



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA**

**DIVERSIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.**

Aline Barreto dos Santos

RIO BRANCO - AC

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA

**DIVERSIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.**

Aline Barreto dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica.**

Área de concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Orientadora Prof. Dr^a. Clarice Maia Carvalho

Rio Branco - Acre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA

DIVERSIDADE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
DE *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.

ALINE BARRETO DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 14/04/2016.

Prof. Dr^a. Clarice Maia Carvalho (Orientadora)
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza (Membro)
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Prof. Dr. Josimar Batista Ferreira (Membro)
Universidade Federal do Acre – (UFAC)

Dedico

À minha amada mãe, Maria da Trindade, que com todo seu amor por mim, me ensinou o sentido da vida.

À minha amada família, Leandro e Alice, que tornam meus dias doces e coloridos.

AGRADECIMENTOS

Não fazemos nada, nessa vida, sozinhos! Triste daquele que do mundo se isola e das pessoas se afasta. Por isso, agradeço:

A Deus, primeiramente, estar comigo em todos os momentos, triste ou alegres e ser o meu refúgio nas horas do desespero e da apatia.

Ao meu marido, Leandro Coradin, por ter acreditado em mim, muitas vezes até mais que eu mesma, todo incentivo, apoio, amizade, compreensão e todos os pequenos gestos no dia-a-dia ao longo desse tempo, que foram mais uma prova de amor e cumplicidade, fundamentais para a serenidade.

Ao meu irmão, Peterson Barreto, por ter cuidado da minha filha Alice, coisa mais preciosa da minha vida, nos meus muitos momentos de ausência.

Aos meus chefes de trabalho, Prof. Paulo Roberto Souza, Direto Geral e Prof.^a Maria Cristina Lobregat, Diretora de Ensino do Campus Rio Branco do Instituto Federal do Acre – IFAC e à Gerente Geral do Laboratório de Saúde Pública do Acre - LACEN /AC, Dra. Cláudia D’avila Modesto, pelo apoio e incentivo à minha qualificação profissional.

Às amigas do Registro Escolar (IFAC), Luciana Nogueira, Diana Hadaça, Sígliã Ferraz, Mileide Moura, Camila Caroline e Denise Lopes por todas os momentos de descontração que foram fundamentais para tomar fôlego e continuar a jornada.

Às amigas, Madelleyne Soares, Madeleyne Hidalgo e Luciana Maia (LACEN/AC) por todos os conselhos e ensinamentos que me levaram a ser uma pessoa melhor, sempre em construção.

Às Técnicas de Laboratório Socorro Régio e Patrícia Alessandra do Setor de Biologia Molecular, LACEN/AC, pelo apoio e compreensão durante o desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

À EMPRABA-AC na pessoa de seu Diretor-Presidente, Sr. Eufra Ferreira do Amaral, por autorizar a coleta do material botânico para a pesquisa, ao Prof. Dr. Marcus Vinício de Oliveira e aos analistas Robert Thompson e Fernando Pettri pela gentileza, atenção e esforço ensinando-me o caminho das pedras e o assistente de campo Aldecir, Oliveira que nos ajudou a coletar os galhos e folhas do mulateiro. Todos foram fundamentais para o início dos trabalhos. Sempre lembrarei da cortesia de todos.

Aos alunos pupilos da Prof.^a Clarice Maia Carvalho (CMC) do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre – UFAC, Fernanda, Geysel, Joana, Adeilson, Erlan, Victor, Ivan e Atilon, por todos os momentos bons e ruins que compartilhamos durante a jornada. A juventude e a inquietude, própria dessa fase da vida é muito incentivadora a querer buscar sempre o melhor.

Aos meus companheiros de aventuras, Rodrigo Asfury (Gúíí), Maria Gomes e Sebastião (Sebas), o quarteto fantástico, pelas muitas gargalhadas desesperadas a cada seminário, experimento e testes que precisamos realizar. Uma boa dose de humor sempre ajuda a animar os desesperados (risos).

Ao João Paulo, Pós-Doutor, pelos cafés, coleguismo, mas principalmente pelo exemplo de simplicidade e compromisso. O Brasil precisa de mais pessoas com o seu grau de inteligência, humildade e dedicação para ir mais longe.

Ao meu querido amigo, Gleison Rafael de todas as horas difíceis, todas as angustias, expectativas quanto aos resultados de meses de trabalho árduo, sacrificando finais de semana, noites em claro e livros como travesseiros, mais principalmente pelo exemplo de perseverança, compromisso, competência e foco. Sem sua ajuda, tudo seria ainda mais difícil. Minha admiração vai muito além da bancada e dos livros, pois certamente, tenho em você exemplos de bom caráter, integridade, honestidade e lealdade, atributos que respeito e prezo. Tenho orgulho de ter trabalhado com você. Conte sempre comigo!

