg/mL. Já nos testes realizados com *P. avelani*, as frações demonstraram ação fungicida apenas quando se encontravam na dose de 1,0 mg/mL. Os resultados mostram o potencial biotecnológicos de fungos endofíticos isolados da espécie vegetal investigada.

Palavras-chave: metabólitos secundários, interação fungo-planta, bioatividade, bactericida.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Myrcia guianensis* (MYRTACEAE) AND THEIR ENDOPHYTIC FUNGI.

Beneficial interactions between plants and microorganisms have been investigated under different ecological, physiological, biochemical and genetic factors. However, the systematic exploration of biomolecules with the potential to result in biotech products from this interaction is still relatively scarce. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of secondary metabolites which make up the essential oil and extracts of *Myrcia guianensis* leaves, as well as to verify the antimicrobial activity of the secondary metabolites produced by their fungal endophytes. The plant tissues were collected in Santarém, Pará. The leaves of *M. guianensis* were used to obtain ethanolic, methanolic, hexane and ethyl acetate extracts, as well as the essential oil, apart from endophytic fungi, isolated from root, stem and leaf of this plant. The antimicrobial activity tests were performed using pathogenic strains of *Pseudomonas aureuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* and *Penicillium avelani*. The isolated endophytic fungi were separated into groups considering its macro and micro-morphological features. It was obtained 156 isolates distributed into 14 groups. The characteristics revealed the presence of genres such as *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Xylaria*, *Penicillium*, and *Fusarium*. None of the plant extracts or the essential oil showed antimicrobial activity against the pathogenic strains. Of the metabolic media obtained from 46 endophytic fungi, three showed positive results against *S. aureus*, three had activity against *E. faecalis*, one showed activity against *C. albicans* and two showed inhibitory activity against the fungus *P. avelani*. The results of the antimicrobial activity of the metabolic media allowed to select the strain **MgRe2 2.3 B** for the subsequent steps, since the metabolic broth of this strain presented inhibition halo of 12.5 mm against *S. aureus*, 15.0 mm against *E. faecalis* and 43.3 mm against *P. avelani*. The extracts AEI1 and AE1 obtained from **MgRe2 2.3 B** showed the most promising results and were fractionated to initiate the identification of the bioactive molecule. The fractions were tested again, and the best results were observed within the fractions 1 and 2. The HPLC analysis showed that the substance 2 of the fraction 1 and the substance 3 of fraction 2 are the same substance. In tests to determine the MID, both fraction 1 and fraction 2 have showed inhibitory effect against *S. aureus* to the dose of 0,25 mg/mL. These fractions also showed inhibitory effect against *P. avelani* until the dose of 0,125 mg/mL. Against *E. faecalis*, fraction 1 showed an inhibitory effect until the dose of 0,50 mg/mL, while the fraction 2 showed until the dose of 1,0 mg/mL. For MBD or fungicide, both fractions 1 and 2 did not demonstrate bactericidal capacity against *E. faecalis*. However, these fractions demonstrated bactericidal activity against *S. aureus* until a dose of 0,50 mg/mL. In the tests using *P. avelani*, the fractions showed fungicidal action only when both were at a dose of 1,0 mg/mL. The results show the potential of biotechnology endophytic fungi isolated from the plant species investigated.

Key words: secondary metabolites, plant-fungus interaction, bioactivity, bactericidal.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura química da morfina.....	17
FIGURA 2: Estrutura química da quinina.....	17
FIGURA 3: Estrutura química do ácido cinâmico.....	19
FIGURA 4: Estrutura química da hipericina.....	19
FIGURA 5: Estrutura química da crisina.....	20
FIGURA 6: Estrutura química de monoterpenos de ocorrência em óleos essenciais.....	21
FIGURA 7: Estrutura química da myrciacitrina.....	24
FIGURA 8: Ramo frutificado de <i>M. guianensis</i>	25
FIGURA 9: Ramo florido de <i>M. guianensis</i>	25
FIGURA 10: Comparação entre a infecção de um fungo endofítico e de um fitopatógeno. Adaptado de KOGEL, FRANKEN e HUCKELHOVEN, 2006.....	28
FIGURA 11: Estrutura química do taxol.....	29
FIGURA 12: Estrutura química da criptocandina.....	29
FIGURA 13: Estrutura química da penicidona A, B e C.....	31
FIGURA 14: Estrutura química da periconicinas A e B.....	32
FIGURA 15: Localização da área da coleta da planta. Comunidade de São Pedro, em baixo, à esquerda. Cidade de Santarém, em cima, à direita.....	37
FIGURA 16: Coleta da planta <i>M. guianensis</i> na comunidade de São Pedro, Santarém – Pará.....	38
FIGURA 17: Fluxograma de obtenção dos extratos da planta.....	39
FIGURA 18: Representação esquemática do teste para determinação da DMI. CON – controle negativo.....	46
FIGURA 19: Representação esquemática do teste para determinação da DMB.....	47
FIGURA 20: Cultivo em Escala Preparativa (condição 1).....	48

FIGURA 21: Cultivo em Escala Preparativa (condição 2).....	48
FIGURA 22: Filtração do meio metabólico líquido (A). Extração do meio metabólico líquido (B).....	49
FIGURA 23: Fungos endofíticos em crescimento, a partir de fragmentos de <i>M. guianensis</i>	56
FIGURA 24: Percentagem de fungos endofíticos isolados de <i>M. guianensis</i>	56
FIGURA 25: Diversidade de fungos endofíticos isolados de <i>M. guianensis</i>	59
FIGURA 26: MgCe2 3.1 – <i>Pestalotiopsis</i> sp (grupo 1). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) esporos em objetiva de 40x.....	60
FIGURA 27: MgF2 2.2 – <i>Phomopsis</i> sp (grupo 2). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) esporos em objetiva de 100x.....	60
FIGURA 28: MgRe1 1.1 – <i>Aspergillus</i> sp.(grupo 3). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) estrutura reprodutiva (conidinióforo) em objetiva de 20x.....	61
FIGURA 29: MgF3 2.1 – <i>Guignardia</i> sp. (grupo 14). Em (A) cultura em placa e Petri. Em (B) estrutura do micélio em objetiva de 20x.....	61
FIGURA 30: MgRe2 2.3 B – Desconhecido (grupo 7). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) estrutura do micélio em objetiva de 40x.....	61
FIGURA 31: Grupos morfológicos de fungos endofíticos de <i>M. guianensis</i> em função do tecido vegetal em que foram isolados.....	62
FIGURA 32: Resultado do teste de antibiose dos metabólicos da linhagem MgRe2 2.3B contra <i>P. avelani</i> . Em (A) halo de inibição promovido pelo meio metabólico. Em (B) halo de inibição promovido pelo cetoconazol (2,0 mg/mL).....	66
FIGURA 33: Estrutura micromorfológica da linhagem MgRe2 2.3B. Fungo do gênero <i>Blakeslea</i> em objetiva de 40x.....	67
FIGURA 34: Cromatografia em camada delgada dos extratos AEI1 em (A) e AE1 em (B).....	70
FIGURA 35: Teste de atividade antimicrobiana das frações. Mostrando em (A) halo de inibição da fração 1 (F1). Em (B) halo de inibição da fração 2 (F2). Em (C) e (D), frações 3 e 4, respectivamente.....	71
FIGURA 36: Perfil cromatográfico referente à análise da fração 1 (F1) por CLAE. Mostrando a substância 1 (S1) com tempo de retenção 10,35 min., e a substância 2 (S2), com tempo de retenção 17,77 min.....	73
FIGURA 37: Espectros de UV de 225 a 390 nm das substâncias S1 e S2, pertencentes à fração 1 (F1). A seta indica o comprimento de onda onde ocorreu a máxima absorção	

para ambas substâncias, 287 nm.....	73
FIGURA 38: Perfil cromatográfico referente à análise da fração 2 (F2) por CLAE. Mostrando isolamento da substância 3 (S3) com tempo de retenção 17,95 min.....	74
FIGURA 39: Espectro de UV de 230 a 420 nm da substância 3 (S3), isolada da fração 2 (F2). A seta indica o comprimento de onda onde ocorreu a máxima absorção, 287 nm.....	74
FIGURA 40: Espectro de massas da fração 1 [M –H].....	75
FIGURA 41: Espectro de massas da fração 1 [M +H].....	76
FIGURA 42: Espectro de massas da fração 2 [M –H].....	76
FIGURA 43: Espectro de massas da fração 2 [M +H].....	77
FIGURA 44: Espectro de RMN ¹ H da substância 1 (S1).....	78
FIGURA 45: Espectro de RMN ¹ H da substância 2 (S1).....	78
FIGURA 46: Espectro de RMN ¹ H da fração 2.....	79
FIGURA 47: Teste da fração 2 frente a <i>S. aureus</i> , para determinação da DMI. Setas indicam poço em que não ocorreu crescimento bacteriano.....	81
FIGURA 48: Teste para determinação da DMB, demonstrando resultado negativo da fração 2 frente a <i>E. faecalis</i>	81
FIGURA 49: Teste para determinação da DMB. Setas indicam ação bactericida da F2 contra <i>S. aureus</i> até a dose 0,50 mg/mL.....	82
FIGURA 50: Teste para determinação da Dose Mínima Fungicida (DMF). Setas demonstrando ação fungicida da fração 2 contra <i>P. avelani</i> , na dosagem de 1,0 mg/mL...	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Plantas das quais foram isolados fungos endofíticos e as substâncias com atividade antimicrobiana por eles produzidas.....	33
TABELA 2: Linhagens de fungos endofíticos selecionadas para cultivo e obtenção do meio líquido metabólico.....	43
TABELA 3: Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e do óleo essencial de <i>M. guianensis</i>	53
TABELA 4: Distribuição dos fragmentos vegetais de <i>M. guianensis</i> inoculados em cada espécime.....	55
TABELA 5: Fungos endofíticos isolados por espécime de <i>M. guianensis</i>	57
TABELA 6: Grupos morfológicos de fungos endofíticos isolados de <i>M. guianensis</i>	59
TABELA 7: Resultados dos testes de antibiose realizados com o meio metabólico líquido dos fungos endofíticos isolados de <i>M. guianensis</i>	63
TABELA 8: Extratos do meio metabólico líquido e do micélio da linhagem MgRe2 2.3B na condição 1 e condição 2 de cultivo em escala preparativa.....	68
TABELA 9: Resultado dos testes de atividade antimicrobiana, realizados com os extratos obtidos do meio metabólico da linhagem MgRe2 2.3B.....	69
TABELA 10: Fracionamento em coluna do extrato e seus respectivos eluentes e pesos secos.....	71
TABELA 11: Resultado dos testes de atividade antimicrobiana das frações 1 a 6.....	72
TABELA 12: Resultado dos testes de Dose Mínima Inibitória (DMI) das frações 1 e 2....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ACN	Acetonitrila
AcoEt	Acetato de Etila
BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Performance
DMB	Dose Mínima Bactericida
DMF	Dose Mínima Fungicida
DMI	Dose Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsufóxido
EM	Espectrometria de Massas
GPS	Global Positioning System
HCl	Ácido Clorídrico
Isso-PrOH	Isopropanol
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TC	Taxa de Colonização
TFA	Ácido Trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COM FINS TERAPÊUTICOS.....	16
1.2 METABOLISMO VEGETAL E SÍNTESE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS.....	18
1.3 FAMÍLIA MYRTACEAE.....	22
1.4 FUNGOS: DIVERSIDADE E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.....	25
1.5 ENDOFÍTICOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	27
1.6 ANTIMICROBIANOS OBTIDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	32
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	37
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DA PLANTA.....	39
4.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	40
4.3.1 Desinfecção superficial.....	40
4.3.2 Inoculação dos fragmentos vegetais.....	40
4.3.3 Purificação e Conservação dos fungos endofíticos.....	41
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS.....	42
4.5 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	42
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	44

4.7 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA INIBITÓRIA.....	45
4.8 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA BACTERICIDA.....	46
4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	47
4.9.1 Cultivo em Escala Preparativa.....	47
4.9.2 Extração e Fracionamento do Meio Metabólico.....	49
4.9.3 Isolamento e Início da Identificação da(s) Molécula(s) Bioativa(s).....	50
4.10 TESTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>M. guianensis</i>	52
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE <i>M. guianensis</i>	52
5.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	55
5.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ISOLADOS.....	58
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	62
5.6 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO FUNGO MgRe2 2.3B	66
5.7 ESTUDO DOS COMPONENTES DOS METABÓLITOS DO FUNGO MgRe2 2.3B	67
5.7.1 Avaliação da presença de alcalóides.....	68
5.7.2 Metabólitos obtidos do Fungo MgRe2 2.3.....	68
5.7.3 Fracionamento do Extrato e Início da Caracterização da Molécula Bioativa.....	71
5.8 DOSE MÍNIMA INIBITÓRIA.....	79
5.9 DOSE MÍNIMA BACTERICIDA E FUNGICIDA.....	81
6 CONCLUSÕES.....	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

INTRODUÇÃO

Diversidade biológica ou biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Ela pode ser entendida como uma associação de vários componentes hierárquicos como: ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida (GUERRA e NODARI, 1999).

Dentro de toda essa riqueza de componentes podem estar guardadas uma gama de novos produtos de importância econômica, tais como alimentos, fitoterápicos, cosméticos e fitofármacos, originados dos recursos genéticos dessa biodiversidade (NEWMAN e CRAGG, 2007). Neste sentido, o Brasil se encontra em uma posição privilegiada em relação a outros países, haja vista ser um dos países de megadiversidade no mundo, sendo que, de acordo com a Avaliação dos Recursos Florestais da Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas, o Brasil possui cerca de 41% de todas as florestas restantes classificada como florestas pluviais tropicais (FEARNSIDE, 2003).

A magnitude dessa biodiversidade ainda não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de cinquenta e cinco mil espécies catalogadas de um total estimado entre trezentos e cinquenta e quinhentos e cinquenta mil espécies (GUERRA e NODARI, 1999).

A maior parte da riqueza conferida ao Brasil está vinculada à Amazônia, considerada o maior conjunto de florestas tropicais do planeta. Esta área possui a mais rica variedade de espécies vegetais e animais do mundo (SILVÉRIO, 2004; FEARNSIDE, 2003). Ao longo dos anos, a biodiversidade amazônica tem sido explorada de forma não sustentável, o que tem ocasionado uma diminuição considerável na quantidade de espécies que formam a floresta amazônica. O desmatamento é o principal fator ligado à perda da biodiversidade, este geralmente relacionado à construção e pavimentação de estradas e ou grandes fazendas agropecuárias (FEARNSIDE, 2006).

A Amazônia vive um momento de busca por um modelo de desenvolvimento em que o crescimento da ocupação humana e seus anseios por desenvolvimento econômico, não sejam antagônicos à conservação das riquezas naturais. A sociedade demanda que a ciência possa encontrar uma fórmula para resolver a equação: DESENVOLVIMENTO X CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS. Dessa maneira, a educação e a pesquisa são

fatores cruciais para catalisar o desenvolvimento humano e, portanto, qualquer estratégia de uso e manejo de recursos naturais amazônicos devem obrigatoriamente levar em consideração a carência regional de quadros técnicos especializados e, sobretudo, o desconhecimento acerca do potencial dessa diversidade biológica.

Levando em consideração os fatores citados acima, percebe-se que as espécies Amazônicas, sejam elas vegetais ou microbiológicas, precisam ser exploradas de forma sistemática e sustentável, a fim de que suas possibilidades biotecnológicas possam ser mais bem observadas e assim se possa almejar, no futuro próximo, o estabelecimento de novos produtos e o estabelecimento de processos tecnológicos de base biológica que beneficiem a sociedade, sobretudo a Amazônica.

Estas potencialidades brasileiras inerentes a biodiversidade Amazônica pode ser investigada de modo específico para flora e para fauna, e principalmente a microbiota. No entanto, as interações entre os diferentes reinos também são cenários da evolução molecular ao longo dos anos. De maneira geral, as interações ecológicas são pautadas em aspectos antagônicos ou sinérgicos que podem regular a frequências e ocorrência de determinadas espécies.

Do ponto de vista fisiológico e metabólico, em particular, quando se trata de interações benéficas entre plantas e microrganismo ressalta-se a fixação biológica de nitrogênio molecular a partir da simbiose planta-bactéria. No que concerne as interações planta-fungos é possível verificar grande quantidade de investigações sobre fungos visículo-arbuscular (MVA). No entanto, quando se trata de fungos endofíticos suas potencialidades são maiores devido os vários ambientes internos da planta em que se apresentam e a quantidade de condições estão sujeitos devido as diferença entre esses microhabitats.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS COM FINS TERAPÊUTICOS

Os registros sobre a utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos remontam ao início da civilização humana, e esses registros se confundem com a própria história da humanidade. Desde o momento em que o homem despertou para as suas necessidades, começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para o seu próprio benefício (DI STASI, 1996; NOVAIS et al., 2003).

Muitas comunidades de populações tradicionais, principalmente aquelas com condições socioeconômicas menos favorecidas, utilizam plantas medicinais como o principal ou o único recurso para o alívio de seus males (CAETANO et al., 2002; MACIEL et al., 2002). Além disso, o uso de plantas medicinais é uma terapêutica tradicional recomendada internacionalmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como forma de apoio às ações de atendimento primário à saúde (AKERELE e SYNGE, 1991; WENIGER, 1991).

Essa utilização se justifica pelo entendimento de que através de seu metabolismo secundário, as plantas possuem uma habilidade quase ilimitada de sintetizar compostos, os quais estão associados aos mais diversos mecanismos de interação e adaptação das espécies vegetais como: a predação por insetos e herbívoros, a atração de polinizadores e dispersores de sementes, e o combate a microrganismos fitopatógenos. As diferentes condições ambientais e de competição intra e interespecífica em que as espécies vegetais se encontram, também possibilitam a produção de diferentes compostos, que lhes permitiu a sobrevivência ao longo dos anos (GUERRA e NODARI, 1999).

A história de fármacos de origem vegetal é bastante rica, e o isolamento da morfina (**Fig. 1**) é um dos exemplos mais antigos de como a biodiversidade vegetal tem sido importante na obtenção de moléculas bioativas. Esse alcalóide com propriedades analgésicas foi isolado em 1806 da *Papaver somniferum* e teve papel fundamental na síntese de novos analgésicos (BARREIRO, 1990).

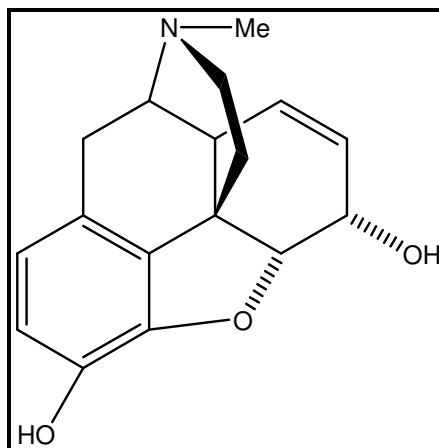


Figura 1: Estrutura química da morfina.

Outro alcalóide de grande importância histórica é a quinina (**Fig. 2**), um antimalárico que foi isolado de *Cinchona* sp em 1820, e teve papel primordial no combate à malária no século XIX, ajudando o homem a desbravar áreas antes desconhecidas, muitas delas no Brasil, como algumas áreas da região Amazônica (OLIVEIRA e SZCZERBOWSKI, 2009).

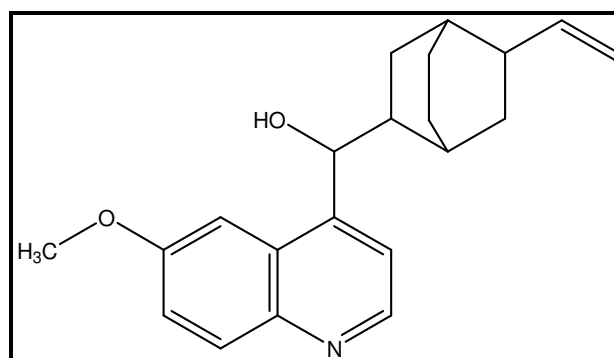


Figura 2: Estrutura química da quinina.

Na década de noventa, o progresso da indústria farmacêutica representado principalmente pela síntese orgânica, obscureceu o extraordinário papel que as plantas desempenham no tratamento dos mais variados males à saúde humana (KOROLKOVAS, 1996). Contudo, atualmente o uso de plantas medicinais encontra-se em franca expansão, tanto em países desenvolvidos, quanto em países em desenvolvimento (HEINRICH, LEONTI e STICHER, 2002; LICCIARDI e UNDERWOOD, 2010). Essa maior procura por moléculas bioativas oriundas de plantas é motivada também pelo desenvolvimento técnico da química analítica. Os vários métodos de separação, purificação e identificação, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), Espectrometria de Massas (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm possibilitado uma maior eficiência e dinamismo

aos trabalhos de isolamento e identificação de compostos bioativos (CASS et al., 2006; McCHESNEY, VENKATARAMAN e HERRI, 2007).

O Brasil se mostra como o quinto mercado consumidor de medicamentos do planeta. Porém, sob a óptica das políticas da saúde, verifica-se que, apesar dos progressos alcançados nas últimas décadas, o compromisso de assegurar a acessibilidade universal aos medicamentos ainda está bastante distante, uma vez que mais da metade da população não tem acesso aos medicamentos, e apenas vinte e três por cento da população concentra sessenta por cento do consumo (MARQUES, 2000).

1.2 METABOLISMO VEGETAL E SÍNTESE DE MOLÉCULAS BIOATIVAS

Os óleos essenciais e extratos de várias espécies de plantas são capazes de controlar microrganismos presentes em vários microhabitats do corpo humano, como os da pele e da boca causadores de cáries dentárias, incluindo dessa forma bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (NASCIMENTO et al., 2000). No Brasil, pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos em 1948, que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas, indicadas em terapêutica como antiinflamatórias ou cicatrizantes. Destas, cinco apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp. (SARTORI, 2005).

Os compostos isolados de plantas são substâncias com estrutura química bem diferenciada dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, de leveduras e de fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, modificando os processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou ainda interferindo no metabolismo secundário desses patógenos (COWAN, 1999).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (TAVARES, 1984; COELHO et al., 2004). As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos que, por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies vegetais, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SOUZA et al., 2003; SANTOS, 2007).

O conhecimento mais detalhado desses compostos permitiu atribuir importância nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (CECHINEL e YUNES, 1998; NIERO et al., 2003). Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem formar substâncias com propriedade antimicrobiana, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata às agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematóides, ou em função de determinados estímulos, como radiações ou agentes químicos (YUNES, 2001).

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas. Tais compostos apresentam ação sobre microrganismos provocando a privação do seu substrato e ruptura da membrana plasmática. Ácidos fenólicos, como o ácido cinâmico (**Fig. 3**), têm ação antibacteriana, porém, o mecanismo exato é desconhecido (COWAN, 1999).

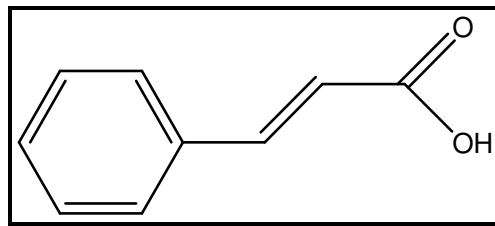


Figura 3: Estrutura química do ácido cinâmico.

Quinonas, como a hipericina (**Fig. 4**), podem se ligar a adesinas, polissacarídeos da parede celular de bactérias, e formar complexos com a parede das células desses microrganismos, inativando enzimas importantes para a sua sobrevivência (FALKENBERG, 2007).

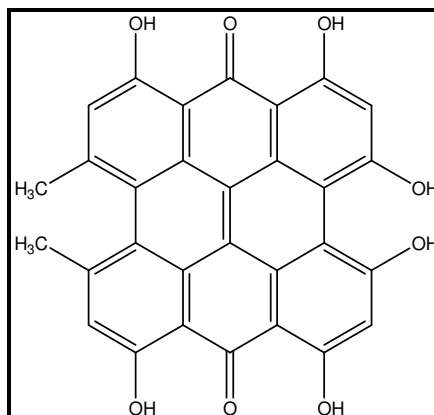


Figura 4: Estrutura química da hipericina.

Outra grande classe de compostos são os flavonóides, um grupo de polifenóis de baixo peso molecular, que compõem os metabólitos secundários de plantas. Estas substâncias são sintetizadas, muitas vezes, em resposta às infecções microbianas e, portanto, não é surpreendente que tenham sido demonstradas, *in vitro*, a ação antimicrobiana destas substâncias contra uma grande variedade de microrganismos. Um bom exemplo de flavonóides com essa capacidade é a crisina (**Fig. 5**), que se liga a adesinas bacterianas, residindo aí a sua atividade antimicrobiana (COWAN, 1999; ZUANAZZI e MONTANHA, 2007).

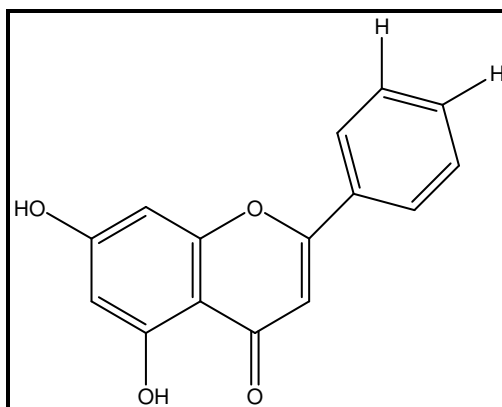


Figura 5: Estrutura química da crisina.

Os taninos pertencem a uma classe de compostos quimicamente complexos que apresentam várias atividades tidas como antimicrobianas; ligam-se a proteínas, adesinas, inibem enzimas e provocam privação do substrato microbiano. São capazes de formar complexos com a parede celular, provocando assim, a ruptura da membrana plasmática (COWAN, 1999). Muitas plantas ricas em taninos estão sendo utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de vários sintomas e doenças, tais como diarreia, hipertensão, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e processos inflamatórios (SANTOS e MELLO, 2007).

Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos predominantemente encontrados em angiospermas. São referidos como detentores de propriedades antimicrobianas (HENRIQUES et al., 2007).

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos etéreos, voláteis ou essências são os grandes responsáveis pela fragrância das plantas, e essa característica é totalmente dependente da complexa mistura de substâncias voláteis que formam cada óleo essencial,

relacionada com o mecanismo de atração dos polinizadores. A grande maioria dos óleos essenciais são constituídos de derivados fenilpropanóides, formados a partir do ácido chiquímico, e de terpenóides formados por unidades de isopreno de origem no ácido mevalônico. Em geral, os terpenóides são os constituintes preponderantes dos óleos essenciais, e entre os terpenóides, os monoterpênos (**Fig. 6**) são os componentes mais freqüentes (SIMÕES e SPITZER, 2007).

A característica odorífera dos óleos essenciais tem possibilitado a utilização desses óleos pela indústria de cosméticos. Além dessa aplicação muito conhecida, muitos trabalhos com óleos essenciais têm demonstrado que também são detentores de significativa ação antimicrobiana (GUOLIN et al., 2005; MUSELLI et al., 2008; KOLODZIEJCZYK et al., 2008).

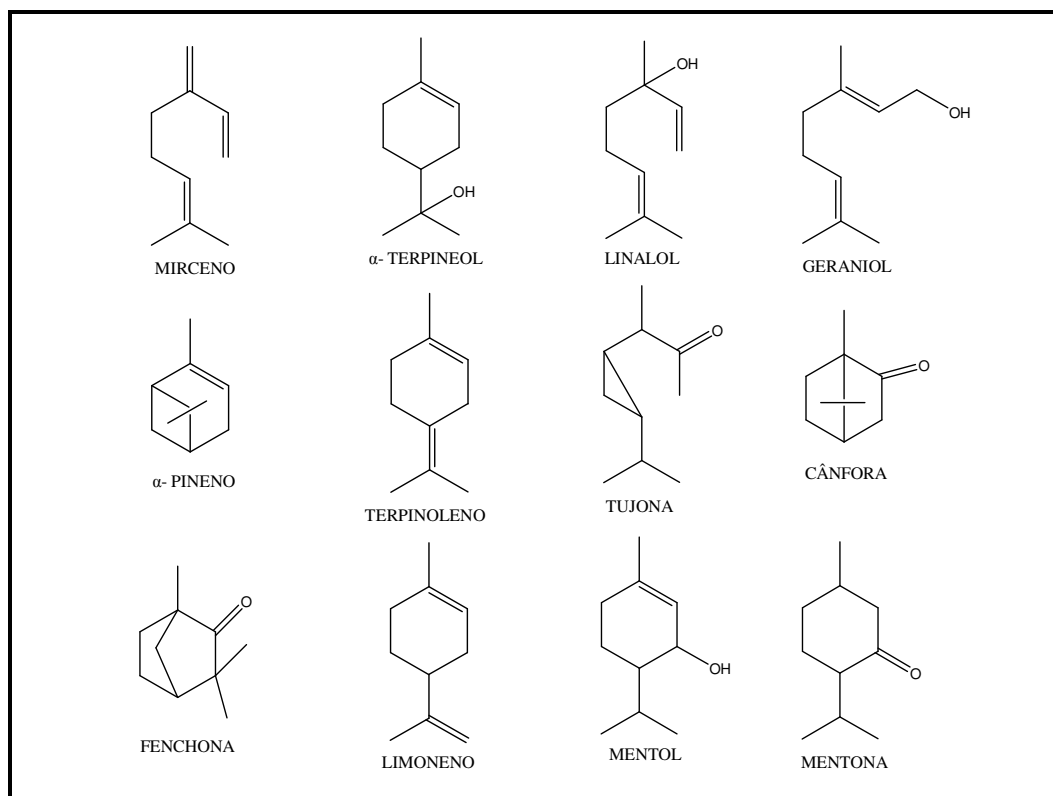


Figura 6: Estrutura química de monoterpênos de ocorrência em óleos essenciais.

Neste sentido, dentre as mais diversas possibilidades de utilização terapêutica para as plantas, a atividade antimicrobiana se configura numa das mais promissoras, tendo em vista a diversidade de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por elas, e levando em

consideração a aquisição de resistência de bactérias patogênicas pelos antibióticos em uso atualmente (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Na década de 70, o uso indiscriminado de antimicrobianos provocou um processo de aceleração do aparecimento de cepas bacterianas resistentes a estes compostos, especialmente nos ambientes hospitalares (LINARES-RODRIGUES e MARTINEZ-MENENDEZ, 2005; WAGENLEHNER, WEIDNER e NABER, 2005). O aumento da resistência bacteriana demandou o desenvolvimento de novos e mais potentes agentes antimicrobianos, assim como o incremento da pesquisa na área dos mecanismos da resistência bacteriana. Faz-se necessário um melhor entendimento dos mecanismos de disseminação da resistência bacteriana frente a agentes antimicrobianos a fim de controlar o problema (SADER et al., 2001).

As pesquisas que visam a descoberta de novos compostos estão bem consolidadas, e muitos trabalhos têm confirmado que as plantas possuem a capacidade de eliminar bactérias patogênicas (bactericida) e/ou de inibir seu crescimento (bacterioestático), dessa maneira, podem ser utilizadas como medicamento contra microrganismos patógenos, sendo assim úteis no combate a tão importante agravo da história humana (CEBALLOS et al., 1993; COWAN, 1999; XU e LEE, 2001; NOVAIS et al., 2003; PESSINI et al., 2003; DUARTE et al., 2004; LIMA et al., 2006).

1.3 FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, possui centros de diversidade na América tropical e Austrália, com poucas espécies de ocorrência nas regiões temperadas. Esta família é composta por aproximadamente 100 gêneros e 3500 espécies (BARROSO, 1984), e tem sido citada em diversos estudos florísticos e fitossociológicos realizados em diferentes formações florestais do Brasil, destacando-a como uma importante família das comunidades neotropicais. A família, em sua maioria, compõe formações vegetais em áreas de cerrado (MORRI et al., 1983; RODRIGUES et al., 1989; PEIXOTO e GENTRY, 1990; FABRIS e CESAR, 1996; DORNELES e WAECHETER, 2004; MORAIS e LOMBARDI, 2006; KUNZ et al., 2008).

A mais recente classificação infrafamília foi proposta no ano de 2005 e reconhece duas subfamílias, sendo elas Myrtoideae e Psiloxylodeae, e cerca de 17 tribos. As espécies brasileiras estão incluídas na Tribo Myrteae (WILSON et al., 2005). No Brasil, a família

Myrtaceae está representada por cerca de 1000 espécies, o que a torna uma das mais importantes do país. Os gêneros mais representativos dessa família, ou seja, aqueles com maior número de espécies conhecidas são *Eugenia*, *Myrcia* e *Calypttranthes* (BARROSO e PERÓN, 1994; LANDRUM e KAWASAKI, 1997). Muitas espécies de Myrtaceae brasileiras são conhecidas por numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente. Geralmente não produzem madeiras valiosas, se restringindo ao fornecimento de lenha e para a utilização de pequenas peças ou objetos de uso tradicional local (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; MARCHIORI e SOBRAL, 1997).

Na Amazônia encontram-se várias espécies da família Myrtaceae, que são utilizadas na medicina popular, como *Psidium guajava* L. (goiabeira), cujos frutos e, principalmente, as folhas são ricos em taninos, tendo o chá de suas folhas e brotos uso muito difundido no meio popular como antidiarréico (CRUZ, 1982). Faz parte também desta família a *Myrciaria jaboticaba* (jaboticabeira), que tem seus frutos comestíveis muito apreciados na confecção de licores e vinhos medicinais, sendo igualmente empregada como antidiarréica e contra inflamações de garganta (CRUZ, 1982). Também merece destaque a *Eugenia uniflora* (pitanga), que apresenta compostos fenólicos com ação antioxidante e algumas com ação hipoglicemiante e antirreumática, também utilizadas em distúrbios estomacais e como antihipertensiva (HORA, 1944).

A família Myrtaceae é produtora de vários compostos com grande potencial bioativo. Limberger et al. (2004) avaliaram óleos voláteis de folhas frescas de várias espécies pertencentes à família Myrtaceae, de ocorrência no sul do Brasil, e os resultados obtidos permitiram aos autores concluir que os diferentes óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana com diferentes graus de potência (LIMBERGER et al., 2004).

A investigação acerca da espécie *Myrtus communis*, pertencente à família Myrtaceae, obteve resultados significativos tanto para seus extratos como para seu óleo essencial, inibindo o crescimento de microrganismos com conhecida importância médica como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens* (SALVAGNINI et al., 2008). Através da observação de outros trabalhos fica clara a capacidade dessa família na produção de diversos metabólitos secundários, e estes por sua vez, a de inibirem o crescimento de diversos microrganismos patogênicos (DIJIPA, DELMÉE e QUETIN-LECLERCQ, 2000; NAKASHIMA et al., 2005; SERAFIN et al., 2007).

Os componentes químicos produzidos por plantas pertencentes a família Myrtaceae caracteriza-se pela presença de taninos, flavonóides, triterpenóides, cromenos, estilbenóides e outros. Muitos desses compostos são descritos como possuidores de propriedades

antimicrobianas (COWAN, 1999; LIMBERGER et al., 2004; MENTZ, VENDRUSCOLO e RATES, 2005). As espécies pertencentes especificamente ao gênero *Myrcia* também possuem a capacidade de produzir uma grande quantidade de compostos, entre eles estão flavonóides, sesquiterpenos, monoterpênos, triterpenos e esteróides. Esses metabólitos podem ser encontrados nos óleos essenciais e extratos das folhas, flores e galhos da planta (CRUZ et al., 2002; KUSTER et al., 2003; CRUZ et al., 2004; LIMBERGER et al., 2004; CRUZ et al., 2007).

A respeito dos metabólitos produzidos pelo gênero *Myrcia*, o que se sabe é que existem diferentes compostos produzidos por diferentes espécies de mesmo gênero, e que fatores como quantidade de chuvas e composição do solo são cruciais na presença desses compostos (LIMBERGER et al., 2004; CRUZ et al., 2007). Sabe-se também que alguns desses compostos possuem atividades biológicas interessantes (CRUZ et al., 2003; LIMBERGER et al., 2004; CRUZ et al., 2007). Como bom exemplo tem-se a espécie *M. myrtiflora*, pertencente a este gênero, que teve comprovada sua atividade antimicrobiana (CRUZ et al., 2007).

Outro exemplo da habilidade das plantas pertencentes a este gênero vegetal para produção de novos compostos com atividade biológica foi a caracterização da myrciacitrina (**Fig. 7**), obtida a partir dos extratos metanólicos de *Myrcia multiflora*. Esse composto apresenta comprovada atividade hipoglicemiante (YOSHIKAWA, MATSUDA e NISHIDA, 2002).

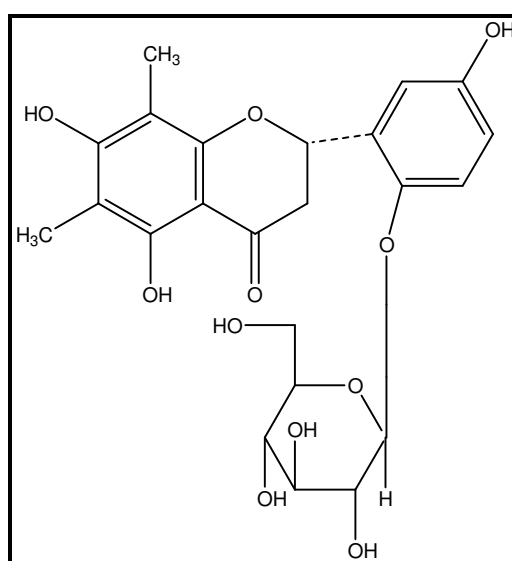


Figura 7: Estrutura química da myrciacitrina.

Portanto, a espécie objeto do presente estudo, *M. guianensis* (**Fig. 8 e 9**), conhecida popularmente na região norte do Brasil por pedra-ume-caá ou vassorinha, possui significativo potencial para dar origem a novas substâncias bioativas. Apesar disso, poucos são os trabalhos relacionados especificamente a espécie em questão, tanto do ponto de vista de sua fitoquímica, quanto de sua bioprospecção.



Figura 8: Ramo frutificado de *M. guianensis*.



Figura 9: Ramo florido de *M. guianensis*.

1.4 FUNGOS: DIVERSIDADE E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Os fungos são organismos heterotróficos que dependem de substâncias orgânicas disponíveis no meio-ambiente para sua sobrevivência. São seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides e possuem parede celular rígida constituída de amino-açúcares (quitina) (SILVA e COELHO, 2006). Esses organismos são conhecidos por serem capazes de produzir uma grande quantidade de produtos importantes como: ácidos orgânicos, fármacos e enzimas de interesse comercial, além de possuírem grande importância ecológica como agentes decompositores de matéria orgânica (MINAMI, 2003).

Os fungos podem ser encontrados no ar, no solo, na água, nos vegetais e nos animais. E do ponto de vista morfológico é conveniente distinguí-los em leveduras e bolores, apesar dessa distinção não ter valor taxonômico. As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. O tamanho varia de 1 a 5 μm de diâmetro e de 5 a 30 μm de comprimento. Os bolores são constituídos por células multinucleadas, que formam tubos chamados hifas; ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio, podendo essas hifas ser septadas e contínuas (ALTERTHUM, 2001).

A grande maioria dos fungos possui ciclo de vida haplóide. A fase diplóide é bastante rápida, pois assim que os núcleos se fundem e dão origem ao núcleo diplóide, ocorre a meiose e a volta ao estado haplóide. A principal via de disseminação dos fungos é através dos esporos, podendo ter origem sexuada ou assexuada, e por isso esse componente possui grande importância para esse reino (ALTERTHUM, 2001).

O assim denominado reino Fungi está organizado em cinco filos, sendo eles: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (SILVA e COELHO, 2006).

O filo **Chytridiomycota** é composto por fungos mais simples, com pequenas dimensões, hifas não septadas ou cenocítica e com presença de esporos flagelados. Possui uma única classe, Chytridiomycetes, e seus representantes podem possuir a forma de um talo globoso ou ovóide, com uma única hifa alongada ou, um micélio bem desenvolvido. Estão presentes geralmente em ambientes aquáticos dulcícolas, marinhos ou salobros (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

O filo **Zygomycota** possui duas classes, a dos Zygomycetes e Trichomycetes. São fungos que não apresentam flagelos em seus esporos e podem apresentar septos em alguns representantes. Sua reprodução pode ocorrer sexuadamente pela produção dos zigósporos, e assexuadamente, com a produção de esporos denominados esporangiósporos, esses produzidos no interior dos esporângios (ALTERTHUM, 2001; LOGUERCIO-LEITE, 2004).

O filo **Ascomycota** é o que tem maior número de espécies conhecidas até então, e justamente por conta de sua ampla diversidade, ainda não existe uma delimitação mais precisa das suas categorias taxonômicas superiores. Possuem hifas septadas e sua principal característica é a presença do asco, estrutura em forma de bolsa, no interior do qual são produzidos os ascósporos, esporos sexuais com forma, número e cor variáveis para cada uma das mais de trinta mil espécies que formam esse filo (ALTERTHUM, 2001; LOGUERCIO-LEITE, 2004).

No filo **Basidiomycota**, a maioria das espécies produz estruturas protetoras macroscópicas denominadas de basídio, e essa característica permite denominá-los de macromicetes. São encontrados geralmente em ambientes terrestres, com poucas espécies aquáticas. Sua reprodução pode ser assexuada por meio de brotação, fragmentação e pela produção de conídios, e sexuada pela produção de basidiósporos (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

O filo **Deuteromycota** é formado por fungos que possuem hifas septadas, que se reproduzem por hifas modificadas que formam os conídios, e esses, por sua vez, dão origem aos conidióforos, esporos responsáveis pelos processos de reprodução e resistência desse grupo de fungos (SILVA e COELHO, 2006).

1.5 ENDOFÍTICOS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Os primeiros relatos da presença de microrganismos endofíticos no interior de tecidos de plantas datam do final do século XIX (MUNDT e HINKLE, 1976). Em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de *Lolium temulentum* L., e esta descoberta desencadeou uma série de estudos, por vários pesquisadores da época, sobre novos fungos, principalmente ascomicetos, vivendo no interior de gramíneas sem, contudo, causar qualquer dano aparente (WHITE JR, MARTIN e CABRAL, 1996). Trabalhos mais direcionados ao tema começaram a aparecer em número considerável a partir de 1940, com muitos relatos sobre microrganismos isolados de tecidos vegetais saudáveis. As investigações aumentaram consideravelmente no final da década de 70, com a verificação de que esses microrganismos endofíticos apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas que os albergam contra o ataque de insetos, de doenças e de mamíferos herbívoros (AZEVEDO, 1999).

Na década de 90, as pesquisas focaram nos efeitos benéficos que a aplicação dos fungos endofitos poderiam gerar nas plantas, como por exemplo, o aumento da produção de grãos e a redução da severidade de várias doenças. Estudos também versaram sobre a diversidade de plantas servindo como reservatório de material genético, abrigando microrganismos endofíticos (CLAY, MARKS e CHEPLICK, 1993; McINROY e KLOEPPER, 1995).

O melhor conhecimento desses microrganismos e uma melhor compreensão de sua interrelação com seu hospedeiro tem permitido um aperfeiçoamento em seu conceito, primeiramente podia-se adotar que fungos endofíticos são aqueles que podem ser isolados de material vegetal desinfestado superficialmente, e que não causam danos à planta (PETRINI, 1991). Também como microrganismos que habitam, ao menos em um período de seus ciclos de vida, o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ou produzir estruturas externas (AZEVEDO et al., 2000).

Foram citados também como aqueles microrganismos detectados em um momento particular, associados a tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável (SCHULZ e BOYLE, 2005), ou

Uma definição mais recente, proposta por Azevedo e Araújo (2007) é aquela que chama de microrganismos endofíticos todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultiváveis ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007). Dessa maneira, podem estar incluídos como microrganismos endofíticos colonizadores com comportamento neutro ou simbiote, e ainda aqueles que transitam colonizando ora de forma endofítica ora de forma epifítica (AZEVEDO, 1999).

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de uma planta a outra de duas maneiras. A primeira chamada de transmissão vertical é aquela em que esses microrganismos, presentes na planta-mãe, são transmitidos via semente, vivendo dessa forma, todo o seu ciclo de vida dentro da planta. A segunda é denominada de transmissão horizontal em que os fungos endofíticos são passados de uma planta a outra através da raiz, das folhas, através dos estômatos, ou por qualquer lesão existente na planta (AHLHOLM et al., 2002).

O que determina se um fungo é endofítico ou fitopatogênico é justamente o seu comportamento após a infecção, ou seja, que consequências esse microrganismo trará para a espécie hospedeira. Em resumo, os fitopatogênicos 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 (**Fig. 10**). Enquanto que 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 e HUCKELHOVEN, 2006).

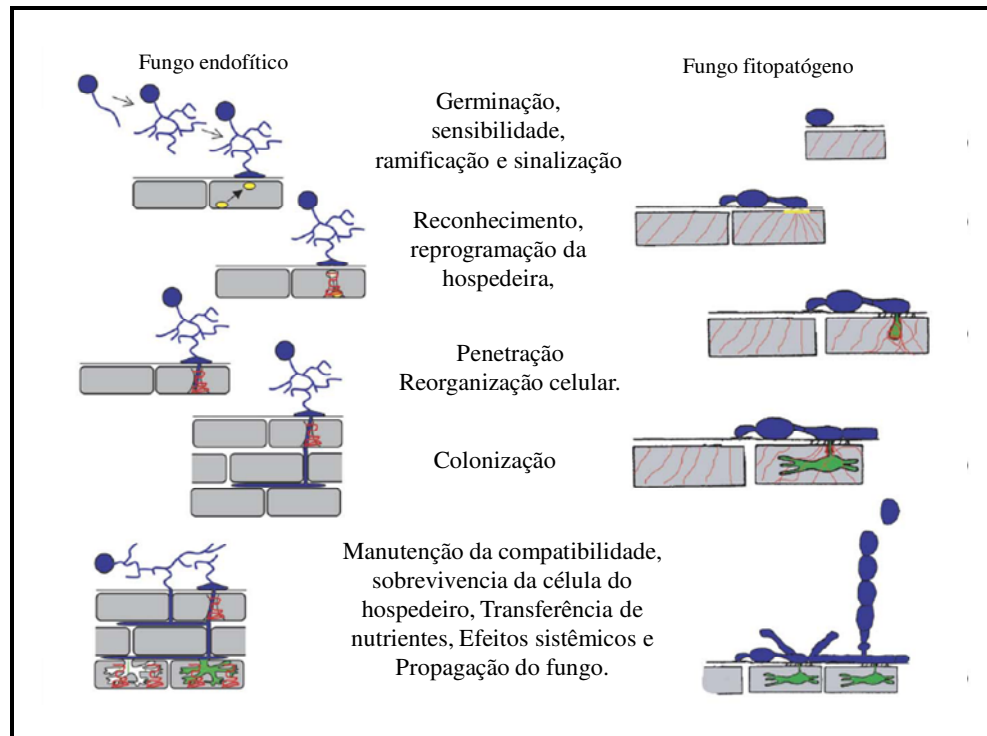


Figura 10: Comparação entre a infecção de um fungo endofítico e de um fitopatógeno. Adaptado de KOGEL, FRANKEN e HÜCKELHOVEN, 2006.

A estreita relação entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros faz com que sejam candidatos naturais a serem usados como agentes de controle de doenças. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, os microrganismos endofíticos apresentam potencial para o controle biológico (HALLMANN et al., 1997).

Os endofíticos são reconhecidamente úteis na agricultura e na indústria, sobretudo na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de novos genes de interesse em plantas (FAHEY, 1988; MURRAY, LATCH e SCOTT, 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (VOLKSCH, ULLRICH e FRITSCH, 1992; HALLMANN e SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD, ARAÚJO e STANFORD, 1998) e secundários de interesse, tais como o taxol, poderoso anticancerígeno (**Fig. 11**) (STIERLE, STROBEL e STIERLE, 1993; WANG et al., 2002; SU et al., 2000), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico (**Fig. 12**) (STROBEL, et al., 2004) e diversos outros antibióticos (LU et al., 2000; BRADY, BONDI e CLARDY, 2001; HOFFMAN et al., 2008; YU et al., 2010).

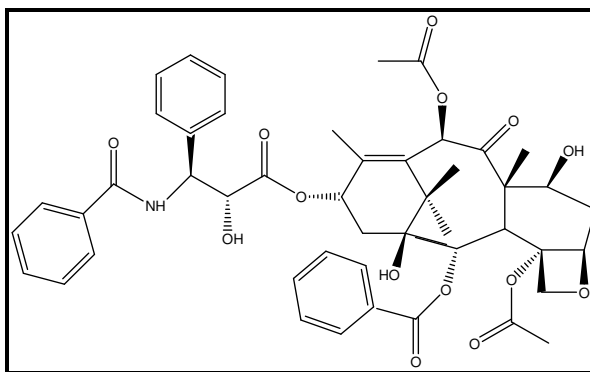


Figura 11: Estrutura química do taxol.

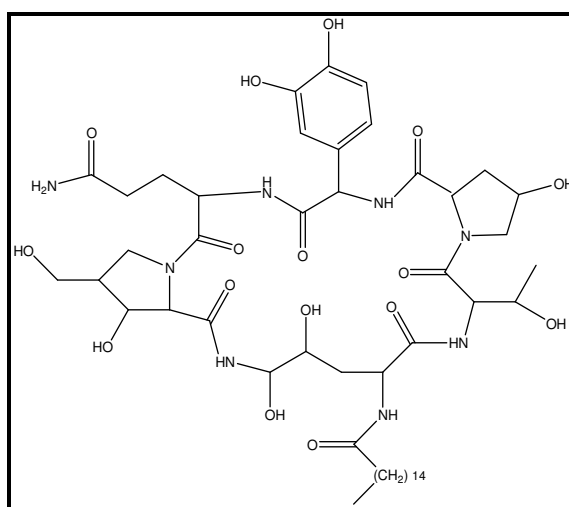


Figura 12: Estrutura química da cryptocandina.

Os fungos endofíticos se configuram como uma rica fonte de novas substâncias bioativas, com potencialidades totalmente desconhecidas e que podem beneficiar principalmente a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BASHYAL et al., 2005; GUNATILAKA, 2006). Dessa forma, a busca por fungos endofíticos encontra-se motivada porque hoje se sabe que esses microrganismos possuem a capacidade de conferir maior resistência à planta contra herbivoria (CLAY, MARKS e CHEPLICK, 1993), podem também conferir maior tolerância à seca para a planta hospedeira (WHITE JR. et al., 2002), aumentar o crescimento de raiz, produção de sementes e germinação (VILA-AIUB, GUNDEL e GERSA, 2005), bem como produzir substâncias bioativas como fitohormônios (YUE et al., 2000) e assim aumentar a competitividade do hospedeiro na natureza (TAN e ZOU, 2001).

Todas essas possibilidades só existem porque fungos endofíticos podem produzir metabólitos ativos que podem ser utilizados tanto pelos fungos quanto pela própria 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; DING et al., 2008;

EBEL et al., 2008; DEBBAB et al., 2009). Essas substâncias podem apresentar atividade antibacteriana (BRADY, BONDI e CLARDY, 2001; MA et al., 2004), citotoxicidade contra células tumorais (WANG et al., 2002; BASHYAL et al., 2005), atividade antimalárica (ISAKA et al., 2001) e atividade antifúngica (BRADY e CLARDY, 2000).

Alguns trabalhos mostram que vários fungos associados a plantas, como os pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Nocardiosis*, *Phomops*, *Fusarium* e *Colletotrichum*, são produtores de enzimas de interesse comercial como amilases, lipases, celulases e proteases (STAMFORD, ARAUJO e STAMFORD, 1998; MOREIRA et al., 1999; MAIA et al., 1999; CARVALHO et al., 2005; SILVA et al., 2006). A capacidade de produzir enzimas deixa claro que esses fungos possuem um grande potencial de exploração, sobretudo pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos. Outra importante capacidade conferida a fungos endofíticos é a de biotransformação. Trabalhos relacionados a este tema mostraram que espécies do gênero *Phomops*, *Colletotrichum*, *Penicillium* podem ser utilizadas como biotransformadoras em diversos processos (VERZA et al., 2009; ZANOTTO et al., 2009).