À minha querida Orientadora, “CMC”, que antes de mais nada, provou que é possível “tirar leite de pedra” ao aceitar o desafio de me orientar. Mulher de uma fibra incontestável, de rigidez e compromisso incorruptíveis ao trabalho em favor da Ciência e que faz valer o “P” maiúsculo de Pesquisadora e Professora dedicada, sem no entanto, ser desviada pela tentação da vaidade e que tem um jeito muito particular de ser meiga, mesmo quando precisa nos apontar nossas falhas de modo mais enfático e pragmático. Com toda certeza, fui privilegiada duas vezes ao ter sido acolhida por você: privilegiada por ter um exemplo profissional a ser perseguido e conquistado e por ter sua amizade.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Acre – FAPAC, pelo fomento de parte da pesquisa.

A todos, o meu mais sincero “OBRIGADA! ”.

RESUMO

A bioprospecção de produtos naturais amazônicos tem se mostrado um campo promissor para a descoberta de novas substâncias químicas. Os fungos endofíticos, microrganismos habitantes de tecidos vegetais em simbiose com seu hospedeiro, tem demonstrado alto potencial para a produção de novos compostos com valor comercial agregado a partir da produção de seus metabólitos primários e secundários. A espécie *Calycophyllum spruceanum*, (mulateiro) nativa da Amazônia, é conhecida por propriedades etnofarmacológicas, para tratamento de infecções de pele, cicatrizante, doenças gástricas e uterinas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a população de fungos endofíticos de *C. spruceanum* e averiguar se os metabólitos produzidos pelos fungos isolados possuíam atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. Foram utilizados um total de 480 fragmentos de caule e folha oriundos de 03 exemplares de *C. spruceanum* que foram desinfetadas previamente para a retirada de epifíticos e inoculados em 04 diferentes meios de cultura (BDA; BDA+extrato; Sabouraud; Sabouraud+extrato) que foram incubados em 02 temperaturas distintas (18°C e 28°C). Foram isolados 650 fungos filamentosos, sendo 322 de folhas e 328 de caule, que foram agrupados em 243 táxons após a análise macrocromorfológica. 23,9% dos fungos não puderam ser identificados por não terem apresentar estruturas reprodutivas na análise microscópica. Os demais táxons foram identificados até o nível de gênero em *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Guignardia* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Pyricularia* sp.; *Trichoderma* sp. e *Xylaria* sp. Os mais frequentes foram *Phomopsis* e *Colletotrichum* enquanto que *Acremonium* sp., *Pyricularia* sp. e *Trichoderma* sp. foram fungos minoritário, com apenas um isolado. A comunidade endofítica de *C. spruceanum* apresentou-se com elevados valores de diversidade (Evenness = 0,4317; Simpson = 0,7839; Shannon = 1,868). De cada táxon foi retirado um exemplar para produção de metabólito que posteriormente foram avaliados quanto a capacidade de inibir o crescimento de cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Vinte e dois metabólitos foram capazes de produzir halos de inibição contra *E. coli* e apenas um metabólito produziu halo de inibição contra *K. pneumoniae*, ambas bactérias Gram negativas.

Palavras – chaves: mulateiro, bioprospecção, antibióticos.

ABSTRACT

Bioprospecting of Amazonian natural products has been a promising field for the discovery of new chemicals. The endophytic fungi, microorganisms living in plant tissues in symbiosis with its host, it has shown high potential for production of novel compounds with commercial added value from the output of its primary and secondary metabolites. The species *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) native to the Amazon, is known for ethnopharmacology properties for the treatment of skin infections, healing, gastric and uterine diseases. The aim of this study was to characterize the population of endophytic fungi *C. spruceanum* and ascertain whether the metabolites produced by fungi isolated had antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacteria. A total of 480 leaf and stem fragments derived from 03 *C. spruceanum* copies were used, that were previously disinfected for withdrawing epiphytic and inoculated in 04 different culture media (PDA, PDA + extract; Sabouraud; Sabouraud + extract) that were incubated in 02 different temperatures (18 °C and 28 °C). 650 filamentous fungi were isolated, and 322 from leaves and 328 from stem that have been grouped into 243 taxa after macrocromorfológica analysis. 23.9% of the fungi could not be identified because they did not present reproductive structures in microscopic analysis. The other taxa were identified to genus level in *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Guignardia* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Pyricularia* sp.; *Trichoderma* sp. and *Xylaria* sp. The most frequent were *Phomopsis* sp. and *Colletotrichum* sp., while *Acremonium* sp., *Pyricularia* sp. and *Trichoderma* sp. fungi were minor, with only one isolate. Endophytic community *C. spruceanum* presented with high diversity values (Evenness = 0.4317; 0.7839 = Simpson, Shannon = 1.868). Each taxon was removed to produce a copy metabolite that were subsequently evaluated for the ability to inhibit the growth of Gram positive bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) and Gram negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Twenty-two metabolites were able to produce inhibition halos only against *E. coli* and a metabolite produced inhibition zone against *K. pneumoniae*, both Gram negative bacteria.