As possibilidades biotecnológicas dos fungos endofíticos parecem estar totalmente ligadas a sua interrelação com a planta hospedeira, uma vez que esses microrganismos podem produzir compostos de importância ecológica para as espécies vegetais. É o caso da produção de alcalóides, observado no trabalho de Tan et al. (2008). Neste recente trabalho foi relatado que a espécie de *Penicillium* sp. IFB-E022, isolada de *Quercus variabilis* é capaz de produzir penicidonas (**Fig. 13**), alcalóides com potencialidades farmacológicas (TAN et al., 2008).

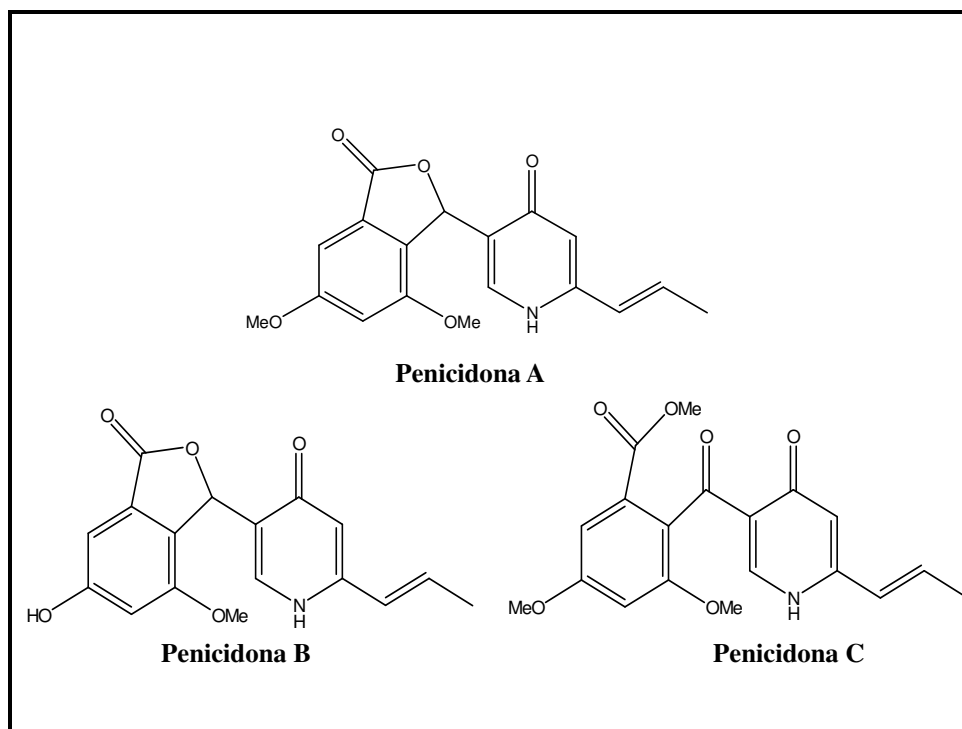


Figura 13: Estrutura química da penicidona A, B e C.

A síntese de alcalóides por fungos não é nenhuma novidade, mas as diversas aplicabilidades que essa classe de compostos possui torna tal informação importante, principalmente para a biotecnologia na obtenção de novos fármacos (PANACCIONE; SCHARDL e COYLE, 2006; TAN et al., 2008).

Com todas as potencialidades biotecnológicas, o estudo de fungos endofíticos no Brasil e, principalmente, na Amazônia necessita que os especialistas das áreas de taxonomia de fungos, geneticistas, ecologistas e químicos de produtos naturais trabalhem em conjunto no intuito de desenvolver estratégias mais eficientes, tanto de isolamento de fungos endofíticos, quanto de obtenção dos seus metabólitos de interesse.

1.6 ANTIMICROBIANOS OBTIDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Em se tratando especificamente da obtenção de compostos com atividade antimicrobiana, os fungos endofíticos têm se mostrado fontes promissoras devido estarem presentes nos mesmos microhabitats de patógenos de plantas, o que lhes possibilitou ao longo dos anos, em função da competição com esses patógenos, a produção de compostos com essa bioatividade. Esses compostos mostram-se capazes de inibir o crescimento tanto de bactérias quanto de fungos, sejam eles patogênicos ao homem ou fitopatógenos. É importante ressaltar que a possibilidade de se obter um composto antimicrobiano torna-se viável, devido à diversidade de espécies de microrganismos presentes nas plantas. É justamente essa interrelação fungo-planta que lhes possibilita a síntese dessa gama tão diversa de substâncias (ZOU et al., 2000; STROBEL e EZRA, 2003; STROBEL et al., 2003; STROBEL e DAISY, 2003; TAN et al., 2004; ARAÚJO et al., 2005).

Um exemplo de moléculas antimicrobianas são as periconicinas A e B (**Fig. 14**), diterpenos obtidos a partir de um fungo endofítico isolado da espécie *Taxus cuspidata*. Esse fungo pertence ao gênero *Periconia* (*Periconia* sp.), o que reforça a idéia de que esses microrganismos endofíticos fazem parte de uma enorme diversidade de espécies, que podem ser utilizadas na obtenção de antibióticos (KIM et al., 2004).

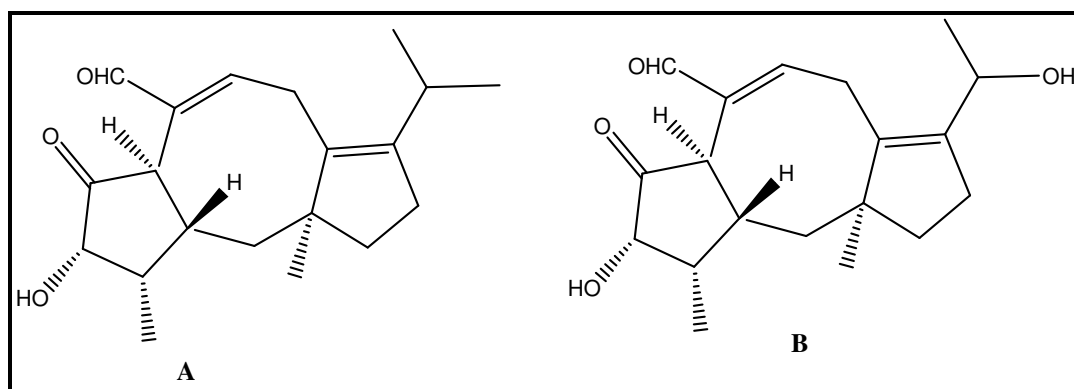


Figura 14: Estrutura química da periconicinas A e B.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm reforçado a idéia de que fungos endofíticos são uma fonte verdadeiramente valiosa para a obtenção de compostos antimicrobianos, sobretudo porque estes podem ter significativa aplicabilidade não somente na medicina, mas também na agricultura no combate à fitopatógenos (HERTWECK et al., 2010; YU et al., 2010).

A maioria dos fungos endofíticos produtores de compostos antimicrobianos foram isolados de espécies vegetais conhecidas como plantas medicinais, o que indica que a escolha da espécie vegetal hospedeira é um fator relevante, e que deve ser levado em conta quando o objetivo do trabalho é a obtenção de compostos com esse tipo de bioatividade (YU et al., 2010). A **Tabela 1** ilustra algumas das substâncias isoladas, identificadas e com atividade antimicrobiana comprovada obtidas de fungos endofíticos nos últimos cinco anos.

Tabela 1: Plantas das quais foram isolados fungos endofíticos e as substâncias com atividade antimicrobiana por eles produzidas.

Hospedeira	Fungo endofítico (Referência)	Substância	Frente
- <i>Cynodon dactylon</i>	- <i>Aspergillus sp</i> (TAN et al., 2005)	- Ácido helvólico - Monometilsulocrina	- <i>Helicobacter pylori</i>
- Não foi descrita	- <i>Phomopsis</i> (ANKE et al., 2007)	- Cerulenina	- <i>Candida albicans</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i>
- <i>Quercus variabilis</i>	- <i>Cladosporium sp.</i> (CHENG et al., 2007)	- Brefeldina A	- <i>C. albicans</i> - <i>Aspergillus niger</i>
- <i>Urospermum picroides</i>	- <i>Ampelomyces sp.</i> (EBEL et al., 2008)	- Altersolanol A	- <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>
- <i>Saurauia scaberrinae</i>	- <i>Phoma pinodella</i> (HOFFMAN et al., 2008)	- Phomodiona	- <i>S. aureus</i>
- Não foi descrita	- <i>Pestalotiopsis fici</i> (CHE et al., 2009)	- Pestalofona C	- <i>A. fumigatus</i>
- <i>Bidens pilosa</i>	- <i>Botryosphaeria rhodina</i> (HERTWECK et al., 2010)	- Botriorodina A	- <i>A. terreus</i>

O metabolismo secundário dos fungos permite a síntese de algumas classes de compostos de interesse. Em se tratando especificamente de fungos endofíticos, o ambiente desses microrganismos, ou seja, os tecidos da planta hospedeira, possibilita “matéria prima” para a produção de substâncias de interesse para a biotecnologia. Dentre as classes de compostos produzidos por fungos endofíticos estão alcalóides (WICKLOW et al., 2005; GAO

et al., 2009), quinonas (AKIMENKO e MEDENTSEV, 1998) e terpenóides (ARAÚJO, et al., 2006), alguns desses com significativa atividade antimicrobiana.

Espécies vegetais Amazônicas têm se mostrado boas fontes de fungos endofíticos, sendo que alguns trabalhos demonstraram que esses microrganismos amazônicos, produzem compostos com atividade biológica de interesse, como atividade antimicrobiana frente à cepas patogênicas ou como controle biológico de doenças (SOUZA et al., 2004; HANADA. et al., 2010). Ainda são poucos os trabalhos com esse tema direcionados a espécies pertencentes à família Myrtaceae, apesar dessa família possuir numerosas espécies por todo o Brasil e muitas dessas presentes na Amazônia Brasileira (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; MARCHIORI e SOBRAL, 1997).

Dessa forma, esse tipo de investigação além de contribuir com a elucidação de novos compostos para a indústria farmacêutica, o que já confere a ela um papel importante, pode também ajudar no desenvolvimento de setores como a agroindústria, pela descoberta de novas substâncias que combatam pragas, tais como bactérias e fungos fitopatogênicos. Enfim, o conhecimento acerca das reais potencialidades dos fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* torna-se importante na proposta em questão, uma vez que existe todo um arcabouço de possibilidades a serem investigadas.

2. JUSTIFICATIVA

A biodiversidade amazônica vem, ao longo dos anos, sofrendo com a implementação de práticas exploratórias nada sustentáveis como desmatamento e/ou queimadas, para exploração da madeira, de minérios, para a criação de gado, para construção de rodovias ou de hidroelétricas. Fato é que esse modo de exploração reduz de forma significativa a riqueza biológica da região amazônica. Sendo assim, torna-se fundamental a manutenção das espécies vegetais amazônicas através da implementação de práticas exploratórias sustentáveis, e a comprovação de que grande parte de sua riqueza está sendo destruída de forma leviana e inconseqüente. Assim, busca-se nesse trabalho a comprovação de que em uma determinada espécie da savana amazônica, *Myrcia guianensis*, estão guardados em sua carga genética, ou na sua interrelação com seus fungos endofíticos, informações importantes do ponto de vista científico, tecnológico e econômico.

A espécie vegetal em questão pode não só ser a geradora de um produto de interesse, um composto com atividade antimicrobiana, como também pode albergar microrganismos de grande interesse biotecnológico, como fungos endofíticos. Logo, fica clara a necessidade de um melhor entendimento dos fitoconstituintes da planta, de suas possibilidades farmacêuticas e/ou industriais, assim como a elucidação de questões da sua ecologia, como, por exemplo, a interação com seus fungos endofíticos.

A interação endófito/planta ainda não é muito clara para essa espécie vegetal, ou para a grande maioria de espécies tropicais brasileiras. Sendo assim, esse trabalho visa contribuir para o entendimento da relação fungo/planta das espécies amazônicas. O simples fato de não se conhecer os detalhes da interação fungo/planta para essa espécie vegetal, já seria justificativa suficiente para a realização desse trabalho, tamanha a importância ecológica da espécie em questão. Além disso, o estudo dos fungos endofíticos dessa espécie pode levar a outras aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas e a utilização dos fungos na biotransformação de moléculas bioativas. O trabalho também pode contribuir para a comprovação da riqueza de espécies que formam a biodiversidade amazônica, haja vista que não está descartada a possibilidade de se obter fungos endofíticos de espécies ainda não descritas. Dessa forma, essa pesquisa se propôs como uma perspectiva científica para entender a relação planta microrganismos de espécies amazônicas e prospectar potenciais moléculas bioativas

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os metabólitos secundários, com ênfase na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos das folhas de *Myrcia guianensis*, assim como os extratos dos fungos endofíticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos etanólico, metanólico, hexânico e acetato de etila das folhas de *M. guianensis* e determinar a atividade antimicrobiana;
- Obter o óleo essencial das folhas de *M. guianensis* e determinar a atividade bactericida e/ou fungicida;
- Isolar e analisar a diversidade dos fungos endofíticos presentes no caule, folha e raiz de *M. guianensis*;
- Testar a atividade bactericida e fungicida dos metabólitos secundários obtidos dos fungos endofíticos isolados;
- Determinar a Dose Mínima Inibitória e Dose Mínima Bactericida e/ou Fungicida dos metabólitos secundários obtidos dos fungos endofíticos isolados;
- Iniciar a identificação das substâncias com atividade antimicrobiana, isolada dos metabólitos dos fungos endofíticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As coletas foram realizadas em uma área de savana amazônica, localizada na comunidade de São Pedro no Município de Santarém no Estado do Pará. No momento da coleta foram produzidas exsicatas das partes aéreas da planta para confirmação da espécie, assim como foram obtidas as coordenadas geográficas: latitude $02^{\circ}32'08.9''S$ e longitude $54^{\circ}54'23.9''W$, com altitude aproximada de 19 metros em relação ao nível do mar (**Fig. 15**). A identificação da planta foi realizada no Herbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas

da Amazônia) onde ficou depositada uma exsicata código n^o 181913, e também no Herbário

da Universidade Federal do Oeste do Pará - Campus de Santarém, sob a responsabilidade da Professora MSc. Chieno Shuemitsu.

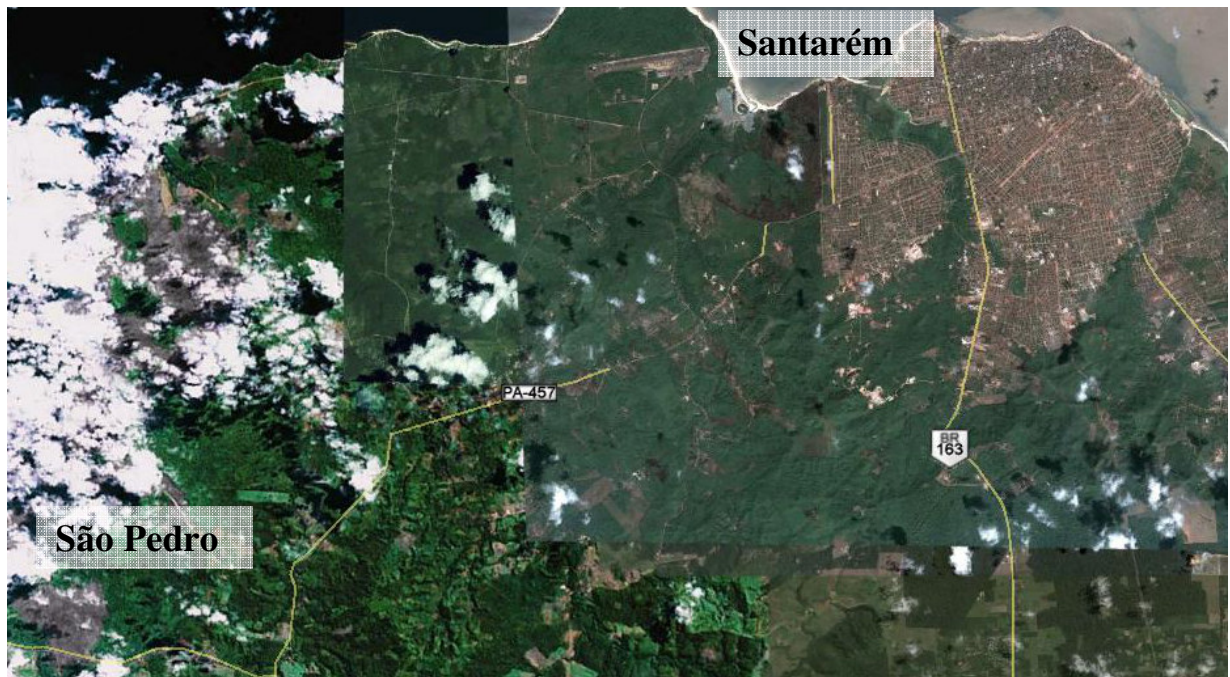


Figura 15: Localização da área da coleta da planta. Comunidade de São Pedro, em baixo, à esquerda. Cidade de Santarém, em cima, à direita.

A coleta das partes da planta, tanto para obtenção dos extratos e do óleo essencial, quanto para o isolamento dos fungos, foi feita no período chuvoso amazônico, no mês de fevereiro. Foram selecionadas, para isso, três espécimes de *M. guianensis*. No ato da coleta (**Fig. 16**), o material vegetal colhido para isolamento dos endofíticos (raiz, caule e folha) foi limpo com água destilada autoclavada, armazenado em sacos plásticos estéreis, mantido à temperatura de aproximadamente 6°C e identificados com data e hora da coleta. O material colhido para obtenção dos extratos e do óleo essencial foi acondicionado em sacos plásticos e também identificados com local e data de coleta. O material coletado para o isolamento dos fungos endofíticos foi transportado para o laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), em Manaus.



Figura 16: Planta *M. guianensis*, coletada na comunidade São Pedro, Santarém-PA.

O material vegetal coletado para obtenção dos extratos e óleo essencial foi levado ao Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará, em Santarém. Foram colhidos aproximadamente 1,42 kg das partes aéreas da planta. Após a retirada de pequenos galhos e folhas inadequadas para a extração, o material vegetal resultou em 1,38 kg. Essas folhas foram secas em estufa a 38°C durante 3 dias. Foram então transportadas até o Laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Escola Superior de Ciências da Saúde da

Universidade do Estado do Amazonas (UEA), em Manaus, onde foram moídas em moinho de facas e armazenadas para as extrações.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DA PLANTA

O processo de extração do óleo essencial foi realizado no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em Manaus, e para isso foram pesadas 300 g das folhas previamente selecionadas, secas e trituradas. Esse material vegetal passou então por processo de hidrodestilação na proporção 1:10 (p/v), processo que consiste em evaporar uma mistura de vapor-d'água e componentes voláteis presentes na matéria-prima vegetal, utilizando-se para isso aparelho do tipo Clevenger (MECHKOVSKI e AKERELE, 2002). O óleo essencial obtido foi, então, armazenado em temperatura de aproximadamente 4°C até a realização dos testes de atividade antimicrobiana.

Foram pesados 250 g do pó da planta, para cada um dos solventes utilizados na extração. Foram, então, transferidos a um vidro de extração âmbar e em seguida adicionou-se o solvente na proporção de 1:3 p/v, dando início assim ao processo de maceração. Depois de 3 dias, o sobrenadante foi filtrado para um frasco âmbar utilizando-se funil e papel filtro (Watman), obtendo-se dessa forma um extrato límpido. O processo de preparo dos extratos brutos das folhas de *M. guianensis* está representado esquematicamente na **Figura 17**.

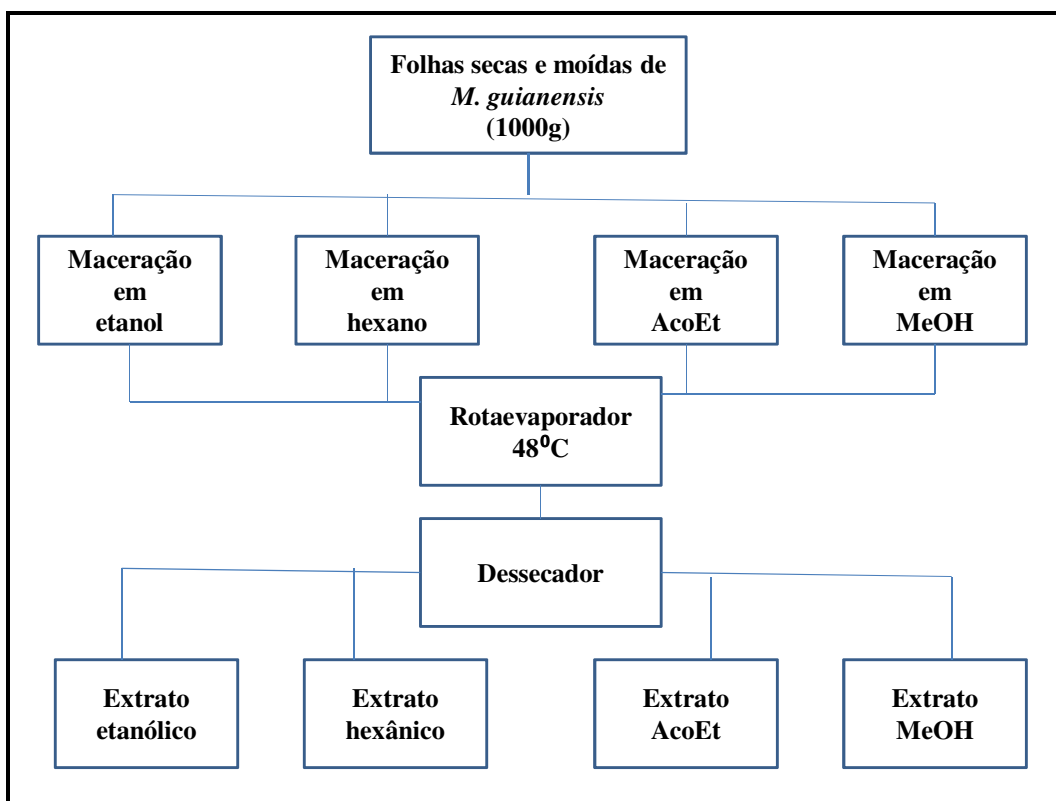


Figura 17: Fluxograma de obtenção dos extratos da planta.

O filtrado foi submetido ao evaporador rotativo com pressão reduzida em temperatura de aproximadamente 48°C para evaporação do solvente, resultando em um extrato bruto viscoso. Os extratos foram transferidos para um tubo de penicilina e levados ao dessecador para secagem completa. Então, foram armazenados em temperatura de aproximadamente 4°C até a realização dos testes para avaliação da atividade antimicrobiana.

4.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.3.1 Desinfecção Superficial

Para o início do isolamento foi necessário eliminar a comunidade microbiana externa, mantendo viável a comunidade interna do material vegetal. As amostras vegetais coletadas foram lavadas em água corrente com detergente neutro, cortadas em fragmentos de 10 a 12 cm e submetidas a uma seqüência de submersões em diferentes soluções na seguinte ordem e tempo:

Para as **folhas** - álcool a 70% por 1 minuto; hipoclorito de sódio 3% por 2,5 minutos; novamente álcool a 70% por 30 segundos; e água destilada estéril por 2 minutos.

Para **raiz** e **caule** - álcool a 70% por 1 minuto; hipoclorito de sódio 4% por 3 minutos; álcool a 70% por 30 segundos; e água destilada estéril por 2 minutos. Os fragmentos de raiz e caule foram ainda divididos em partes interna e externa para posterior inoculação. Como contra-prova de esterilização superficial foram semeadas em meio ágar-batata-dextrose (BDA), alíquotas de água (50 µL) da última lavagem dos fragmentos vegetais, sendo submetidas a uma temperatura de 18°C por 15 dias (ARAÚJO et al., 2002).

4.3.2 Inoculação dos Fragmentos Vegetais

Após a desinfecção superficial, o material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos de aproximadamente 6 mm² e inoculados em placas de Petri contendo meio BDA estéril, acrescido de antibiótico amoxicilina 0,5 g/L, 9 fragmentos em cada placa.

As placas contendo os fragmentos foram mantidas em incubadora sob temperatura de 18°C por 15 dias. Nesse período, os fungos que apresentavam crescimento foram isolados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. A seguir, os fragmentos foram mantidos por mais 15 dias sob 26°C, e durante esse período também foram isolados novos fungos, conforme observação macroscópica do crescimento dos fungos (ARAÚJO et al., 2002).

A taxa de colonização fúngica foi observada por avaliação macroscópica dos microrganismos isolados, considerando:

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

Em que TC é a taxa de colonização fúngica e esta é obtida pela razão entre o número de fragmentos vegetais com crescimento fúngico e o número total de fragmentos vegetais plaqueados.

4.3.3 Purificação e Conservação dos Fungos Endofíticos

A técnica de purificação foi realizada com a obtenção de fragmentos do meio sólido contendo as hifas das linhagens com aproximadamente 4x4 mm e semeio em tubo de ensaio com meio BDA inclinado, com auxílio de uma alça de platina. O meio utilizado para purificação foi o mesmo que foi utilizado na inoculação inicial, para permitir a manutenção das características de cada fungo (ARAÚJO et al., 2002). Nessa etapa do trabalho foram observadas as características macromorfológicas dos fungos isolados, o que possibilitou agrupá-los preliminarmente.

Dos fungos crescidos em tubos com meio de cultura inclinado, foram retirados fragmentos do meio contendo a colônia isolada e inoculados em placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura, colocando três fragmentos em cada placa. Dessa forma, foi possível identificar as características de crescimento de cada fungo (ARAÚJO et al., 2002).

Os fungos endofíticos isolados foram, a partir daí, conservados utilizando-se os métodos: de tubo com meio de cultura inclinado submerso em óleo mineral; método de Castellani (1939), no qual o fragmento da colônia com meio é colocado em água estéril dentro de frascos fechados; em microtubo tipo eppendorf de 2 mL contendo glicerol 15%; e em placa de Petri pequena contendo meio BDA. Os tubos, frascos e placas com os isolados foram identificados com o código da coleção e data de armazenamento, e mantidos a 4°C e/ou em temperatura ambiente, de aproximadamente 25°C.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS

Os isolados foram parcialmente identificados taxonomicamente por morfologia (Taxonomia clássica). A primeira parte da identificação dos fungos foi feita por meio da análise macroscópica das características dos fungos, e a segunda pela análise microscópica das estruturas reprodutivas, estruturas de resistência ou morfologia das hifas, a partir de microcultivo.

Foram consideradas características das culturas: cor, textura, topografia, pigmento difuso, cor do verso da colônia e topografia do verso da colônia. Foi retirado um fragmento da colônia isolada e colocado em uma lâmina previamente esterilizada em autoclave para realização do microcultivo. As estruturas foram coradas com lactofenol blue cotton e observadas ao microscópio óptico em um aumento de 400x. Foram observadas as septações das hifas, cor, esporos, presença de estrutura de resistência e ramificações (ARAÚJO et al., 2002).

4.5 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para obtenção dos meios metabólicos dos fungos endofíticos, os isolados foram previamente selecionados de forma que no mínimo 20% dos morfotipos de cada grupo morfológico foram inoculados. Inoculou-se um fragmento de aproximadamente 5x5 mm, em triplicata, em frascos erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis (SOUZA et al., 2004). Os frascos foram incubados em incubadora tipo shaker de 8 até 11 dias, sob temperatura de aproximadamente 28°C e agitação de 120 rpm. Após o cultivo, o meio metabólico foi primeiramente filtrado a vácuo em funil de Buchner para separação do micélio, seguindo-se filtração em membrana milipore 22 µm. O meio líquido foi, então, armazenado em temperatura de aproximadamente 4°C para posterior utilização nos testes biológicos. Todos os morfotipos selecionados, espécime de origem, tecido, grupo morfológico e tempo de cultivo estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Linhagens de fungos endofíticos selecionadas para cultivo e obtenção do meio líquido metabólico.

Nº	LINHAGEN	ESPÉCIME DE ORIGEM	TECIDO DE ORIGEM	GRUPO MORFOLÓGICO*	TEMPO DE CULTIVO (DIAS)
1	MgF2 2.3	2	Folha	G1	8
2	Mg R2 2.2	2	Raiz (Córtex)	G1	8
3	Mg F1 3.3	1	Folha	G1	8
4	MgF3 3.3	3	Folha	G1	8
5	MgC1 3.3	1	Caule (Córtex)	G1	8
6	Mg F3 3.1	3	Folha	G1	8
7	Mg F2 3.3	2	Folha	G1	8
8	Mg C1 1.1	1	Caule (Córtex)	G1	8
9	Mg F2 2.1	2	Folha	G1	8
10	Mg F2 1.2	2	Folha	G1	8
11	Mg Ce2 2.3	2	Caule (Casca)	G1	8
12	Mg F3 2.1	3	Folha	G1	8
13	Mg F2 1.3	2	Folha	G1	8
14	Mg Ce3 3.1 (A)	3	Caule (Casca)	G2	8
15	Mg Ce1 3.2	1	Caule (Casca)	G2	8
16	Mg C2 3.2	2	Caule (Córtex)	G2	8
17	MgRe1 1.1	1	Raiz	G2	11
18	Mg F1 2.1	1	Folha	G2	8
19	Mg F 3.3.1 (B)	3	Folha	G2	8
20	Mg F 3.3.1 (A)	3	Folha	G2	8
21	Mg F 1.2.1	1	Folha	G2	8
22	Mg Re1 3.2	1	Raiz (Casca)	G3	11
23	Mg C3 2.2	3	Caule (Córtex)	G3	11
24	MgC2 2.1	2	Caule (Córtex)	G3	8
25	MgRe2 1.1	2	Raiz (Casca)	G3	8

26	MgC1 2.3	1	Caule (CórteX)	G4	8
27	MgF2 3.3	2	Folha	G4	11
28	MgRe3 3.1	3	Raiz (Casca)	G5	8
29	MgCe3 3.1	3	Caule (Casca)	G5	8
30	MgCe2 2.1	2	Caule (Casca)	G6	8
31	MgCe2 2.3B	2	Caule (Casca)	G6	8
32	Mg R 2.1.1	2	Raiz (CórteX)	G7	8
33	Mg Re2 2.3 B	2	Raiz (Casca)	G7	8
34	MgF2 1.3	2	Folha	G8	8
35	MgF1 2.2	1	Folha	G8	8
36	MgC2 3.2	2	Caule (CórteX)	G9	11
37	MgC2 2.3	2	Caule (CórteX)	G9	8
38	MgRe1 1.2	1	Raiz (Casca)	G10	8
39	MgRe1 3.2	1	Raiz (Casca)	G10	8
40	MgC2 3.3	2	Caule (CórteX)	G10	8
41	MgF2 2.1	2	Folha	G11	8
42	MgCe 3 2.1	3	Caule (Casca)	G11	11
43	MgRe3 1.1	3	Raiz (Casca)	G12	8
44	MgF1 3.2 (A)	1	Folha	G12	8
45	MgF1 3.2 (B)	1	Folha	G13	8
46	MgF3 2.1	3	Folha	G14	8

*Grupos morfológicos definidos segundo suas características macro e micromorfológicas, descritas no item 4.4.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no LABGEMA (Laboratório de Genética de Microrganismos da Amazônia) na Universidade Federal do Amazonas.

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, dos extratos da planta, do meio metabólico e dos extratos dos micélios fúngicos foi feita de acordo com o método de difusão em ágar. Todos foram testados frente às cepas padrão de *Staphylococcus aureus*,

Bacillus cereus, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas auriginosa*, *Candida albicans* e *Penicillium avelani*.

Para todos os testes foram preparadas suspensões utilizando-se meio líquido Müller-Hinton para bactérias e Saboraud para fungos, no qual foram inoculados os microrganismos em questão. Essas misturas foram padronizadas na escala de *MacFarland* nº 3. Com auxílio de alça de Drigalski, as suspensões foram inoculadas por toda extensão da placa que continha os meios sólidos específicos. Foram feitos poços com 6 mm de diâmetro no meio de cultura de cada placa para adicionar 100 µL do meio metabólico dos fungos, assim como os extratos e o óleo essencial da planta, previamente solubilizados em DMSO e água.

Para os testes de bioatividade os extratos da planta foram pesados em microtubos tipo eppendorf, sendo 3,0 mg e 5,0 mg de cada extrato, para serem solubilizados em DMSO e água até alcançarem a concentração de 2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL, respectivamente. Para os testes com o óleo essencial, este foi solubilizado em Tween 80 a 10% na proporção de 1:10 e 1:20, para garantir a difusão do óleo essencial pelo meio de cultura sólido. Para os testes realizados utilizando-se meio metabólico fúngico, os mesmos foram testados na forma bruta, não passando portanto por qualquer extração ou diluição. Como controle negativo, todas as linhagens foram testadas com o solvente em que os extratos e óleo foram solubilizados. Como controle positivo foram utilizados os antibióticos amoxicilina para as bactérias e cetoconazol para os fungos na mesma concentração dos extratos. Todos os testes foram realizados em triplicata, para que os dados coletados fossem analisados por testes estatísticos apropriados para verificação da veracidade dos dados obtidos.

As placas foram incubadas em aerobiose por 24 e 48 horas sob temperatura de 28 a 30°C. Os resultados positivos foram caracterizados pela presença de halo de inibição, ou seja, pela notória capacidade dos metabólitos da planta ou dos fungos em inibir o crescimento dos microrganismos teste. Os halos de inibição foram medidos com régua milimétrica e considerados como resultado positivo apenas os halos maiores que 9 mm, presentes em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA INIBITÓRIA

A partir dos resultados positivos apresentados nos testes iniciais foi possível, após a obtenção dos extratos fúngicos, determinar a Dose Mínima Inibitória (DMI), ou seja, a mais baixa concentração de extrato capaz de inibir a multiplicação das bactérias e fungos. A DMI foi avaliada pelo método de diluição em placa de ELISA com 96 poços.

Foram aplicados 150 μL de meio de cultura líquido (concentração dobrada) específico para cada microrganismo teste em cada um dos poços da 1ª linha da placa de ELISA. Em seguida, foram aplicados 150 μL do extrato fúngico, homogenizados com o meio de cultura e na sequência foi retirada uma alíquota de 150 μL para aplicação no poço seguinte, e assim sucessivamente. Após a preparação das diluições sucessivas, do poço A até o poço G (**Fig. 18**), foram inoculados 20 μL da suspensão contendo o microrganismo teste, do poço A até o poço H que não continha o meio fermentado. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os poços foram incubados a 32°C e após 24 e 48 h, foi verificado se houve ou não crescimento bacteriano ou fúngico. O crescimento dos microrganismos é caracterizado pela turbidez presente no meio de cultura. Dessa forma, foi possível avaliar até que diluição do extrato os microrganismos teste apresentavam susceptibilidade.

Diluição – []		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:2 – 1,0 g/mL	→ A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:4 – 0,50 g/mL	→ B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:8 – 0,25g/mL	→ C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:16 - 0,125g/mL	→ D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:32 – 0,625g/mL	→ E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:64 – 0,312g/mL	→ F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1:128–0,156g/mL	→ G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CON- 0 g/mL	→ H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 18: Representação esquemática do teste para determinação da DMI. CON – controle negativo.

4.8 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA BACTERICIDA

A Dose Mínima Bactericida (DMB) foi determinada como a mais baixa concentração de extrato capaz de matar uma população bacteriana ou fúngica, e foi obtida a partir dos resultados positivos para a determinação da Dose Mínima Inibitória. Para realização dos testes de DMB foi retirada, com alça de platina, uma alíquota da amostra que apresentava resultado positivo para os testes de DMI, e inoculada em placas de Petri contendo meios de cultura

específicos. As placas foram previamente identificadas de acordo com a diluição do extrato(**Fig. 19**) e incubadas em estufa a 32°C por 24h e 48h. A Dose Bactericida Mínima foi considerada a menor concentração dos extratos onde não houve crescimento celular sobre a superfície do meio de cultura inoculado (99,9% de morte bacteriana ou fúngica).

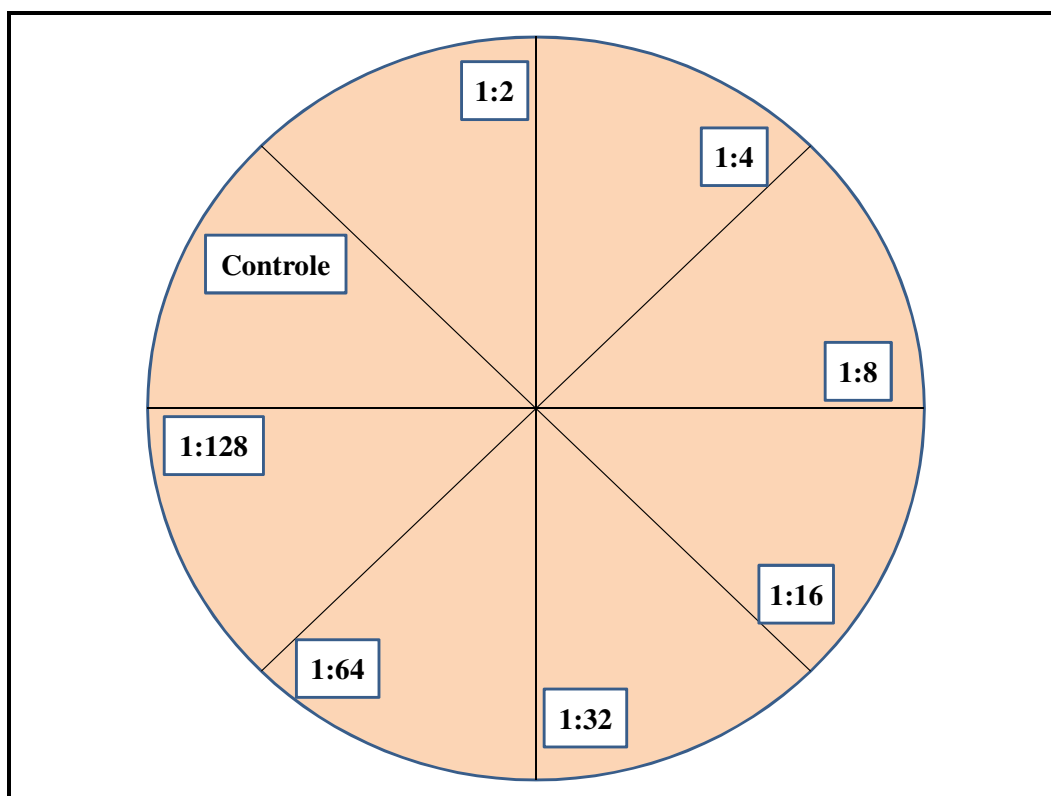


Figura 19: Representação esquemática do teste para determinação da DMB.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.9.1 Cultivo em Escala Preparativa

A linhagem fúngica mais promissora foi selecionada para realização de cultivo em escala preparativa, a fim de se obter uma quantidade de extrato suficiente para o início da identificação da(s) molécula(s) bioativa(s). Essa etapa foi realizada em duas condições distintas: 1 e 2. Na **condição 1**, 60 frascos erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis foram preparados, e nestes foram inoculados 5 fragmentos fúngicos de aproximadamente 5x5 mm, em cada um dos erlenmeyer. O cultivo foi mantido em temperatura ambiente de aproximadamente 24°C e em modo estático por 17 dias (**Fig. 20**). Decorrido esse período, os

meios metabólicos foram filtrados a vácuo em funil de Buchner e papel Whatman, para separação do micélio, o qual foi extraído com etanol PA, enquanto que o meio metabólico foi armazenado em frascos âmbar para as etapas de extração.



Figura 20. Cultivo em Escala Preparativa (condição 1).

Na **condição 2**, 75 frascos erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio líquido batata-dextrose (BD), acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis foram preparados, e nestes foram inoculados 3 fragmentos fúngicos de aproximadamente 5x5 mm, em cada um dos erlenmeyers. O inóculo foi cultivado em incubadora tipo shaker por 8 dias, em temperatura de 28°C e agitação de 120 rpm (**Fig. 21**).



Figura 21. Cultivo em Escala Preparativa (condição 2).

Após o cultivo, o meio metabólico foi primeiramente filtrado a vácuo em funil de Buchner e papel Whatman para separação do micélio, e o meio metabólico líquido foi armazenado em frasco âmbar para posterior extração. Foram separados, tanto do meio metabólico obtido sob agitação, quanto do estático, 1 L de meio para realização dos testes para verificar a presença de alcalóides.

4.9.2 Extração e Fracionamento do Meio Metabólico

Os meios metabólicos foram extraídos 3 vezes em funil de separação, com acetato de etila 1:1(v/v) e com acetato de etila-isopropanol 70/30 1:1(v/v) (**Fig. 22**), sendo em seguida concentrados em rotaevaporador. Os micélios foram macerados em etanol 3 vezes, filtrados, e também concentrados. Os extratos secos obtidos foram pesados e armazenados em temperatura de 4°C para posterior realização de novos testes de atividade antimicrobiana. Os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foram analisados por cromatografia em camada delgada para avaliação das possíveis similaridades entre seus componentes. Para essa análise, os extratos foram solubilizados em acetato de etila, e utilizou-se placa cromatográfica de sílica como fase estacionária. Como fase móvel foi utilizado acetato de etila: acetona (1:1) e para revelação da placa luz ultravioleta em 254 nm.

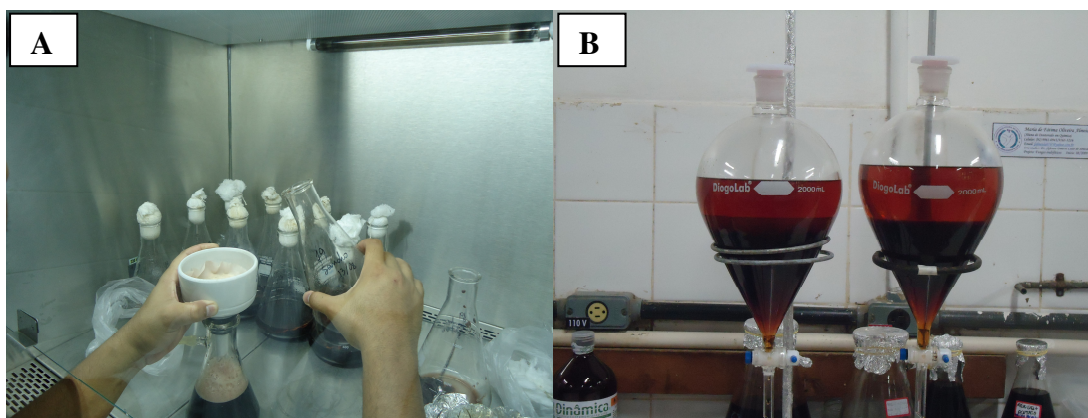


Figura 22. Filtração do meio metabólico líquido (A). Extração do meio metabólico líquido (B).

A partição que apresentou os melhores resultados, com relação à atividade antimicrobiana, foi submetida a fracionamento em coluna aberta de bancada, usando como fase estacionária sílica fase normal mesh 70-230 (flash). Foram utilizados como fase móvel diclorometano:acetato de etila (1:1) fração 1; acetato de etila 100% fração 2; acetato de etila:

acetona (1:1) fração 3; acetona 100% fração 4; metanol 100% fração 5 e metanol:água (8:2) fração 6. As frações foram testadas novamente para identificação das frações que continham a(s) substância(s) detentora(s) da atividade antimicrobiana.

4.9.3 Isolamento e Início da Identificação da(s) Molécula(s) Bioativa(s)

Para realização do isolamento da molécula bioativa, as frações que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram primeiramente analisadas por CLAE em equipamento analítico. Para a separação das substâncias que compunham as frações foi utilizada coluna Luna 5u C18 100A da Phenomenex, tamanho 250 mm x 4,6 mm, corrida isocrática com acetonitrina (ACN) 15% e 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). A partir dessa análise foi possível determinar as condições ideais de separação das substâncias que compunham as frações.

As frações também foram analisadas por Espectrômetro de Massas (EM), na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), a fim de comparar as massas dos íons moleculares presentes nas frações que apresentavam atividade antimicrobiana. Foi utilizado espectrômetro de massas THERMO (ionização por electrospray – ESI-MS), com scan de 100 a 1.000 m/z, em [M +H] e [M –H].

A etapa de obtenção das substâncias isoladas foi realizada por CLAE em equipamento semi-preparativo, com bomba LC-6AD, detector SPD-6A, coluna C18 Luna da Phenomenex, tamanho 250 mm x 21,20 mm. Durante a corrida, o fluxo foi de 21,3 mL/min. Foi utilizada corrida isocrática com acetonitrina (ACN) 15% e 0,1% de ácido trifluoracético (TFA).

As substâncias isoladas foram enviadas para análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) na Central de Análises da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), para o início da caracterização estrutural da(s) molécula(s) bioativa(s). Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foram obtidos em espectrômetro Varian (400 MHz), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta=0,00$) e DMSO deuterado como solvente.

4.10 TESTE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES

Foram utilizados para a avaliação da presença de alcalóides 2 L de meio metabólico obtidos em escala preparativa (1L da **condição 1** de cultivo e 1L da **condição 2** de cultivo).

Os meios metabólicos foram acidificados com HCl 0,1%, até pH de aproximadamente 4,0, e extraídos com éter etílico pela técnica de extração líquido-líquido em funil de separação. A fase aquosa separada foi então alcalinizada com NaOH até pH 8 e novamente extraído éter etílico, da fração orgânica foi separada em três porções de 3 mL e colocadas em três tubos de ensaio. Para verificar a presença de alcalóides adicionou-se 3 gotas dos reagentes de Hager, Dragendorff e Mayer nos três tubos, respectivamente. A formação de precipitado floculoso característico indica a presença de alcalóides.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. guianensis*

A extração realizada com os solventes orgânicos em 250 g das folhas de *M. guianensis*, conforme descrito no item 4.2, possibilitou a obtenção de 8,33 g de extrato bruto etanólico, com rendimento de 3,33%; de 7,75 g de extrato bruto hexânico, com rendimento de 3,1%; de 8,13 g de extrato bruto metanólico, com rendimento de 3,25%; e de 8,06 g de extrato bruto em acetato de etila, com rendimento de 3,22%. Para realização dos testes de atividade antimicrobiana de cada extrato, estes foram pesados e solubilizados de acordo com o item 4.6. Todos os extratos foram testados nas concentrações de 2,0 mg/mL e 4,0 mg/mL.

A hidrodestilação realizada para obtenção do óleo essencial das folhas de *M. guianensis*, de acordo com o item 4.2, possibilitou a aquisição de um volume total aproximado de 1,0 mL de óleo essencial, portanto, com rendimento de 0,33%.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS DE *M. guianensis*

Os resultados ensaios antimicrobianos realizados com os extratos etanólico (ET), hexânico (HE), metanólico (ME), acetato de etila (AE), e do óleo essencial (OE) de *M. guianensis* conforme o item 4.2, estão listados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana, dos extratos e do óleo essencial das folhas de *M. guianensis*.

Cepas teste	Extratos de <i>M. guianensis</i>								Óleo Essencial (v/v)		Controle		
	ET (mg/mL)		HE (mg/mL)		AE (mg/mL)		ME (mg/mL)				AMO (mg/mL)	CET (mg/mL)	CON
	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	2,0	4,0	1:10	1:20	2,0	2,0	
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	28,1±0,28	N	S
<i>P. aureuginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	37,0±1,0	N	S
<i>B. cereus</i>	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	43,6±0,57	N	S
<i>E. faecalis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	46,0±1,0	N	S
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	30,3±1,15	S
<i>P. avelani</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	43,3±0,57	S

ET - Extrato etanólico, HE - Extrato hexânico, AE - Extrato com Acetato de etila, ME - Extrato metanólico, AMO - amoxicilina, CET - Cetoconazol, CON - Controle negativo, S - Testes que não apresentaram atividade, N - Testes não realizados. Resultados expressos em mm, referentes ao diâmetro do halo de inibição.

Os extratos etanólico (ET), hexânico (HE) e acetato de etila (AE) de *M. guianensis* foram testados contra uma bactéria patogênica Gram negativa, *P. aeruginosa*, duas bactérias Gram positivas, *S. aureus* e *B. cereus* e contra dois fungos, *C. albicans* e *P. avelani*, enquanto que o extrato metanólico (ME) e o óleo essencial (OE) não foram testados contra *B. cereus* e *C. albicans*. Os extratos não apresentaram atividade contra nenhuma das cepas patogênicas testadas, nem na concentração de 2,0 mg/mL, nem na concentração de 4,0 mg/mL. O óleo essencial foi primeiramente testado na diluição de 1:20 em Twen 80 a 10%, e como não foi observado nenhum resultado positivo, optou-se por diminuir a diluição do óleo para 1:10. Mesmo nessa nova condição, o óleo essencial de *M. guianensis* não apresentou nenhuma atividade contra as cepas teste. Não foram realizados testes dos extratos em maior concentração que 4,0 mg/mL, pela possibilidade de ocorrência de falsos positivos. Além disso, concentrações maiores tornam inviáveis economicamente e fisiologicamente o desenvolvimento de um possível antibiótico.

Os resultados negativos observados nos testes de atividade mostram que através dos métodos utilizados para obtenção dos extratos e do óleo, não foi possível verificar atividade inibitória frente às cepas teste. Por conta disso, torna-se importante inferir a respeito de questões pertinentes que ajudem a compreender melhor os resultados do trabalho. Assim, inferir, por exemplo, sobre em que períodos do ano a coleta da planta deve ser realizada, tendo em vista que no período seco, de julho a outubro, por se tratar de um período de maiores desafios ambientais para a planta, esta possa produzir uma maior variedade de substâncias, visando sua defesa e sobrevivência, aumentando assim, a chance de se encontrar compostos com atividade antimicrobiana. Faz-se necessário, portanto, novas coletas em outros períodos do ano, a fim de testar novamente os extratos e o óleo essencial dessa espécie vegetal, além de se verificar as diferenças sazonais no metabolismo da planta.

Com relação ao óleo essencial, a questão da sazonalidade dos componentes do óleo é bem evidente, inclusive nos espécies pertencentes ao gênero *Myrcia* (CRUZ et al, 2007). Assim, a sazonalidade dos componentes do óleo essencial e a influência desses na bioatividade é um dos itens a ser investigado. Torna-se importante também inferir sobre o tecido da planta que foi utilizado para tal investigação, visto que, alguns trabalhos realizados mostram que para algumas espécies vegetais as substâncias bioativas, inclusive detentoras de atividade antimicrobiana, estão presentes em diferentes partes da planta (BORGES-ARGÁEZ et al., 2007). No presente trabalho foi utilizado apenas o óleo essencial extraído das folhas.

A opção de se utilizar em um momento inicial apenas extratos brutos, também pode ter comprometido a avaliação da atividade biológica, por conta desses extratos estarem

misturados em demasia com outros componentes celulares, e estes, por sua vez, podem de alguma maneira, impossibilitar uma melhor avaliação do potencial bioativo da planta. Neste sentido, torna-se importante realizar um fracionamento desses extratos para, a partir de então, realizar os testes biológicos. Logicamente, não está descartada a possibilidade dessa espécie vegetal não produzir substâncias com a capacidade antimicrobiana frente às cepas patogênicas utilizadas, mas se faz necessário uma abordagem mais detalhada dos componentes do metabolismo secundário dessa espécie, para que se possa afirmar tal questão, assim como utilizar outros patógenos nos testes.

5.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Para o isolamento dos fungos endofíticos de *M. guianensis* foram inoculados um total de 270 fragmentos vegetais, 45 de cada um dos três espécimes da planta, inoculados em duplicata. A origem e a distribuição dos fragmentos de cada um dos espécimes estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Distribuição dos fragmentos vegetais de *M. guianensis* inoculados de cada espécime.

	Folha	Córtex raiz	Casca raiz	Córtex caule	Casca caule
Nº de fragmentos	9	9	9	9	9

Após 48 horas de inoculação dos fragmentos da planta, os primeiros fungos começaram a ser retirados das placas e repicados para tubos inclinados contendo meio BDA (**Fig. 23**). Esse procedimento perdurou por 40 dias e ao final obteve-se um total de 156 fungos isolados, o que equivale a 57,7% do total de fragmentos inoculados. A contra prova de desinfecção superficial não acusou a presença de fungos epifíticos ou contaminantes.