Key-words: mulateiro, bioprospecting, antibiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árvore de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	25
Figura 2.	Secoiridóides presentes nos extratos etanólicos da casca de <i>Callycophyllum spruceanum</i>	30
Figura 3.	Fluxograma de atividades de isolamento, e identificação de fungos endofíticos de <i>Callycophyllum spruceanum</i>	33
Figura 4.	Etapas do processo de isolamento dos fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	36
Figura 5.	Etapas do processo de purificação dos fungos wndofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	36
Figura 6.	Etapas do processo de identificação dos fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	37
Figura 7.	Etapas do processo de produção de metabólitos pelos fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	38
Figura 8.	Etapas dos procedimentos para a realização do teste antimicrobiano dos metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	39
Figura 9.	Frequência de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i> identificados.	45
Figura 10.	Aspectos macroscópicos de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i> em meio BDA	51
Figura 11.	Aspectos micromorfológicos de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	51
Figura 12.	Halos de inibição produzidos por metabólitos de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i> contra <i>E. coli</i>	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Informações dos indivíduos coletados de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	34
Tabela 1.	Índice de infecção dos fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	42
Tabela 2.	Fungos endofíticos isolados de <i>Calycophyllum spruceanum</i> de acordo com o tecido vegetal, meio de cultura e temperatura	44
Tabela 3.	Índice de diversidade de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	52
Tabela 4.	Fungos de <i>Calycophyllum spruceanum</i> com atividade contra <i>E. coli</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ATCC	American Type Culture Collection
BD	Batata-dextrose
BDA	Batata-dextrose-ágar
BDA	Meio de Dextrose e Batata
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EM	Extrato de malte
ESBL	Enzimas beta-lactamases de espectro estendido ou amplo espectro
et al	Expressão em latim para “e outros” usada em citações bibliográficas quando há vários autores.
fMet-RNAt	RNA transportador de formil metionina
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LB	Luria Bertani
MH	Müller-Hinton
mL	Mililitro
PABA	Ácido para-aminobenzóico
RNA	Ácido ribonucleico
UTM	Universal Transversa de Mercator
YM	Yeast Medium
β	Segunda letra do alfabeto grego, beta minúsculo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Resistência bacteriana aos antibióticos	15
2.2 Produtos naturais como fonte de novos antibióticos	20
2.3 Microrganismos endofíticos	22
2.4 <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. F. ex K. Schum	24
2.4.1 Caracterização da espécie	25
2.4.2 Ocorrência da espécie	27
2.4.3 Etnofarmacologia	27
2.4.4 Metabólitos	28
2.4.5 Atividades biológicas	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Coleta de material botânico	33
4.2 Isolamento e guarda de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	35
4.3 Identificação dos fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	37
4.4 Avaliação de atividade antibacteriana	38
4.5 Diversidade da comunidade endofítica: cálculo dos índices infecção, de diversidade, riqueza e dominância	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Análise da comunidade de fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	42
5.2 Atividade antimicrobiana fungos endofíticos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	53
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

A procura por novos medicamentos, que possam combater os males que acometem o homem, está intimamente relacionada aos produtos naturais, particularmente àqueles oriundos de plantas utilizadas pela etnofarmacologia. Isto impulsiona pesquisadores, Universidades, Programas de Incentivo à Pesquisa e a indústria farmacêutica a investirem em pesquisas de ordem tecnológica para tais fins.

Visto a Floresta Amazônica abrigar cerca de 50% da biodiversidade do planeta, e que quase 70% da área desta floresta está localizada na Amazônia brasileira, esse território é reconhecido como um importante centro biológico de diversidade global, sendo o Brasil considerado um dos países com a maior biodiversidade do planeta, detendo cerca de um terço das florestas tropicais do mundo (NERI-NUMA et al., 2013; GILBERTONI et al., 2015). Há, portanto, necessidade de ampliar ainda mais os estudos acerca de tal potencial deste bioma.