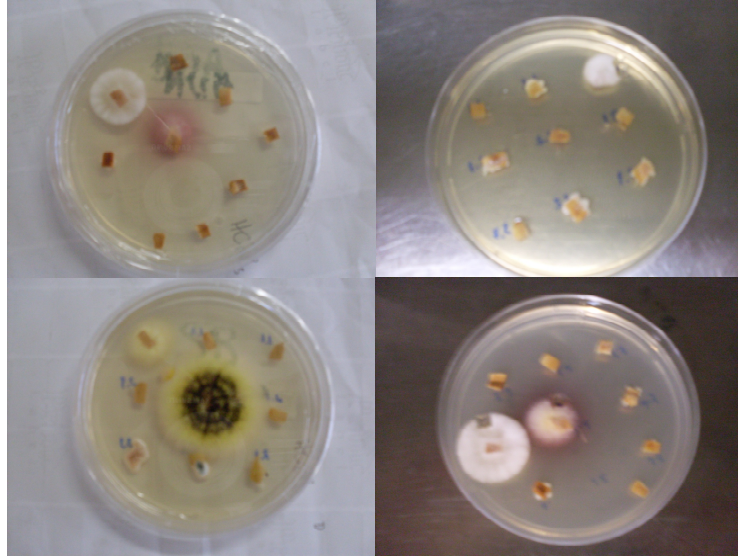


Figura 23: Fungos endofíticos em crescimento a partir de fragmentos de *M. guianensis*.

Todos os fungos isolados e repicados para os tubos receberam uma identificação própria (código), e para a elaboração do código foi levado em consideração o nome da planta *Myrcia guianensis* (Mg), a origem do fragmento de onde o fungo foi isolado (Folha-F, Córtex do Caule-C, Casca do Caule-Ce, Córtex da Raiz-R e Casca da Raiz- Re), o número do espécime (nº) de onde se isolou o fungo, e a posição do fragmento na placa (nº). Os fungos que cresceram de um mesmo fragmento vegetal foram identificados recebendo uma letra maiúscula diferente no final de seu código (A, B ou C).

Levando-se em consideração apenas a origem dos fragmentos de onde os fungos foram isolados, verificou-se que os fragmentos da casca do caule apresentaram um maior número de isolados (33%), enquanto que os do córtex da raiz apresentaram menor número de fungos (4%), como pode ser observado na **Figura 24**.

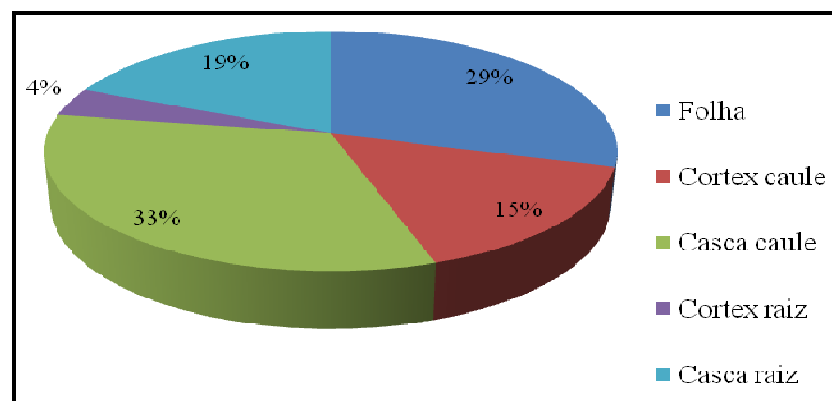


Figura 24: Percentagem de fungos endofíticos isolados das partes da *M. guianensis*.

Como pode ser observado na **Tabela 4**, o espécime 2 apresentou o maior número de fungos isolados (54), seguido pelo espécime 1 com 53 e do espécime 3 com 49. Para os três espécimes de *M. guianensis*, as partes da planta de onde se isolou o maior número de fungos foram da casca do caule com Taxa de Colonização (TC) média de 0,184, e da folha com TC média de 0,174. Para as demais partes da planta a Taxa de Colonização ficou abaixo de 0,122 (**Tab. 5**). O maior número de isolados na casca do caule (MgCe) e em folhas (MgF) pode estar relacionado com a maior exposição a que essas partes da planta estão sujeitas.

Tabela 5: Fungos endofíticos isolados por espécime de *M. guianensis*.

Partes da Planta	Espécime 1		Espécime 2		Espécime 3		Médias	
	nº de Isolados	TC	nº de Isolados	TC	nº de Isolados	TC	nº de Isolados	TC
F	15	0,166	19	0,211	13	0,144	15,66 (a)	0,173 (a)
R	0	0	3	0,033	2	0,022	1,66 (c)	0,018 (c)
Re	10	0,111	9	0,100	11	0,122	10,0 (b)	0,111(b)
C	11	0,122	7	0,077	6	0,066	8,0 (b)	0,088 (b)
Ce	17	0,188	16	0,177	17	0,188	16,66 (a)	0,184 (a)
Total	53	0,196	54	0,2	49	0,181	52,0	0,192 (a)

F – Folha; **R** – Córtex da raiz; **Re** – Casca da raiz; **C** – Cortéx do caule; **Ce** – Casca do caule; **TC** – Taxa de colonização. Médias de mesma letra indicam diferença não significativa, de acordo com teste de Tukey.

Os resultados demonstram que a *M. guianensis* é fonte de fungos endofíticos, tendo em vista a utilização de apenas um tipo de meio de cultura, e meio de cultura pouco rico em nutrientes como o BDA. Essa espécie vegetal mostrou-se hospedeira de um número total considerável de endófitos, cerca de 57,7% do total de fragmentos inoculados, e a ausência de microrganismos epifíticos ou contaminantes na contra prova de desinfecção superficial, corroboram com os resultados obtidos no isolamento.

Alguns trabalhos mostram que tanto folhas quanto caule são partes da planta hospedeira onde geralmente se encontra um número significativo de endofíticos (SURYANARAYANAN et al., 2009; GAZIS e CHAVERRI, 2010). Este fato, pode estar relacionado tanto com o modo como o endofítico penetra na planta, por transmissão vertical ou horizontal, quanto com a existência de condições favoráveis à permanência ou crescimento

do fungo em tecidos específicos (AHLHOLM et al., 2002; BRAND e GOW, 2009). É importante também lembrar que a etapa de desinfecção superficial deve ser específica para cada espécie vegetal e cada parte da planta, tendo em vista as diferenças entre os tecidos de cada planta.

Os três espécimes de *M. guianensis* mostraram similaridade no número de isolados nos mesmos tecidos da planta, mostrando em todos os três o número maior de isolados em folhas e casca do caule e uma menor quantidade de isolados na raiz, o que fortalece a idéia de que o isolamento está expressando o que realmente ocorre nos tecidos desta espécie vegetal, levando em consideração que o local de coleta foi o mesmo para os três espécimes.

A análise estatística das médias de fungos isolados em cada tecido mostrou não haver diferença significativa entre a média de isolados da casca do caule (Ce) e a média de isolados da folha (F), o mesmo acontecendo entre a média de isolados da casca da raiz (Ce) e do córtex do caule. Outra informação obtida com as diferenças entre as médias da TC para as diferentes partes da planta é evidenciada pela diferença entre a média da TC do córtex da raiz, (0,018) em comparação à média obtida na casca do caule (0,184). Tal informação deixa clara a importância da escolha do tecido vegetal quando se pretende isolar fungos endofíticos. Para a análise da eficiência do isolamento de endofíticos deve-se levar em consideração que muitas espécies de fungos não são cultiváveis e, portanto, o isolamento apenas expressa a frequência de fungos endofíticos cultiváveis e não o total de fungos endofíticos presentes na planta. Sem contar a influência das condições de isolamento: desinfecção superficial, meio de cultura, temperatura.

5.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ISOLADOS

A partir do isolamento, os fungos foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA, para observação de suas características macro e micro-morfológicas, e posterior conservação. A análise das características macro e micromorfológicas dos fungos isolados permitiu a distribuição destes em grupos. Foram obtidos 14 grupos, mostrando a diversidade de fungos associados a esta espécie vegetal (**Fig. 25**).



Figura 25: Diversidade de fungos endofíticos isolados de *M. guianensis*.

O número de representantes de cada grupo morfológico de fungos endofíticos isolados de *M. guianensis* está apresentado na **Tabela 6**.

Tabela 6: Grupos morfológicos de fungos endofíticos isolados de *M. guianensis*.

Grupos	Gêneros	Espécime 1	Espécime 2	Espécime 3	Total
G1	<i>Pestalotiopsis</i>	21	8	23	52
G2	<i>Phomopsis</i>	16	15	8	39
G3	<i>Aspergillus</i>	5	6	7	18
G4	<i>Xylaria</i>	2	4	2	8
G5	Desconhecido	2	2	4	8
G6	Desconhecido	0	8	2	10
G7	Desconhecido	0	4	0	4
G8	Desconhecido	1	2	0	3
G9	<i>Penicillium</i>	1	2	1	4
G10	Desconhecido	2	1	0	3
G11	Desconhecido	0	1	1	2
G12	Desconhecido	1	1	1	3
G13	<i>Fusarium</i>	1	0	0	1
G14	<i>Guignardia</i>	0	0	1	1

Entre 14 grupos formados, foi possível identificar 7 gêneros. *Pestalotiopsis* (**Fig. 26**), *Phomopsis* (**Fig. 27**), *Aspergillus* (**Fig. 28**), *Xylaria*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Guignardia* (**Fig. 29**). Um morfotipo dos 7 grupos formados por fungos não foi possível a identificação através de suas características macro e micromorfológicas, exemplificados na **Figura 30**.

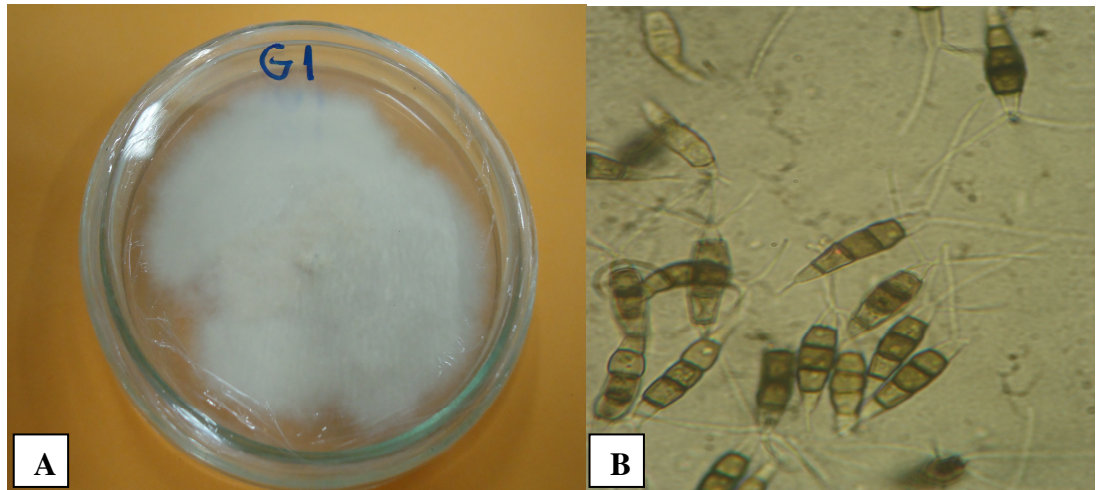


Figura 26. MgCe 2 3.1 – *Pestalotiopsis* sp (Grupo 1). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) esporos em objetiva de 40x.

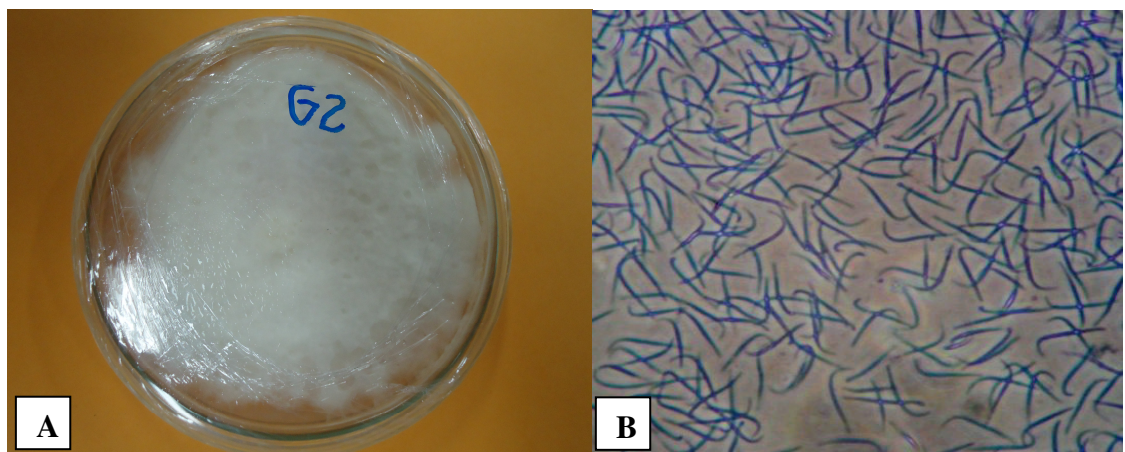


Figura 27: MgF 2 2.2 – *Phomopsis* sp. (Grupo 2). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) esporos em objetiva de 100x.

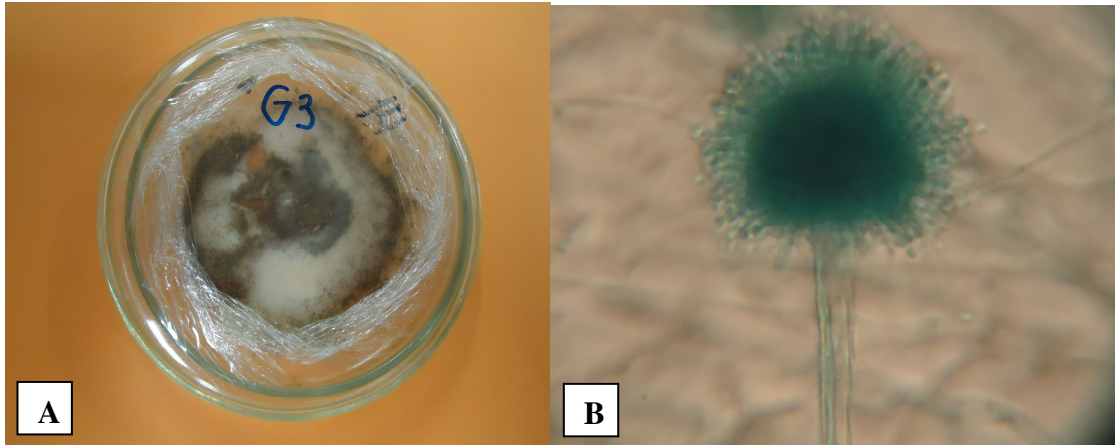


Figura 28: MgRe 1 1.1 – *Aspergillus* sp. (Grupo 3). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) estrutura reprodutiva (conidióforo) em objetiva de 20x.

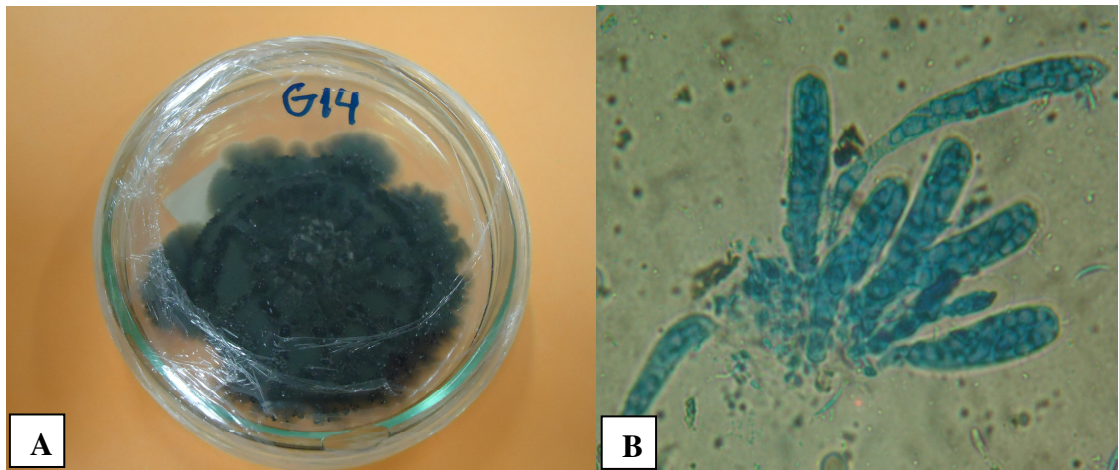


Figura 29: MgF3 2.1 – *Guignardia* sp. (Grupo 14). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) estrutura do micélio em objetiva de 20x.

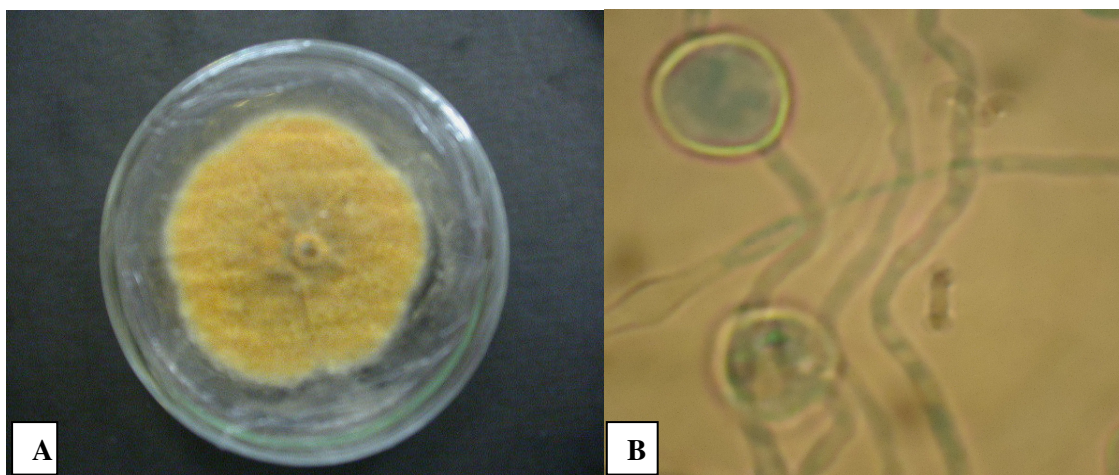


Figura 30: MgRe2 2.3B – Desconhecido. (Grupo 7). Em (A) cultura em placa de Petri. Em (B) estrutura do micélio em objetiva de 40x.

Os 14 grupos morfológicos foram avaliados em função do tecido vegetal em que foram encontrados (**Fig. 31**). Dessa maneira, foi possível avaliar as quantidades do fungos isolados em cada tecido vegetal de *M. guianensis*.

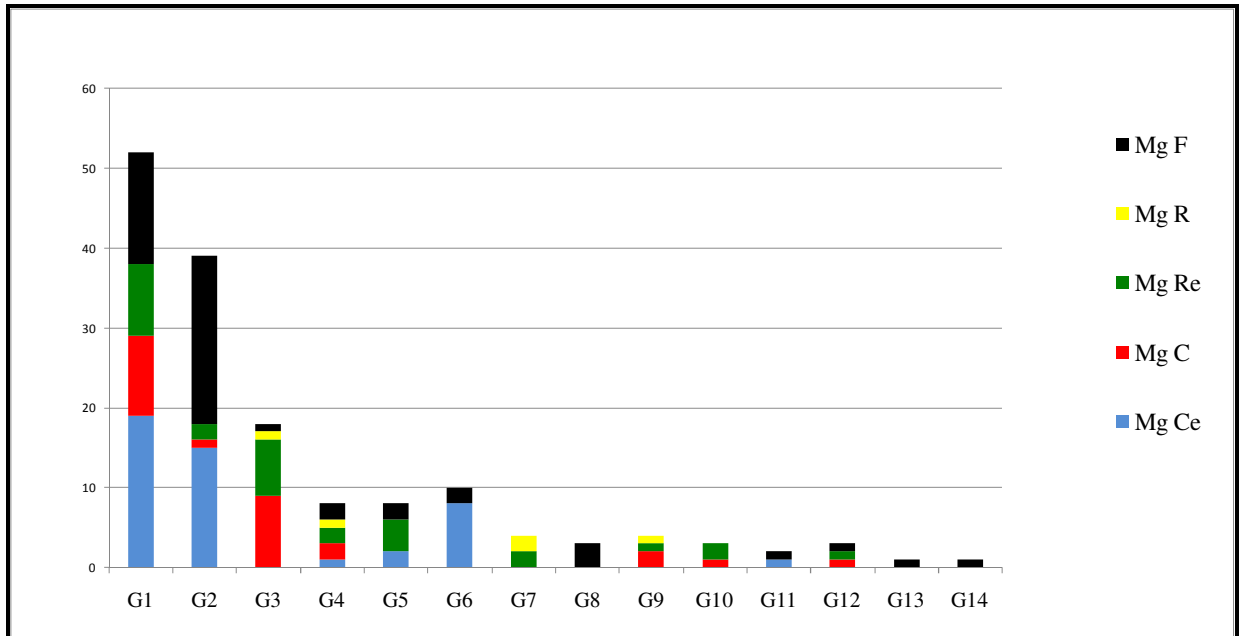


Figura 31: Grupos morfológicos (G1 – G14) de fungos endofíticos de *M. guianensis* em função do tecido vegetal em que foram isolados. MgF – fungos de folha, MgR – fungos do córtex da raiz, MgRe – fungos da casca da raiz, MgC – fungos do córtex do caule, MgCe – fungos da casca do caule.

Analisando o gráfico da **Figura 31**, pode-se perceber que os grupos morfológicos 1 e 2, grupos com maior número de isolados, formados pelos gêneros *Pestalotiopsis* e *Phomopsis*, são encontrados em quase todas as partes da planta, com exceção do córtex da raiz (Mg R). Essa informação pode ser um indício de que esses grupos de isolados de *M. guianensis* possuem importância ecológica para essa espécie vegetal. Os grupos 13 (*Fusarium*) e 14 (*Guignardia*) são formados por apenas um indivíduo cada, e ambos foram isolados apenas em folhas (MgF), o que pode ser indício de que esses microrganismos não são endofíticos naturais dessa espécie vegetal.

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos dos fungos endofíticos, foram selecionados os fungos de acordo com o item 4.5. Os fungos foram cultivados para obtenção dos meios metabólicos líquidos, e o tempo de cultivo foi determinado de acordo com a fisiologia de cada fungo.

Após a obtenção do meio metabólico líquido dos 46 fungos, foram realizados os testes para avaliação da atividade antimicrobiana. Os testes foram realizados frente às bactérias *S. aureus* (Sa), *P. aeruginosa* (Pa), *B. cereus* (Bc), e *E. faecalis* (Ef) e os fungos *C. albicans* (Ca) e *P. avelani* (Pv). Após 24, 48 e 72 horas de incubação os ensaios foram avaliados quanto à presença de halos de inibição decorrente da ação antimicrobiana dos meios metabólicos fúngicos. Quando o halo de inibição se apresentava em triplicata, o diâmetro deste halo era então medido e anotado para verificação das médias, assim como do desvio padrão. A **Tabela 7** apresenta os resultados médios da avaliação da atividade antimicrobiana dos meios metabólicos dos fungos endofíticos de *M. guianensis*.

Tabela 7: Resultado dos testes de antibiose, realizados com o meio metabólico líquido dos fungos endofíticos isolados de *M. guianensis*.

Nº	LINHAGENS	Gêneros	Pa	Sa	Ef	Bc	Ca	Pv
1	MgF2 2.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
2	Mg R2 2.2	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
3	MgF1 3.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
4	MgF3 3.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
5	MgC1 3.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
6	Mg F3 3.1	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
7	Mg F2 3.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
8	Mg C1 1.1	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
9	Mg F2 2.1	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
10	Mg F2 1.2	<i>Pestalotiopsis</i>	-	13,5±0,5	14,3±0,6	-	-	-
11	Mg Ce2 2.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
12	Mg F3 2.1	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
13	Mg F2 1.3	<i>Pestalotiopsis</i>	-	-	-	-	-	-
14	Mg Ce3 3.1 A	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
15	Mg Ce1 3.2	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
16	Mg C2 3.2	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
17	MgRe1 1.1	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
18	Mg F1 2.1	<i>Phomopsis</i>	-	14,0±1,0	13,3±1,5	-	-	-

19	Mg F 3.3.1 B	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
20	Mg F 3.3.1 A	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
21	Mg F 1.2.1	<i>Phomopsis</i>	-	-	-	-	-	-
22	Mg Re1 3.2	<i>Aspergillus</i>	-	-	-	-	-	-
23	Mg C3 2.2	<i>Aspergillus</i>	-	-	-	-	-	-
24	MgC2 2.1	<i>Aspergillus</i>	-	-	-	-	-	-
25	MgRe2 1.1	<i>Aspergillus</i>	-	-	-	-	-	-
26	MgC1 2.3	<i>Xylaria</i>	-	-	-	-	-	-
27	MgF2 3.3	<i>Xylaria</i>	-	-	-	-	-	-
28	MgRe3 3.1	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
29	MgCe3 3.1	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
30	MgCe2 2.1	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
31	MgCe2 2.3 B	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
32	Mg R2.1.1	Desconhecido	-	-	-	-	15,6±0,6	13,8±0,8
33	Mg Re2 2.3 B	Desconhecido	-	12,5±0,5	15,0±1,0	-	-	43,3±0,6
34	MgF2 1.3	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
35	MgF1 2.2	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
36	MgC2 3.2	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
37	MgC2 2.3	<i>Penicillium</i>	-	-	-	-	-	-
38	MgR1 1.2	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
39	MgRe1 3.2	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
40	MgC2 3.3	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
41	MgF2 2.1	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
42	MgCe3 2.1	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
43	MgRe3 1.1	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
44	MgF1 3.2 A	Desconhecido	-	-	-	-	-	-
45	MgF1 3.2 B	<i>Fusarium</i>	-	-	-	-	-	-
46	MgF3 2.1	<i>Guignardia</i>	-	-	-	-	-	-
	Controle (-)		-	-	-	-	-	-

Amoxicilina	37,0±1,0	28,1±0,28	46,0±1,0	43,6±0,57	NR	NR
Cetoconazol	NR	NR	NR	NR	30,3±1,15	43,3±0,6

NR. Teste não realizados. – Teste com resultado negativo. Resultados expressos em mm, referentes ao diâmetro do halo de inibição.

Dos meios metabólicos dos 46 fungos endofíticos testados contra às cepas patogênicas, três apresentaram resultado positivo frente a *S. aureus*; três apresentaram atividade contra *E. faecalis*; um apresentou atividade frente a *C. albicans*; e dois mostraram alguma atividade inibitória frente ao fungo *P. avelani*. Nenhum dos metabólitos apresentou atividade frente às cepas de *P. aeruginosa* e *B. cereus*.

Os microrganismos endofíticos podem produzir uma variedade de metabólitos, tanto primários quanto secundários (PANACCIONE e ANNIS, 2001; SCHULZ et al., 2002; MILLER et al., 2010). Essa capacidade de produzir uma variedade de metabólitos pode explicar a atividade tanto contra procariotos, como as bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*, quanto a ação inibitória contra eucariotos como fungos, neste caso *C. albicans* e *P. avelani*.

Dois fungos pertencentes aos gêneros *Phomopsis* e *Pestalotiopsis* apresentaram atividade contra *S. aureus* e *E. faecalis*. Outros trabalhos já foram descritos mostrando que fungos pertencentes a esses gêneros são produtores de substâncias com essa bioatividade (LI e STROBEL, 2001; RUKACHAISIRIKUL. et al., 2008). Levando em consideração que esses dois gêneros são os encontrados em maior número nos tecidos de *M. guianensis*, pode-se inferir, então, a respeito da importância ecológica desses dois gêneros para a espécie hospedeira, principalmente ao observar os resultados do teste de antibiose. A importância ecológica dos fungos endofíticos para sua planta hospedeira está amplamente descrita na literatura, e entre os fatores mais relevantes está o de conferir maior resistência à planta contra patógenos (SAIKKONEN et al., 1998).

O meio metabólico da linhagem **MgRe2 2.3B** apresentou atividade contra as bactérias *S. aureus*, *E. faecalis* e contra o fungo *P. avelani*, mostrando-se promissora como fonte de compostos antimicrobianos. Os resultados dos testes de antibiose do meio líquido dessa linhagem contra o *P. avelani* destacam-se quando comparado ao resultado obtido com o cetoconazol, antifúngico comercial utilizado nos testes como controle positivo. Ambos apresentam halo de inibição médio de 43,3 mm de diâmetro (**Fig. 32**), sendo que o cetoconazol é uma substância pura usada neste ensaio na concentração de 2,0 mg/mL,

enquanto que da linhagem **MgRe2 2.3B** foi utilizado apenas o meio metabólico filtrado, obtendo-se resultados similares.

A bactéria *S. aureus* é uma cepa Gram positiva envolvida em diversos processos infecciosos humanos, particularmente em ambientes hospitalares, causadora de infecções como foliculite e outras infecções piogênicas. A *E. faecalis* é uma bactéria Gram positiva e também conhecida como agente infeccioso causador de graves patologias ao homem como infecções do trato urinário e biliar. Dessa forma, os resultados obtidos a partir dos metabólitos da linhagem **MgRe2 2.3B** a habilitaram à próxima etapa da investigação: o isolamento e o início da caracterização do composto bioativo produzido por essa linhagem fúngica.

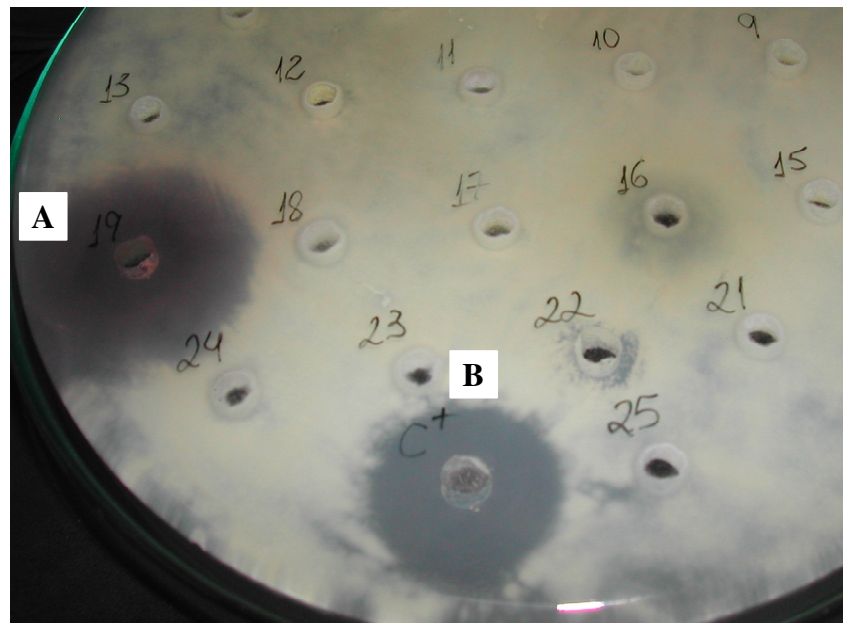


Figura 32: Resultado do teste de antibiose dos metabólitos da linhagem **MgRe2 2.3 B** contra *P. avelani*. Em (A) halo de inibição promovido pelo meio metabólico. Em (B) halo de inibição promovido pelo Cetoconazol (2,0 mg/mL).

5.6 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO FUNGO **MgRe2 2.3B**

Para identificação da linhagem **MgRe2 2.3B** foi realizada a técnica de microcultivo, um método da taxonomia clássica que consiste no preparo de uma lamínula contendo tecido fúngico em desenvolvimento, corada com lactofenol blue cotton e analisada em microscópio óptico, em objetivas de 40x e 100x, a fim de observar as principais estruturas micromorfológicas e confronta-las com chaves taxonômicas morfológicas (BARNETT e HUNTER, 1972) possibilitando a identificação em nível de gênero (**Fig. 33**).

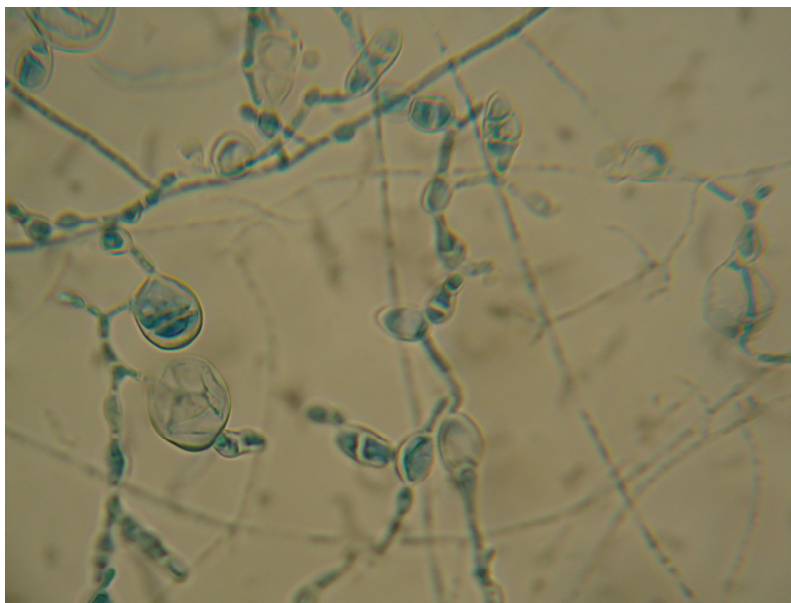


Figura 33: Estrutura micromorfológica da linhagem MgRe2 2.3B. Fungo do gênero *Blakeslea* em objetiva de 40x.

A observação de estruturas reprodutivas, como os esporos, permitiram a classificação da linhagem **MgRe2 2.3B** como pertencente ao gênero *Blakeslea*. Este gênero compõem o Filo Zygomycota, Classe Zygomycetes e a Ordem Mucorales. Espécies pertencentes a esse gênero são produtoras de pigmentos característicos, como observados na linhagem em questão. Uma das espécies mais estudadas dentro desse gênero é a *Blakeslea trispora* utilizada na indústria de alimentos na produção de carotenóides, grande grupo de pigmentos presentes na natureza, utilizados comercialmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais (LOGUERCIO-LEITE, 2004; TSIMIDOU e MONTZOURIDOU, 2007).

5.7 ESTUDO DOS COMPONENTES DOS METABÓLITOS DO FUNGO **MgRe2 2.3B**

Os resultados preliminares da atividade antimicrobiana dos metabólitos permitiu a seleção da linhagem **MgRe2 2.3B** para as etapas subseqüentes. A etapa denominada de cultivo em escala preparativa foi realizada de acordo com o item 4.9.1, na qual foi obtido 14 L de meio metabólico em modo estático (**condição 1**), e 5 L de meio metabólico sob agitação (**condição 2**). Dessas quantidades foram retirados 1 L de cada para realização dos testes para determinação da presença de alcalóides. Nessa etapa, os micélios foram separados para a etapa de extração em etanol.

5.7.1 Avaliação da Presença de Alcalóides

O meio metabólico líquido da linhagem **MgRe2 2.3B** apresentava uma coloração avermelhada. Essa característica nos levou deduzir sobre qual classe de compostos poderia estar sendo produzido por esse microrganismo, que pudesse conferir tal característica a seu meio metabólico. Neste sentido, o meio metabólico foi avaliado quanto a presença de alcalóides. Essa classe de compostos é encontrada como produto do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos, e trabalhos mostram que tais substâncias podem ser detentoras de atividade antibacteriana e antifúngica (WICKLOW et al, 2005; RUKACHAISIRIKUL et al, 2008; GAO et al, 2009). Apesar disso, os testes realizados não confirmaram a presença de alcalóides no meio metabólico dessa linhagem. Os testes foram realizados em triplicata, tanto do meio líquido metabólico obtido na condição 1, quanto do obtido na condição 2, e em todas as amostras os resultados foram negativos.

5.7.2 Metabólitos obtidos do Fungo MgRe2 2.3B

A partir da etapa de extração realizada de acordo com o item 4.9.2, foram obtidos os extratos do meio metabólico apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Extratos do meio metabólico líquido e do micélio da linhagem **MgRe2 2.3 B** na condição 1 e na condição 2 de cultivo em escala preparativa.

Cultivo no modo estático (condição 1)			Cultivo sob agitação (condição 2)		
meio metabólico		micélio	meio metabólico		micélio
AcoEt	AcoEt:Iso-PrOH	Etanol	AcoEt	AcoEt:Iso-PrOH	Etanol
9,42 g	0,57 g	0,82 g	3,58 g	1,36 g	0,76 g

AcoEt. Extrato obtido com acetato de etila 100%. AcoEt:Iso-PrOH. Extrato obtido com acetato de etila e Isopropanol 7:3.

A extração dos meios metabólicos, obtidos nas condições 1 e 2, utilizando acetato de etila apresentaram rendimentos similares, levando em consideração as diferentes quantidades de meio metabólico obtidos nas duas condições. Tal fato não foi observado na extração do

meio metabólico realizada com acetato de etila e isopropanol (7:3), assim como na extração do micélio em etanol. Nessas extrações observa-se maior rendimento na condição 2. Essa maior produção deve estar relacionada com a aeração promovida durante cultivo na condição 2.

Após a obtenção dos extratos, estes foram novamente testados contra as cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. avelani*, para confirmação da atividade apresentada no meio líquido metabólico, e para comparação dos dois modos de cultivo em relação à produção do composto antimicrobiano de interesse. Os testes foram realizados de acordo com o item 4.6, e os resultados estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultado dos testes de atividade antimicrobiana, realizados com os extratos obtidos do meio metabólico da linhagem **MgRe2 2.3B**.

Extratos	Cepas teste		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. avelani</i>
AE1	10,6 ±0,5	13,0 ±1,0	11,0 ±1,0
AE2	13,3 ±1,5	17,3 ±1,1	N
AEI1	23,3 ±1,1	24,3 ±2,0	22,3 ±2,0
AEI2	11,3 ±1,5	N	N
ET1	N	N	N
ET2	N	N	N
Amoxicilina	29,3 ±0,5	44,6 ±0,5	S
Cetoconazol	S	S	39,3 ±1,5
CON	N	N	N

AE1- extrato AcoEt do meio metabólico da condição 1. AE2 - extrato AcoEt do meio metabólico da condição 2. AEI1 – extrato AcoEt:isopropanol do meio metabólico da condição 1. AEI2 – extrato AcoEt:isopropanol do meio metabólico da condição 2. ET1 – extrato etanólico do micélio obtido da condição 1. ET2 - extrato etanólico do micélio obtido da condição 2. N – resultado negativo, S – testes não realizados. CON – controle negativo. Resultados expressos em mm, referentes ao diâmetro do halo de inibição.

A partir dos resultados obtidos foi possível confirmar a presença de substâncias bioativas com ação inibitória frente às cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. avelani*. É possível também afirmar que essa substância está presente apenas no meio líquido metabólico, tendo em vista os resultados negativos contra todas as cepas testadas, observados para ET1 e ET2.

Os resultados positivos de AE1 e AEI1 contra *P. avelani* podem ser um indício de que o fungo **MgRe2 2.3B** independe da aeração para a produção da molécula bioativa de ação contra aquele microrganismo. Pode indicar também que o estresse causado pela baixa concentração de oxigênio induz esse fungo a produzir entre seus metabólitos secundários a substância antifúngica, no intuito de eliminar possíveis competidores pelo nutriente em escassez, nesse caso, o oxigênio.

Ao comparar os resultados de atividade dos extratos AE1, AE2, AEI1 e AEI2 frente às cepas teste, fica evidenciado que o cultivo desse fungo realizado no modo estático, condição 1, é mais eficiente para obtenção da substância de interesse, que o cultivo realizado sob agitação (condição 2).

Os extratos AE1 e AEI1 apresentaram os melhores resultados nos testes realizados, demonstrando, em diferentes graus de potência, capacidade inibitória contra as três cepas patogênicas testadas. Observando esses resultados, os dois extratos em questão foram avaliados por cromatografia de camada delgada CCD de acordo com o item 4.9.2, para observação das possíveis diferenças existentes entre os dois extratos (**Fig. 34**).

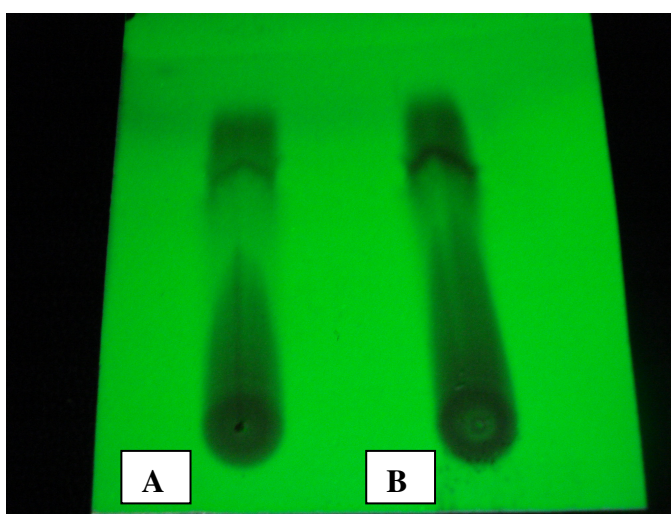


Figura 34. Cromatografia em camada delgada dos extratos AEI1 em (A) e AE1 em (B).

Observa-se na **Figura 34** que os dois extratos são semelhantes, o que possibilitou a união dos mesmos para as etapas seguintes.

5.7.3 Fracionamento do Extrato e Início da Caracterização da Molécula Bioativa

O resultado da análise por CCD demonstrou se tratar de extratos muito similares, que na verdade poderiam ser formados pelas mesmas substâncias. Tal avaliação permitiu a reunião desses extratos para a realização de seu fracionamento, de acordo com o item 4.9.2. A **Tabela 10** apresenta as frações obtidas e seus respectivos pesos secos.

Tabela 10: Fracionamento em coluna do extrato e seus respectivos eluentes e pesos secos.

Frações resultantes	Eluente	Peso seco (mg)
Fração 1 (F1)	DCM/AcoEt (1:1)	352,7
Fração 2 (F2)	AcoEt 100%	522,3
Fração 3 (F3)	AcoEt/Acetona (1:1)	114,6
Fração 4 (F4)	Acetona 100%	83,4
Fração 5 (F5)	Metanol 100%	1.325,1
Fração 6 (F6)	Metanol/Água (8:2)	197,7

DCM – Diclorometano; AcoEt – Acetato de etila.

As frações obtidas foram testadas contra as cepas teste *S. aureus*, *E. faecalis* e *P. avelani*. O resultados apontaram em que fração ou em quais frações estão presentes a(s) substância(s) de interesse (**Fig. 35**).

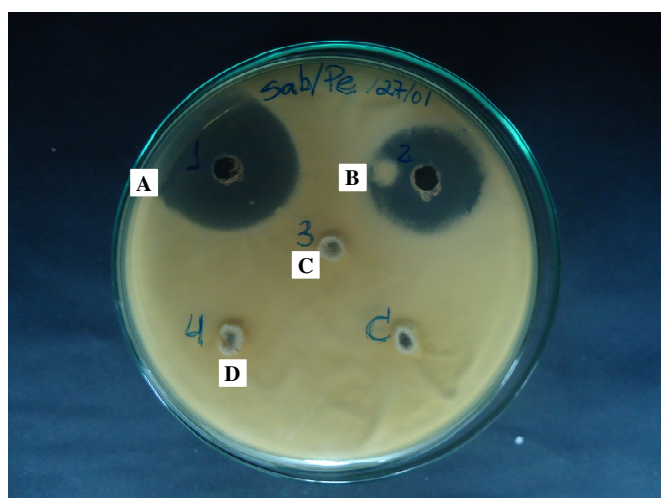


Figura 35. Teste de atividade antimicrobiana das frações. Mostrando em (A) halo de inibição da fração 1 (F1). Em (B) halo de inibição da fração 2 (F2). Em (C) e (D), frações 3 e 4, respectivamente.

O resultado dos testes de atividade antimicrobiana das frações 1 a 6 estão presentes na **Tabela 11**.

Tabela 11. Resultado dos testes de atividade antimicrobiana das frações 1 a 6.

Frações	Cepas teste		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. avelani</i>
F1	12,3 ±0,5	11,3 ±0,5	23,3 ±1,1
F2	12,3 ±0,5	11,6 ±0,5	21,3 ±0,5
F3	N	N	N
F4	N	N	N
F5	N	N	N
F6	N	N	N
CON.	N	N	N

CON – Controle negativo. F1 – Fração 1; F2 – Fração 2; F3 – Fração 3; F4 – Fração 4; F5 – Fração 5; F6 – Fração 6. N – Teste com resultado negativo. Resultados expressos em mm, referentes ao diâmetro do halo de inibição.

As frações 1 e 2 (F1 e F2) apresentaram resultados positivos contra todas as três cepas teste. Esses resultados indicam que entre as substâncias que compõem as frações 1 e 2 está a(s) substância(s) de interesse. As duas frações passaram por análise de CLAE em equipamento analítico de acordo com o item 4.9.3. A finalidade foi analisar as possíveis similaridades entre as duas frações no sentido de inferir a respeito da(s) substância(s) bioativa(s).

Na **Figura 36** observa-se o perfil cromatográfico da fração 1, realizado de acordo com o item 4.9.3, e na **Figura 37** o espectro de UV das substâncias que apresentaram picos mais intensos S1 e S2.

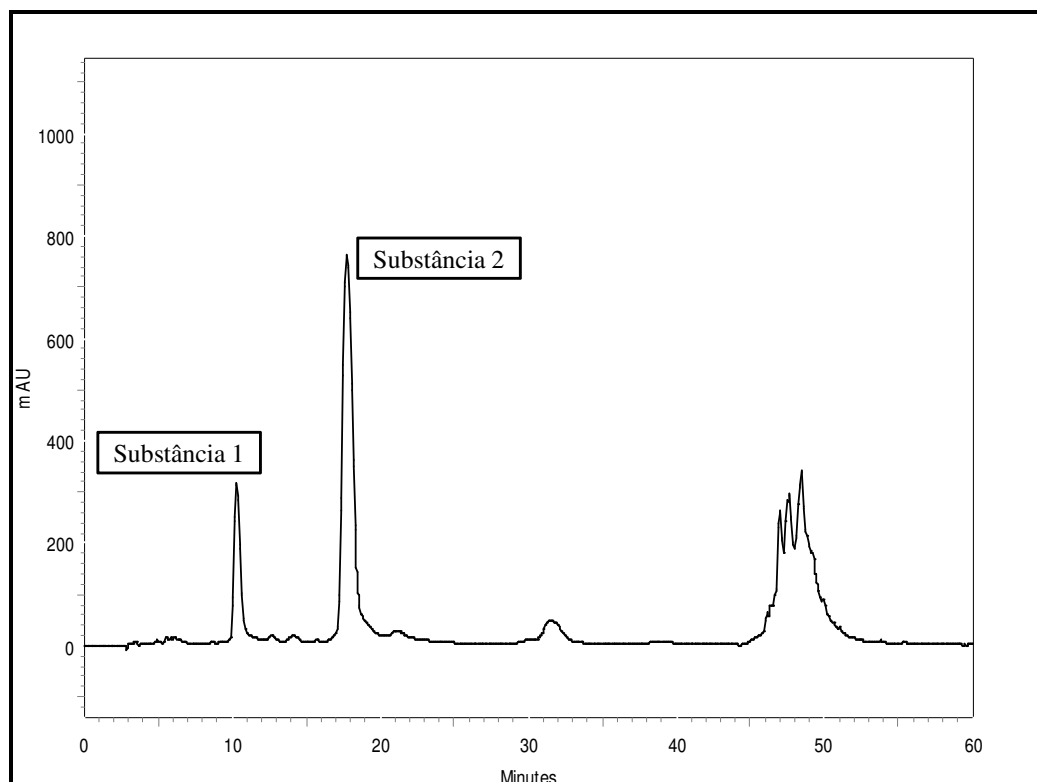


Figura 36. Perfil cromatográfico referente à análise da fração 1 (F1) por CLAE. Mostrando a substância 1 (S1) com tempo de retenção 10,35 min., e a substância 2 (S2), com tempo de retenção 17,77 min.

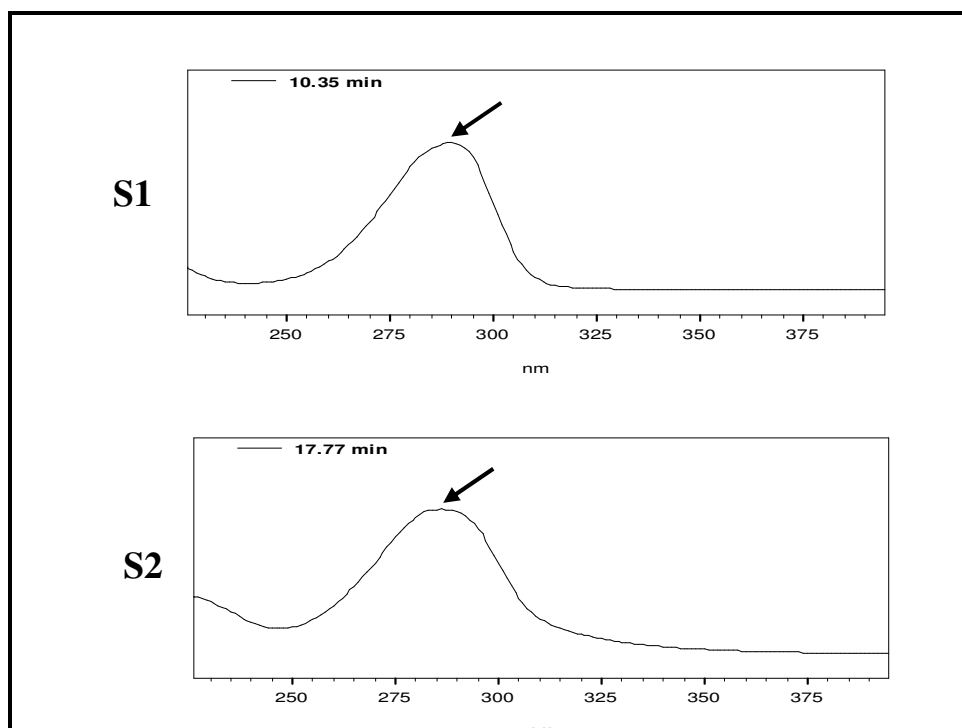


Figura 37. Espectros de UV de 225 a 390 nm das substâncias S1 e S2, pertencentes à fração 1 (F1). A seta indica o comprimento de onda onde ocorreu a máxima absorção para ambas as substâncias, 287 nm.

Na **Figura 38** observa-se o perfil cromatográfico da fração 2 (F2), realizado de acordo com o item 4.9.3, e na **Figura 39** o espectro de UV da substância 3 (S3).

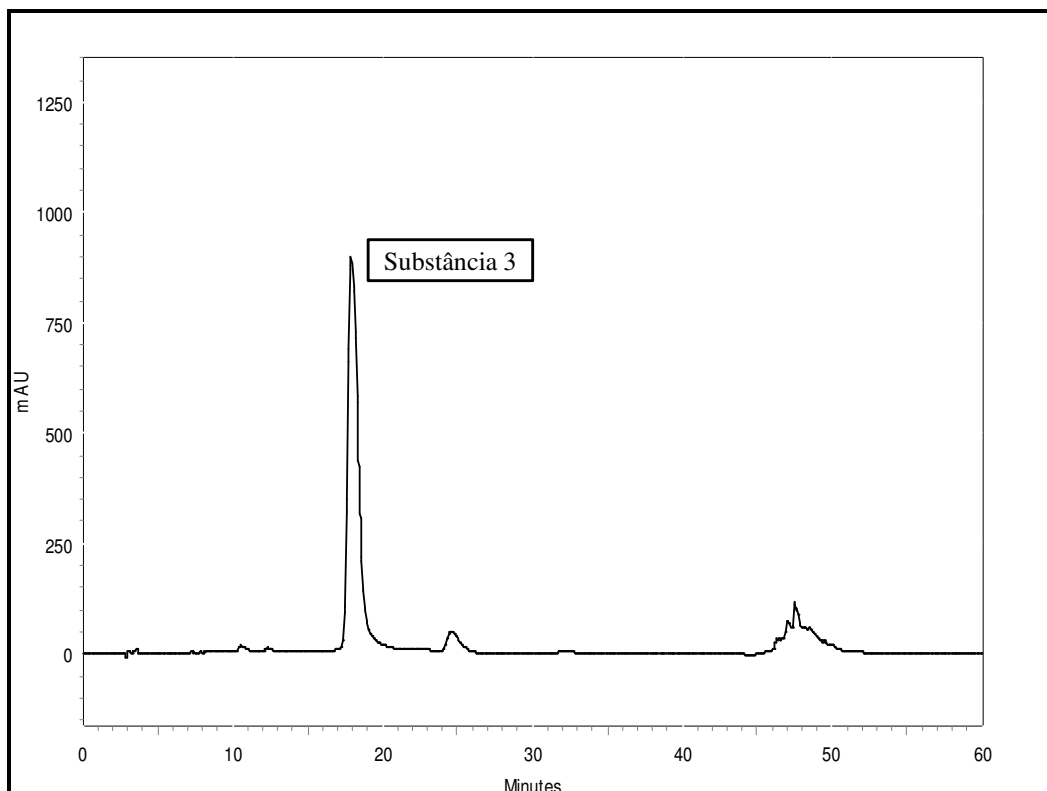


Figura 38: Perfil cromatográfico referente à análise da fração 2 (F2) por CLAE. Mostrando isolamento da substância 3 (S3) com tempo de retenção 17,95 min.

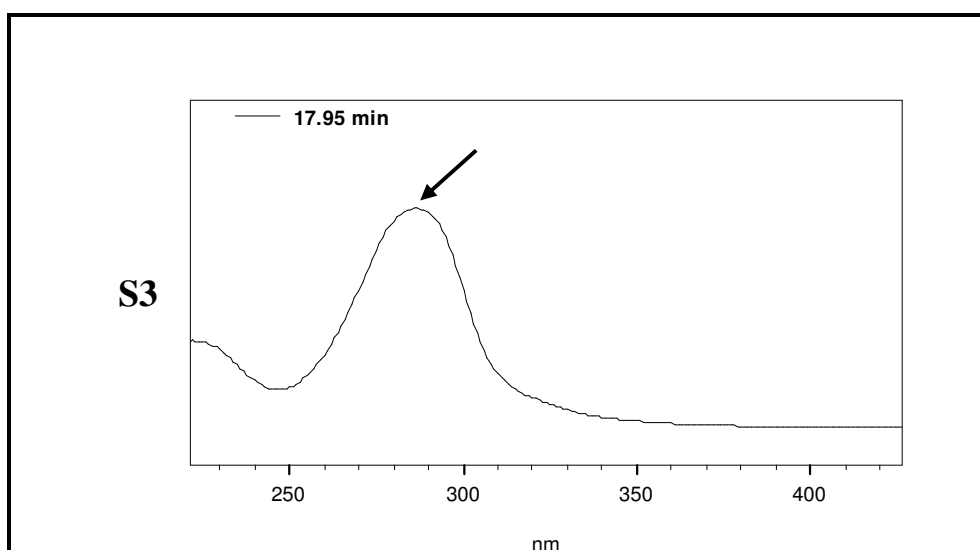


Figura 39: Espectro de UV de 230 a 420 nm da substância 3 (S3), isolada da fração 2 (F2). A seta indica o comprimento de onda onde ocorreu a máxima absorção, 287 nm.

Foi possível observar de acordo com o cromatograma da fração 1 (F1), que esta fração é majoritariamente composta por duas substâncias (**Fig. 36**). A primeira observada no tempo de retenção 10,35 min. (S1), e a segunda observada no tempo de 17,77 min. (S2). De acordo com as condições de corrida percebe-se que são substância bastante polares. Observa-se também picos sobrepostos com tempos de retenção de 47 a 49 min. Para esses, as condições de corrida não possibilitaram a separação das substâncias com características menos polares.

Quando se compara o cromatograma da F1 com o cromatograma obtido da F2, observa-se que a fração 2 possui pico majoritário referente à substância 3 (S3), no mesmo tempo de retenção apresentado pela substância 2 (S2) da F1 de 17,77 min. Além disso, S2 e S3 possuem o mesmo comprimento de onda máximo, 287 nm. Esses itens somados podem ser indícios de que S2 e S3 sejam a mesma substância ou substâncias com estrutura química similar.

As frações 1 e 2 foram analisadas por Espectrometria de Massas (EM) de acordo com o item 4.9.3, para avaliação das possíveis diferenças ou similaridades entre o perfil de massas dos íons moleculares formados nas duas frações. Nas **Figuras 40 e 41** observa-se o espectro de massas da fração 1 em $[M - H]$ e em $[M + H]$, respectivamente.

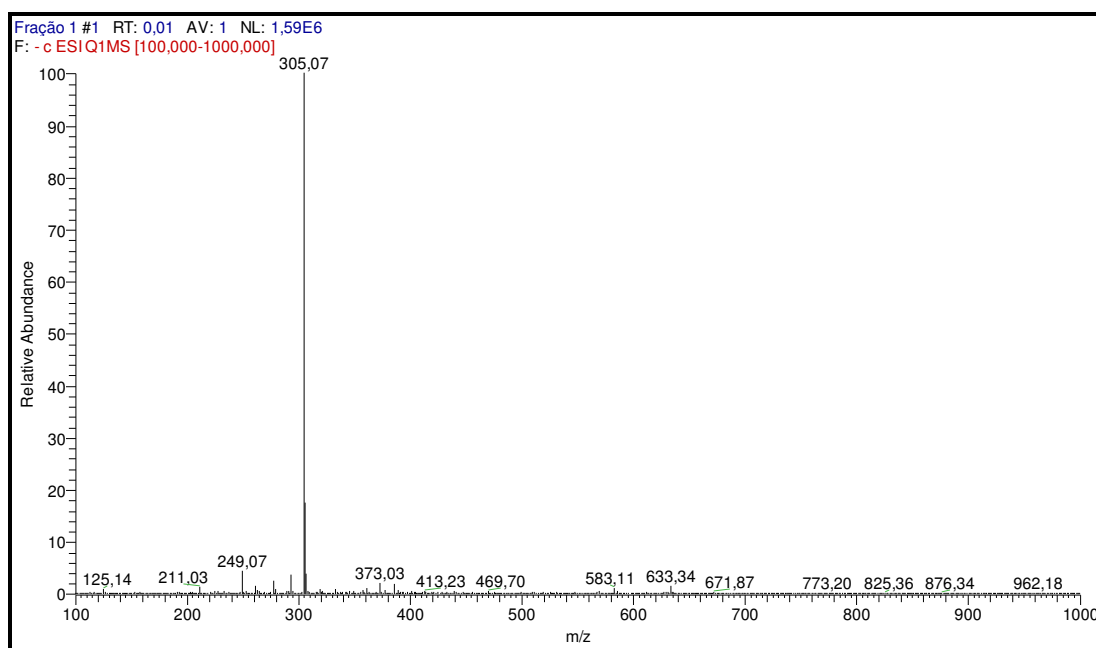


Figura 40: Espectro de massas da fração 1 $[M - H]$.

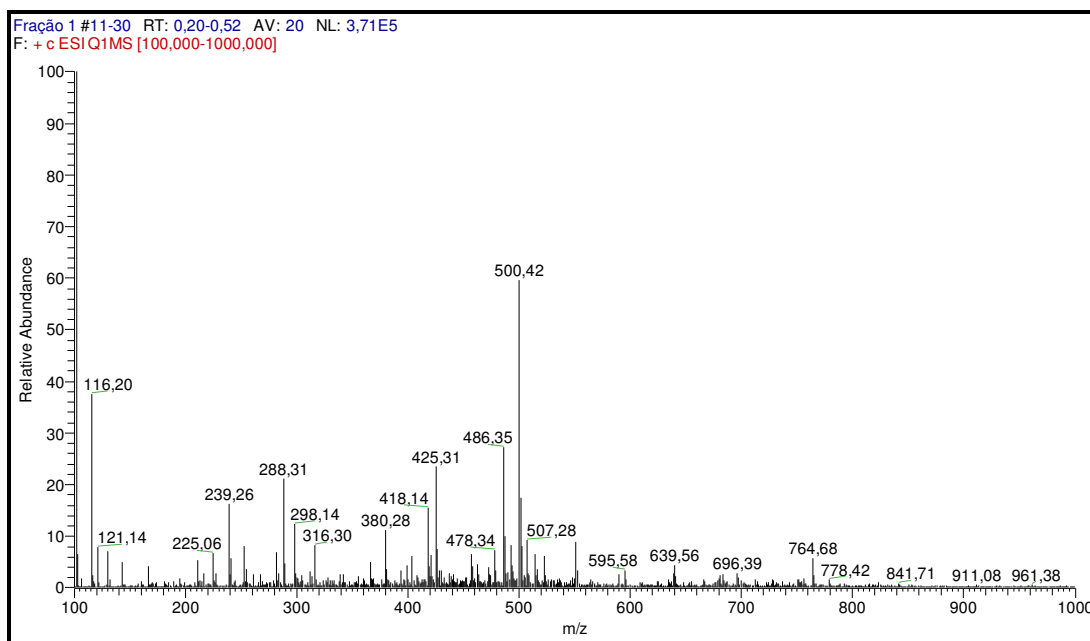


Figura 41: Espectro de massas da fração 1 [M +H].

Nas **Figuras 42 e 43** observa-se o espectro de massas da fração 2 em [M -H] e em [M +H], respectivamente.

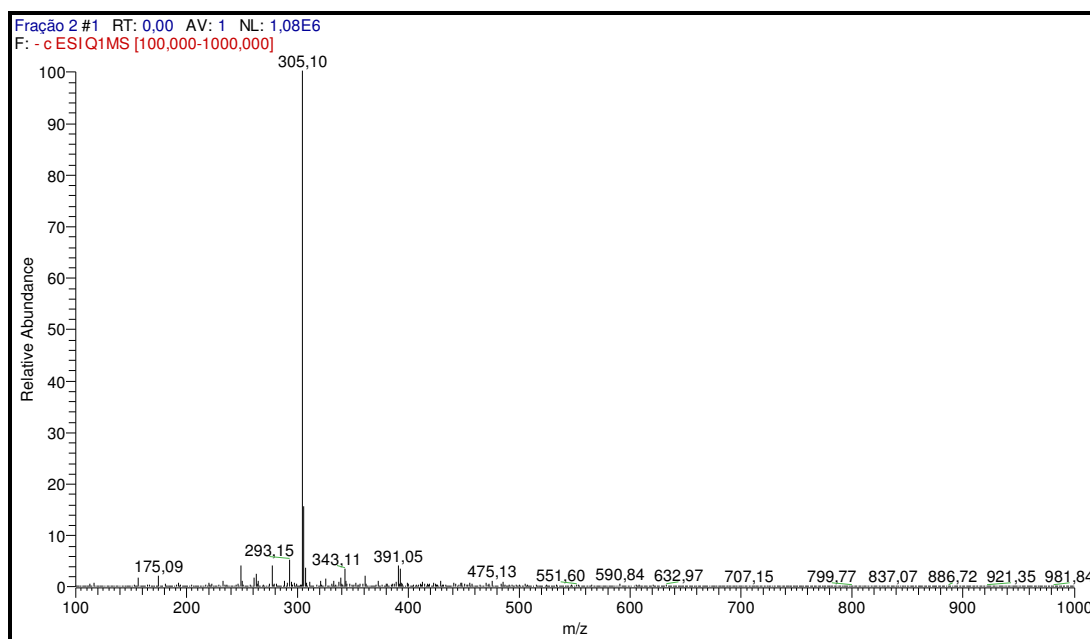


Figura 42: Espectro de massas da fração 2 [M -H].

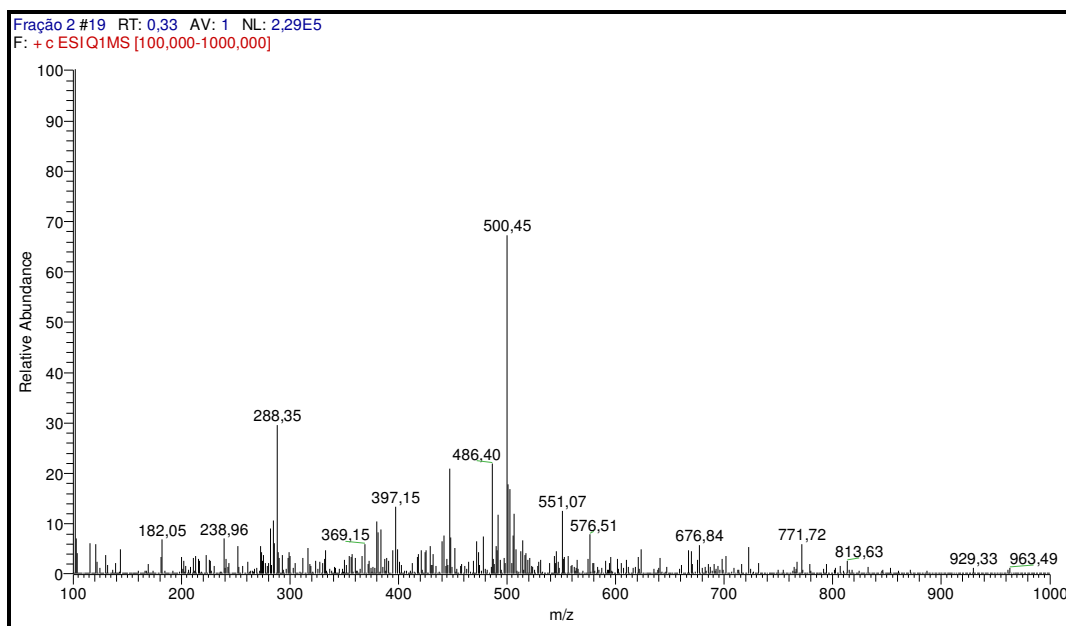


Figura 43. Espectro de massas da fração 2 [M +H].

Através da análise por espectrometria de massas é possível observar que as frações 1 e 2 são bastante semelhantes, com relação ao perfil de massas dos íons moleculares formados. Tal fato ocorreu tanto em [M +H] quanto em [M –H]. Esse resultado é mais um indício de que as frações 1 e 2 são compostas pelas mesmas substâncias, ou por substâncias com estrutura química bastante similares.

Para o início da caracterização estrutural da(s) molécula(s) bioativa(s) presentes nas frações 1 e 2 foi realizado primeiramente o isolamento das substâncias por CLAE em equipamento semi-preparativo, de acordo com item 4.9.3, onde foi possível fazer a coleta das substâncias 1 e 2, para posterior análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Nas **Figuras 44, 45 e 46** estão apresentados os espectros de RMN ^1H das substâncias 1, 2 e da fração 2, respectivamente.

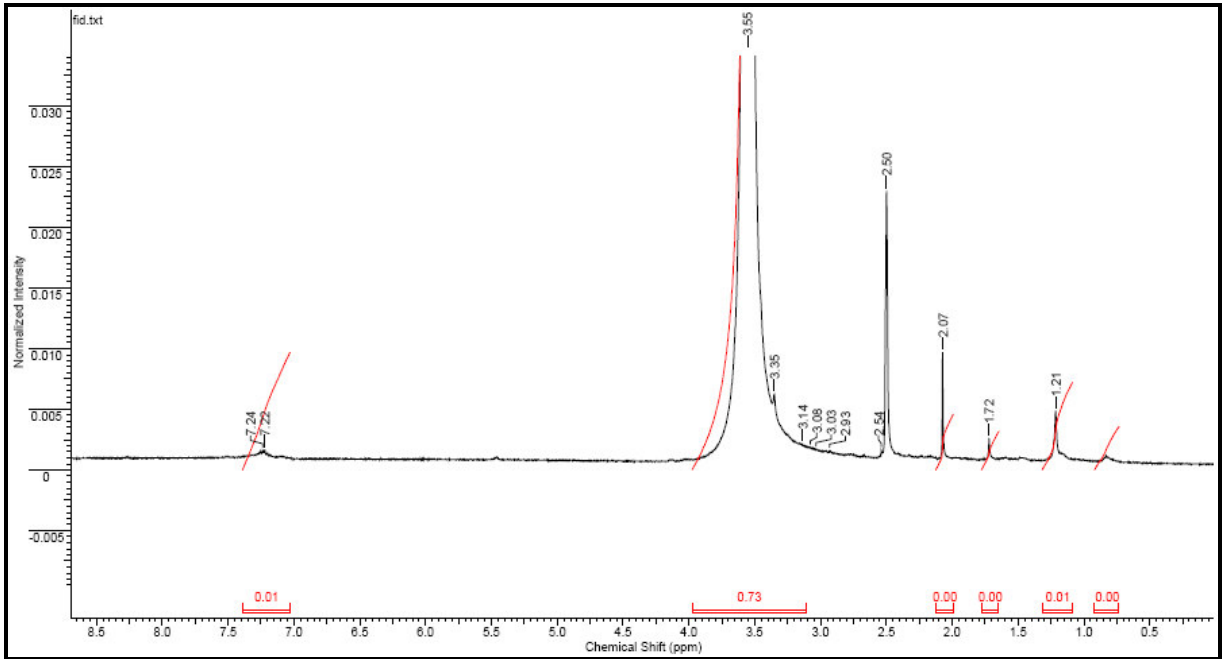


Figura 44: Espectro de RMN ^1H da substância 1 (S1).

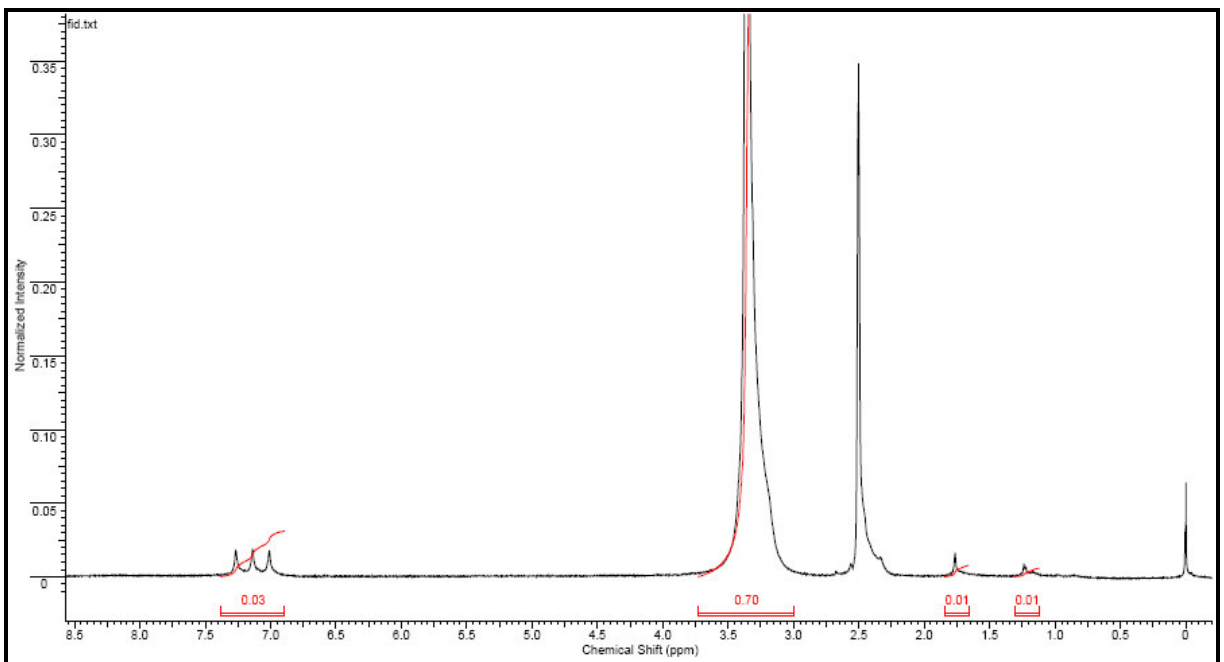


Figura 45: Espectro de RMN ^1H da substância 2 (S2).

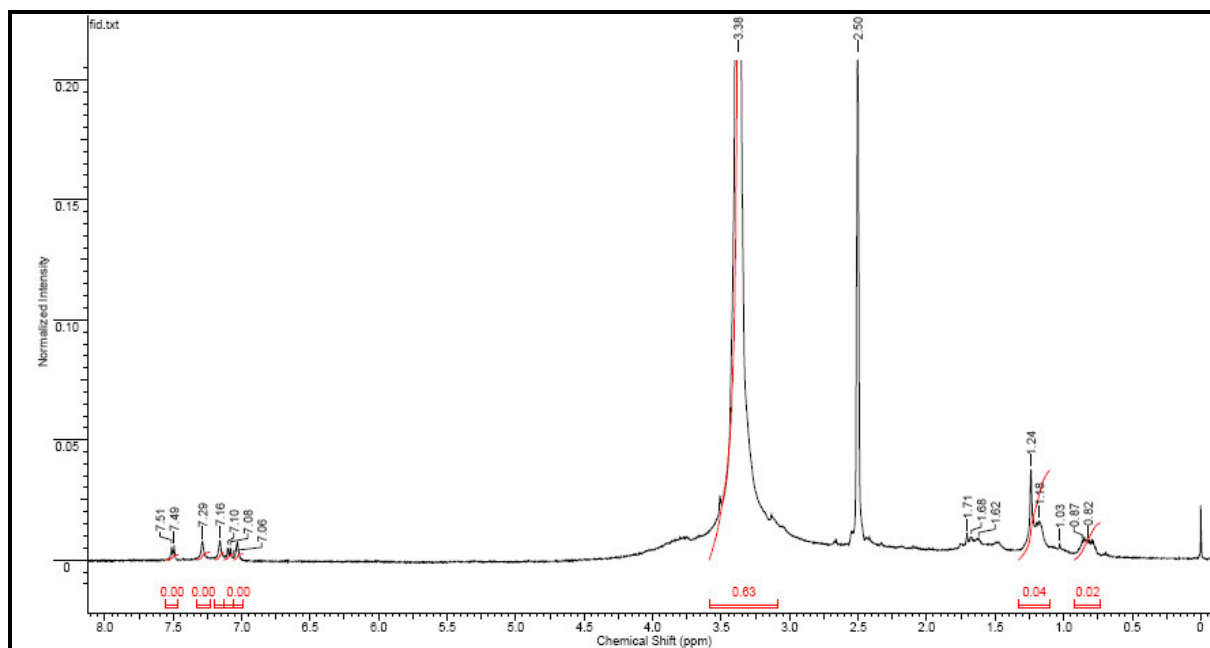


Figura 46: Espectro de RMN ^1H da fração 2.

Através da análise por RMN ^1H é possível observar que as três substâncias possuem espectros semelhantes, o que sugere que são moléculas com estruturas químicas parecidas. Pode-se observar também que nas substâncias 1 e 2 e na fração 2 existe a presença de anel aromático em função dos deslocamentos químicos nas regiões de 7.06 a 7.51 ppm. Também observam-se sinais de hidrogênio de alcenos, com deslocamentos químicos na região de 1.72 ppm (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRILL, 1994). No entanto, não é possível fazer outras afirmações, tendo em vista que os picos referentes aos hidrogênios do solvente e da água estão maiores que os picos referentes aos hidrogênios presentes nas estruturas químicas das substâncias, o que evidencia a baixa concentração das substâncias de interesse presente na amostra.

5.8 DOSE MÍNIMA INIBITÓRIA

Os resultados apresentados até então permitiram a partir desse ponto determinar a Dose Mínima Inibitória (DMI), assim como a dose mínima bactericida ou fungicida (DMB ou DMF) tanto para a fração 1 (F1) quanto para a fração 2 (F2). Os testes foram realizados de acordo com o item 4.7, e estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Resultado dos testes de Dose Mínima Inibitória (DMI) das frações 1 e 2.

	Diluição (Concentração)	Cepas Teste		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. avelani</i>
FRAÇÃO 1	1:2 (1,0 mg/mL)	+	+	+
	1:4 (0,50 mg/mL)	+	+	+
	1:8 (0,250 mg/mL)	+	-	+
	1:16 (0,125 mg/mL)	-	-	+
	1:32 (0,0625 mg/mL)	-	-	-
	1:64 (0,0312 mg/mL)	-	-	-
	1:128 (0,0156 mg/mL)	-	-	-
	CON	-	-	-
FRAÇÃO 2	1:2 (1,0 mg/mL)	+	+	+
	1:4 (0,50 mg/mL)	+	-	+
	1:8 (0,250 mg/mL)	+	-	+
	1:16 (0,125 mg/mL)	-	-	+
	1:32 (0,0625 mg/mL)	-	-	-
	1:64 (0,0312 mg/mL)	-	-	-
	1:128 (0,0156 mg/mL)	-	-	-
	CON	-	-	-

+ - Resultado positivo. -. Resultado negativo. CON – Controle negativo. Os testes foram realizados em placa de ELISA em triplicata.

Os resultados mostraram que tanto para a fração 1 quanto para fração 2 a dose mínima capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* é de 0,250 mg/mL (**Fig. 47**), e que a dose mínima capaz de inibir o crescimento do fungo *P. avelani* é de 0,125 mg/mL. Quanto aos resultados frente à *E. faecalis*, a fração 1 inibiu o crescimento dessa bactéria até a dose de 0,50 mg/mL, enquanto que a fração 2 possui capacidade inibitória apenas na dose de 1,0 mg/mL. Os resultados se mostraram bastante promissores, principalmente no combate ao *P. avelani*.

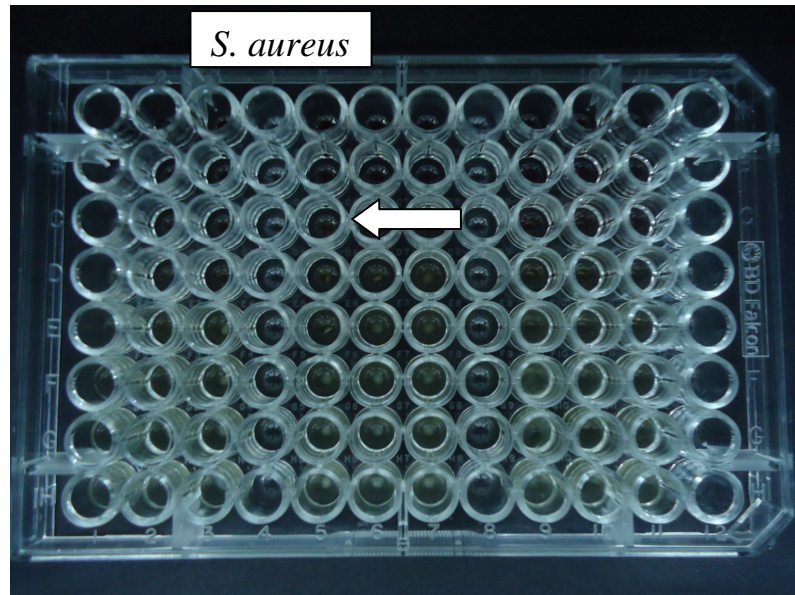


Figura 47: Teste da fração 2 frente a *S. aureus*, para determinação da DMI. Seta indica poço em que não ocorreu crescimento bacteriano.

Os resultados bastante similares de DMI obtidos com a fração 1 e fração 2 reforçam a idéia de que os componentes destas frações, possivelmente as substâncias 2 (S2) e 3 (S3) são a mesma substância.

5.9 DOSE MÍNIMA BACTERICÍDA E FUNGICIDA

Com relação aos testes para determinação da Dose Mínima Bactericida ou Fungicida, realizados de acordo com o item 4.8, os resultados mostram que tanto a fração 1 (F1), quanto a fração 2 (F2) não possuem capacidade bactericida frente a *E. faecalis* (**Fig. 48**).



Figura 48: Teste para determinação da DMB, demonstrando resultado negativo da fração 2 frente a *E. faecalis*.

As frações 1 e 2, entretanto, demonstraram atividade bactericida frente a *S. aureus* até a dose de 0,50 mg/mL (**Fig. 49**).

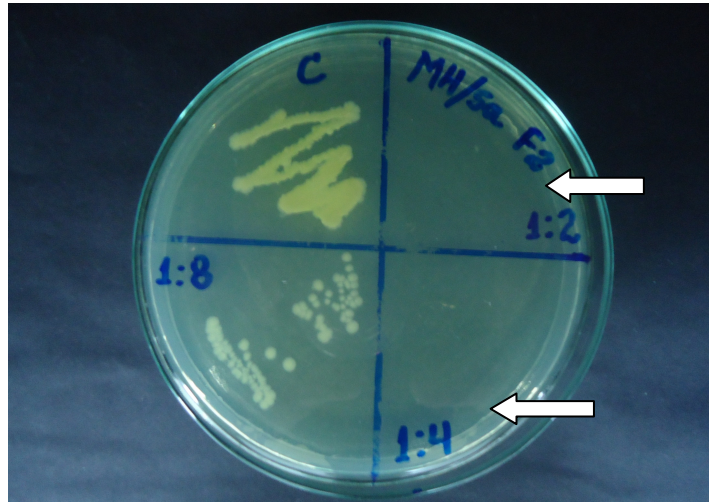


Figura 49: Teste para determinação da DMB. Setas indicam ação bactericida da F2 contra *S. aureus* até a dose de 0,50 mg/mL.

Os resultados obtidos através da DMB, nos permite inferir que o mecanismo de ação promovido pelas frações 1 e 2 nas bactérias teste não é o mesmo, tendo em vista que, os resultados de atividade bactericida contra *E. faecalis* é negativo, enquanto que os resultados contra *S. aureus* é positivo. As frações 1 e 2 mostraram também que possuem capacidade fungicida contra *P. avelani*, mas essa capacidade é observada somente na dose de 1,0 mg/mL, nas duas frações (**Fig. 50**).

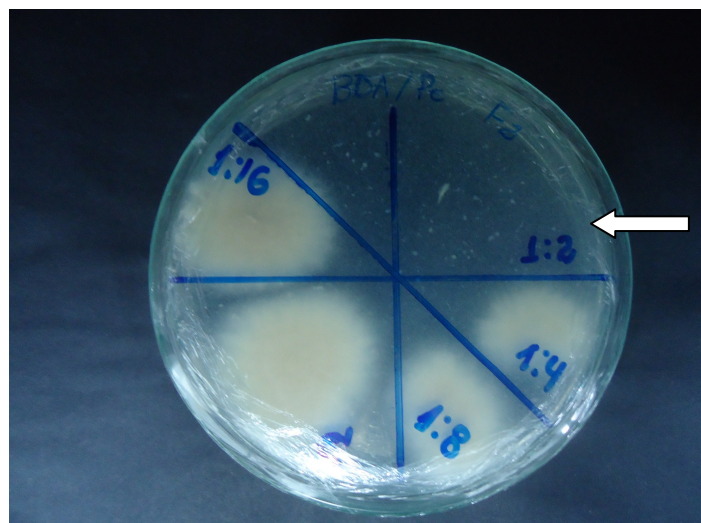


Figura 50: Teste para determinação da Dose Mínima Fungicida (DMF). Seta demonstrando ação fungicida da fração 2 contra *P. avelani* na dosagem de 1,0 mg/mL.

Apesar de em todos os testes de atividade antimicrobiana os resultados mais promissores foram os obtidos frente o *P. avelani*, o mesmo não ocorreu nos teste de atividade fungicida das frações 1 e 2. Esse resultado demonstra a importância da realização desse teste, uma vez que essa avaliação comprova a efetiva ação do composto investigado frente aos microrganismos patogênicos.

6 CONCLUSÕES

1) Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana das folhas da espécie *M. guianensis*, não foi possível observar nenhum resultado positivo utilizando os extratos etanólico, metanólico, hexânico e acetato de etila, nem o óleo essencial, contra as cepas patogênicas teste. Neste sentido, a espécie vegetal em questão não se mostrou promissora quanto à produção de substâncias com essa bioatividade.

2) A pesquisa objetivando o isolamento e análise da diversidade de fungos albergados em *M. guianensis* se mostrou oportuna e promissora, tendo em vista três questões: a carência de trabalhos sobre esses temas relacionados a essa espécie vegetal; a quantidade de fungos isolados, um total de 156, e os diferentes gêneros que foram identificados. O caule e as folhas se mostraram as partes da planta mais promissoras quanto ao isolamento de fungos endofíticos de *M. guianensis*, com taxa de colonização (TC) de 0,184 e 0,174, respectivamente.

3) Dos 46 fungos endofíticos selecionados para cultivo em meio líquido e testes de antibiose, 4 apresentaram alguma capacidade inibitória frente às cepas *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *P. avelani*. Esse fato demonstrou que esses isolados possuem, através de seu metabolismo secundário, a capacidade de sintetizar substâncias antibióticas.

4) A linhagem **MgRe2 2.3B** mostrou-se a mais promissora nos testes de antibiose. Primeiro, por apresentar as maiores médias de halos de inibição em comparação as outras linhagens. Médias de 12,5 mm contra *S. aureus*, 15,0 mm contra *E. faecalis* e 43,3 mm contra *P. avelani*. Segundo, por demonstrar capacidade inibitória tanto contra fungo, quanto contra bactérias.

5) O extrato AEI1 obtido da linhagem **MgRe2 2.3B** apresentou os resultados de atividade antimicrobiana mais promissores, com halos de inibição médios de 23,3 mm para *S. aureus*, 24,3 mm para *E. faecalis* e de 22,3 mm contra *P. avelani*, sendo escolhidos para fracionamento em coluna.

6) As frações 1 e 2 apresentaram resultado positivo frente as três cepas teste, demonstrando possuírem entre seus constituintes a(s) molécula(s) bioativa(s) investigada(s). A análise por CLAE demonstrou que a substância 2 presente na F1 e a substância 3 presente na F2 são provavelmente a mesma substância.

7) Nos testes para determinação da Dose Mínima Inibitória, tanto a fração 1 quanto a fração 2 demonstraram possuir capacidade inibitória frente a *S. aureus* até a dose de 0,25 mg/mL. Essas frações também mostraram capacidade inibitória frente a *P. avelani* até a dose de 0,125 mg/mL. Já contra *E. faecalis* a fração 1 demonstrou capacidade inibitória até a dose de 0,50 mg/mL, enquanto que a fração 2 até a dose de 0,50 mg/mL.

8) Nos testes para determinação da Dose Mínima Bactericida ou Fungicida, tanto a fração 1 quanto a fração 2 não demonstraram capacidade bactericida frente a *E. faecalis*. Entretanto, os constituintes dessas frações exercem função bacteriostática para esse microrganismo. Para a bactéria *S. aureus* as frações demonstraram ação bactericida até a dose de 0,50 mg/mL. Já nos testes realizados com *P. avelani*, as frações demonstraram ação fungicida apenas quando ambos se encontravam na dose de 1,0 mg/mL.

Os resultados obtidos nos permitem concluir que a espécie vegetal *Myrcia guianensis* não se mostrou promissora candidata na obtenção de compostos antimicrobianos. Entretanto, os resultados indicam que os fungos endofíticos de *M. guianensis* são promissores para a busca de substâncias com atividade antimicrobiana. Dessa maneira, os resultados obtidos neste trabalho corroboram as indicações de que fungos endofíticos são uma fonte promissora de substâncias bioativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLHOLM, M. J. U.; HELANDER, M.; LEHTIMAKI, S.; WALI P.; SAIKKONEN, K. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. **Oikos**, v. 99, p. 173-183, 2002.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 517-524, 2006.

ANKE H.; WEBER R. W. S.; KAPPE R.; PAULULAT T.; MOSKER E. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 886-892, 2007.

AKERELE, V. H.; SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

AKIMENKO, V. K.; MEDENTSEV, A. G. Nafhtoquinone metabolites of the fungi. **Phytochemistry**, v. 47, n.6, p. 935-959, 1998.

ALTERTHUM, M. F. **Elementos de microbiologia**. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotechnology Industrial*. Editora Blucher, vol. 1, 254p, 2001.

ARAÚJO, A. R.; CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., Um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n.6, p. 991-995, 2005.

ARAÚJO, A. R.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; HADAD, R.; BOLZANI, V. S. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

ARAÚJO, W. L.; LIMA A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY, S. J.; LACAVA, P. T. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2002.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, suplemento 2, v. 22, p. 225-229, 1999.

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

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects**. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. *Fungi: multifaceted microbes*, p. 189-207, 2007.

- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3a edição. 1972.
- BARREIRO, E. J. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, v. 13, n.1, p. 29-39, 1990.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol. 2, Imprensa Universitária: Viçosa, 377 p, 1984.
- BARROSO, G. M.; PERÓN, V. **Myrtaceae**, In: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Aspectos florísticos das espécies vasculares. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, vol.1: 261-302, 1994.
- BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 724-728, 2005.
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.
- BRADY, S. F.; BONDI, S. M.; CLARDY, J. The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 9900-9901, 2001.
- BORGES-ARGÁEZ, R.; CANCHE-CHAY, C. I.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; MOLINA-SALINAS, G. M. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 370-372, 2007.
- BRAND, A.; GOW, N. A.; Mechanisms of hypha orientation of fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, p. 350-357, 2009.
- CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, suplement. 1, v. 12, p. 132-135, 2002.
- CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, M. D.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CASS, Q. B.; BELTRAME, F. L.; FILHO, E. R.; BARROS, F. A. P.; CORTEZ, D. A. G. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catiguá* used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 257-263, 2006.
- CASTELLANI, A. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medical and Hygiene**, v. 42, p. 225, 1939.
- CEBALLOS, B. S. O; URTIGA, R. F; BARBOSA, R. C. S. B. C.; LIMA, E. O. Atividade Antimicrobiana de produtos naturais sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas recreacionais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 74, p. 4-6, 1993.

CECHINEL, V. F.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHE, Y.; LIU, L.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L. Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 606-613, 2009.

CHENG, A. B.; WANG, F. W.; JIAO, R. H.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 79-83, 2007

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, v. 74, n. 6, p. 1767-1777, 1993.

COELHO, S. G.; HASS, A. P. S.; VON, P. G. L.; ACHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 2^a. ed. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, 1982.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 998-1003, 2007.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; ROQUE, N. F. MARTINS, D. GUEDES, M. L. S.; MARQUES, E. J. **Componentes voláteis de quatro espécies do gênero *Myrcia* (Myrtaceae)**. 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES M. L. S. **Composição química dos óleos voláteis de *Myrcia rotundifolia* (Myrtaceae) em diferentes meses do ano**. 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003.

CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; ROQUE, N. F. MARTINS, D. GUEDES, M. L. S.; MARQUES, E. J. **Composição química dos óleos voláteis de *Myrcia salzmannii* Berg (Myrtaceae) em diferentes meses do ano**. XXVI Congresso Latinoamericano de Química, 2004.

DEBBAB, A.; ALY A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHACHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H.; MOSADDAK, M.; HAKIKI, A.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. **Journal of Natural Products**, v.72, n. 4, p. 626-631, 2009.

DIJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307-313, 2000.

DING, G.; LIU, S.; GUO, L.; ZHOU, Y.; CHE, Y. Antifungal Metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 4, p. 615-618, 2008.

DI STASI L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência – guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, Editora UNESP, 1996.

DORNELES, L. P. P.; WAETCHTER, J. L. Fitossociologia do componente arbóreo na floresta turfosa do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta botânica brasílica**, v. 18, n. 4, p. 815-824, 2004.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, suplemento 1, v. 14, p. 6-8, 2004.

EBEL, R.; ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp.* isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1716-1725, 2008.

FABRIS, L. C.; CESAR, O. Estudos florísticos em uma mata litorânea no sul do Estado do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 5, p. 15-46, 1996.

FAHEY, J. W. **Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants**. In: Curtler H.O. Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture. American Chemical Society Symposium, p. 120-128, 1988.

FALKENBERG, M. B. **Quinonas**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFSC. 6ª Edição, cap. 25, p. 657-683, 2007.

FEARNSIDE, P. M. **A Floresta Amazônica nas mudanças Globais – Manaus**. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), 134 p, 2003.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia: Dinâmica, impactos e controle. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 395-400, 2006.

GAO, J. M.; QIN, J. C.; ZANG, Y. M.; BAI, M. S.; YANG, S. X.; LAATSCH, H.; ZANG, A. L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 1572-1574, 2009.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 240-254, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora UFSC, 6ª Edição, cap. 1, p. 13-28, 1999.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from plant-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of their Occurrence. **Journal of Natural Products**, n. 69(3), p. 509-526, 2006.

GUOLIN, Z.; SHUNYING, Z.; YUE, Y.; HUAIDONG, Y.; YANG, Y. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 96, p. 151-158, 2005.

HALLMANN, J., SIKORA, R. A. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and soil-Borne Plant Pathogenic Fungi. **European Journal of Plant Pathology**, n. 102, p. 155-162, 1996.

HANADA, R. E; POMELLA, A. W. V.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic funga diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of Black-pod disease. **Fungal Biology**. n. 30, p. 1-10. 2010.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 43(10), p. 895-914, 1997.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Editora UFSC. 6ª Edição, cap. 29, p. 765-791, 2007.

HERTWECK, C.; ABDU, R.; SCHERLACH, K.; DAHSE, H. M.; SATTLER, I. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medical plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, n.71, p. 110-116, 2010.

HEINRICH, M.; LEONTI, M.; STICHER, O. Medicinal plants of the Popolucá, México: organoleptic properties as indigenous selection criteria. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 81, p. 307-315, 2002.

HOFFMAN, A. M.; MAYER, S. G.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; SOVOCOL, G. W.; GRANGE, A. H.; KELLEY-SWIFT E. G. Purification, identification and activity of phomodione, a furrandione from an endophytic *Phoma* species. **Phytochemistry**, n. 69, p. 1049-1056, 2008.

HORA, S. L.; NAIR, K. K. Pollution of streams and conservation of fisheries. **Proceedings of the National Institute of Science of India**, n. 10, p 147-166, 1944.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanones A and B, Novel

Xanthone Dimers from the Endophytic Fungus *Phomopsis* Species. **Journal of Natural Products**, n. 64, p. 1015-1018, 2001.

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

KOŁODZIEJCZYK, P. P.; LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, n. 69, p. 1732-1738, 2008.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 1, 1996.

KIM, S.; SHIN, D.; LEE, T.; BONG, O. K. Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with Antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, n. 67(3), p. 448-450, 2004.

KUNZ, S. H.; IVANAUSKAS, N. M.; MARTINS, S. V.; SILVA, E.; STEFANELLO, D. Aspectos florísticos e fitossociológicos de uma trecho de floresta Estacional Perenifolia na Fazenda Trairão, Bacia do rio Pacas, Querência – MT. **Acta Amazonica**, n. 38(2), p. 245-254, 2008.

KUSTER, R. M.; NETO, J. C.; SILVA, A. J. R.; AMORIM, M. B.; FELIX, C. F.; SANTOS, P. S.; SCOFANO, H. M. **Flavonóides inibidores de ATPases de *Myrcia uniflora* (Myrtaceae)**. 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ/maio 2003.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil – an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, n. 49, p. 508-536, 1997.

LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, n. 57, p. 261-265, 2001.

LICCIARDI, P. V.; UNDERWOOD, J. R. Plant-derived medicines: A novel class of immunological adjuvants. **Internacional Immunopharmacology**, *In Press*, 2010.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANTANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira Farmacognosia**, n. 16, p. 300-306, 2006.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, n. 27, p. 6, 2004.

LINARES-RODRIGUES, J. F.; MARTINEZ-MENENDEZ, J. L. Antimicrobial resistance and bacterial virulence. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, n. 23(2), p. 86-93, 2005.

LOGUERCIO-LEITE, C. **Taxonomia de fungos**. In: EPOSITO E.; AZEVEDO J. L. Fungos: Uma introdução à biologia bioquímica e biotecnologia. Editora, EDUCS. Cap. 2, pg.45-88, 2004.

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

MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia* sp. CY064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, n. 75, p. 451-456, 2004.

MAIA, M. M. D.; MORAIS, M. M. C; MORAIS, JR. M. A.; MELO, E. H. M.; FILHO, J. L. L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, n. 30, p. 304-309, 1999.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, n. 25(3). p. 429-438, 2002.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas – Myrtales**. Editora da UFSM, Santa Maria, 1997.

MARQUES, M. B. Patentes farmacêuticas e acessibilidade a medicamentos no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, n. 7(1), p. 7-21, 2000.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HERRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, n. 68, p. 2015-2022, 2007.

McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, n. 173(2), p. 337-342, 1995.

MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C. O. **Óleos essenciais, métodos de extração e identificação**. In: SERFINI, L. A.; SANTOS, A. C. A.; TOUGUINHA, L. A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. Extração e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. Editora Caxias do Sul, 55p, 2002.

MENTZ, L. A.; VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 15(4), p. 361-372, 2005.

MILLER, J. D.; SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; SORENSEN, D.; BLACKWELL, B. A.; Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. **Phytochemistry**, n.71, p. 760-765, 2010.

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

MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. família Myrtaceae na Reserva Particular do Patrimônio Natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, n. 7(1), p. 3-32, 2006.

MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamari*. **Revista de Microbiologia**, n. 30, p. 157-162, 1999.

MORRI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M.; SANTOS, T. S. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern brazilian wet forest. **Biotropica**, n. 15, p. 68-70, 1983.

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 32, p. 694-698, 1976.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified Acremonium endophyte. **Molecular General Genetics**, n. 233, p. 1-9, 1992.

MUSELLI, A.; BENDAHO, M.; GRIGNON-DUBOIS, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J.; BERNARDINI, A.; COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. **Food Chemistry**, n. 106, p. 132-139, 2008.

NAKASHIMA, T.; FRANCO, J.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. Ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 15(3), p. 191-194, 2005.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C., SILVA, L.G. antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.31, p. 247-256, 2000.

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

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos**. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, 239, 2003.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L., DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, P. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 13(supl. 2), p. 5-7, 2003.

OLIVEIRA, A. R. M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, n. 32(7), p. 1971-1974, 2009.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17, p. 186-190, 2007.

PANACCIONE, D. G.; ANNIS, S. L. Significance of fungal peptide secondary metabolites in the agri-food industry. **Applied Mycology and Biotechnology**, n. 1, p. 115-143, 2001.

PANACCIONE, D. G.; SCHARDL, C. L.; COYLE, C. M. Pathways to diverse ergot alkaloid profiles in fungi. **Recent Advances in Phytochemistry**, n. 40, p. 23-52, 2006.

PEIXOTO, A. L.; GENTRY, A. Diversidade e composição florística da mata de tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares, Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 13, p. 19-25, 1990.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHEZ, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAZ-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 13(Supl. 1), p. 21-24, 2003.

PETRINI, O. **Fungal endophyte of tree leaves**. In: ANDREWS J.; HIRANO S. S. *Microbial Ecology*, p. 179-197, New York, 1991.

RODRIGUES, R. R.; MORELLATO, L. P. C.; JOLY, C. A.; LEITÃO FILHO, H. F. Estudo florístico e fitossociológico em um gradiente altitudinal de mata estacional semidecídua, na Serra do Japí, Jundiá, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 12, p. 71-84, 1989.

RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KERTIKARA, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, n. 69, p. 783-787, 2008.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary so results from three years so the SENTRY antibacterial surveillance Program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 5(4), p. 200-214, 2001.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with Host Plants. **Annual Reviews Ecology Systematic**. n. 29, p. 319-343, 1998.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 18(2), p. 241-244, 2008.

SANTOS, R. I. **Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6ª edição, 2007.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P.; **Taninos**. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL., E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da*

planta ao medicamento. 2ª edição, Porto Alegre, Universidade/ UFGS/ed. UFSC, 2000. cap. 24, p. 517 -544, 2007.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia padulosa*) (Asteraceae).** Dissertação de Mestrado, Universidade do Vale do Itajaí, Brasil, 2005

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, n. 109(6), p.661-686, 2005.

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

SERAFIN, C.; NART, V.; MALHEIROS, A.; CRUZ, B. A.; MONACHE, F. D.; GETTE, M. A.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 17(4), p. 578-582, 2007.

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 Brasílica**, n. 20(3), p. 649-655, 2006.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas.** Instituto de Botânica. Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLES, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª Edição, Editora Guanabara, 1994.

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFSC, 6ª Edição, cap. 18, p. 467-495, 2007.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, n. 34(2), p. 185-195, 2004.

SOUZA, M. M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M. B.; KRUEGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; BELLA CRUZ, R. C. **Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos.** In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, ed Univali, p. 239, 2003.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de alimentos**, n. 18(4), p. 382-385, 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, n. 260(5105), p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 22(4), p. 315-333, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 67(4), p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. A.; EZRA, D. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, n. 165, p. 1229-1238, 2003.

STROBEL, G.; STINSON, M.; EZRA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, n. 165, p. 913-922, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, n. 67(2), p. 257-268, 2004.

SU, W.; WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 193, p. 249-253, 2000.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, n.23, p. 9-19, 2009.

TAN, R. X.; LI, Y.; SONG, Y. C.; MA, Y. M.; LIU, Y. M. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 21, p. 553-558, 2005.

TAN, R. X.; MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J.Y.; SONG, Y. C. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, n. 75, p. 451-456, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, n. 18, p. 448-459, 2001.

TAN, R. X.; GE, H. M.; SHEN, Y.; ZHU, C. H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, n. 69, p. 571-576, 2008.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos**. 3^a.edição. São Paulo: Ateneu, p. 374; 1984.

TSIMIDOU, M. Z.; MANTZOURIDOU, F. One the monitoring of carotenogenesis by *Blakeslea trispora* using HPLC. **Food Chemistry**, n. 104, p. 439-444, 2007.

VERZA, M.; ARAKAWA, N. S.; LOPES N. P.; KATO, M. J.; PUPO, M. T.; SAID, S.; CARVALHO, I. Biotransformation of a tetrahydrofuran lignin by the endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 20(1), p. 195-200, 2009.

VILA-AIUB, M.; GUNDEL, P. E.; GHERSA, C. M. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. **Australian Ecology**, n. 30, p. 49-57, 2005.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots on soybean. **Microbial Ecology**, n. 24, p. 305-311, 1992.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n.34, p. 51-57, 2002.

WAGENLEHNER, F. M.; WEIDNER, W.; NABER, K. G. Emergence of antibiotic resistance among hospital-acquired urinary tract infections and pharmacokinetic/pharmacodynamic considerations. **The journal of Hospital Infection**, n. 60(3), p. 191-200, 2005.

WENIGER, B. Interest and limitation of a global ethnopharmacological survey. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 32(3), p. 37-41, 1991.

WHITE, Jr. J. F.; MARTIN, T. I.; CABRAL, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phyllplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. **Mycologia**, n. 88(2), p. 174-178, 1996.

WHITE, Jr., J. F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R. F.; BISCHOFF, J. F.; LEWIS, E. A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development of symbiotic interaction with plants. **Symbiosis**, n. 33, p. 201-213, 2002.

WICKLOW, D. T.; ROTH, S.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, n. 109(5), p. 610-618, 2005.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a mark Phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, n. 251, p. 3-19, 2005.

YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H.; NISHIDA, N. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. V. Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC.(2): Structures of Myrciacitrins III, IV, V. **Chemical Pharmacology Bulletin**, n. 50(3), p. 429-431, 2002.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, n. 165, p. 437-449, 2010.

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

XU, H. X.; LEE, F. Song activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, n. 15, p. 39-43, 2001.

ZANOTTO, S. P.; ROMANO, I. P.; LISBOA, L. U. S.; DUVOISIN, JR., S.; MARTINS, M. K.; LIMA, F. A.; SILVA, S. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 20(6), p. 1046-1059, 2009.

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

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFSC, 6^a Edição, cap. 23, p. 577-614, 2007.