Entre os seres componentes do bioma amazônico, também há destaque para os microrganismos, que ainda carece de mais conhecimento sobre o uso desta biodiversidade como fonte de novos produtos com ação bioativa. Dentre as espécies de microrganismos que podem ser estudadas para este fim estão os microrganismos endofíticos, que compreendem principalmente, fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, e que tem despertado o interesse científico por ter demonstrado ser uma importante fonte de produtos bioativos (AZEVEDO, 1998; STROBEL et al., 2004; CHAPLA et al., 2012). Sua importância justifica-se por esses seres serem capazes de produzir enzimas (BEZERRA et al., 2012), substâncias com atividades antitumoral (CHANDRA, 2012) e antimicrobiana (SIQUEIRA et al., 2011; PINHEIRO et al., 2013; BEZZERA et al., 2015), entre outras.

Entre os exemplos dos efeitos benéficos que seus metabólitos secundários produzem estão o já renomado medicamento Taxol®, cujo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*,

endófito de *Taxus brevifolia*, também produz o mesmo princípio ativo isolado da planta utilizado no tratamento de cânceres de útero e mama (STROBEL et al., 2004).

Uma das espécies vegetais amazônicas com possibilidades de estudos sobre suas atividades biológicas é *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum., que pertence à família Rubiaceae sendo popularmente conhecida como mulateiro, pau-mulato, escorrega-macaco pela população ribeirinha brasileira (RECORD; HESS, 1943; RIZZINI, 1971; GUITTON, 1991). Natural da região amazônica, é frequentemente utilizada na etnomedicina como cicatrizante e rejuvenescedor (CAETANO et al., 2014), além de ser usada no controle de manchas de pele. Isto, aliado a produção de metabólitos funcionais para o tratamento de doenças, deixa evidente o potencial farmacológico desta espécie.

Visto não haverem relatos na literatura sobre o estudo de endófitos de *C. spruceanum*, este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade de fungos endofíticos presentes nesta planta e se estes são capazes de produzir compostos com atividade antibacteriana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resistência bacteriana aos antimicrobianos

O crescimento das populações de microrganismos multirresistentes, tanto em ambientes hospitalares quanto em comunidades, pode estar ligada a uma associação de fatores, como a evolução natural, a pressão seletiva exercida pelas drogas sobre os microrganismos, a troca de informações genéticas entre microrganismos, com transferências de genes para novos hospedeiros e as mutações prováveis que podem gerar genes de resistência (AGUIAR, 2014). Além destes fatores naturais, a resistência pode surgir ainda em decorrência de práticas pobres de controle e prevenção de infecção, uso indevido/inadequado de medicamentos antimicrobianos, incluindo na criação de animais, e diagnóstico, prevenção e terapêutica insuficientes (NATHAN, 2004; KURODA; CAPUTO, 2013).

A resistência acontece através de dois grandes mecanismos: mutação num loci do cromossoma ou transferência horizontal de genes, isto é, por aquisição de genes de resistência anteriormente presentes noutros microrganismos (BAPTISTA, 2013).

Os genes responsáveis pela resistência contidos em plasmídeos, normalmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células. Em contraste, a resistência conferida por mutações cromossomais envolve a modificação do alvo. Se o erro for um benefício para a bactéria, como no caso da resistência aos antibióticos, então tenderá a predominar naquela espécie. Assim o maior problema da resistência mediada por mutação é a sua transmissão às gerações seguintes (HARRISON, 2015).

A transferência horizontal de genes é um processo de aquisição de material genético entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes. Pode ocorrer por três mecanismos, transformação, transdução ou conjugação e ainda por transposição (GUIMARÃES, 2010; BAPTISTA, 2013).

Com frequência bactérias utilizam mais de uma estratégia para evitar a ação dos antimicrobianos. Os mecanismos de resistência conhecidos são: a) alteração da permeabilidade da membrana celular; b) alterações do sítio de ação dos antimicrobianos; c) bomba de efluxo; d) mecanismos enzimáticos (ANDRADE, 2013).

As infecções nosocomias resultam da interação de diversos fatores, e dentre estes, a existência de microrganismos multirresistentes e sua virulência nos ambientes hospitalares, a presença de hospedeiros em condições debilitadas ou favoráveis para a penetração de microrganismos e a cadeia de transmissão hospitalar (BATISTA; RODRIGUES, 2012; MELLO, 2014). A ocorrência isolada de qualquer um desses fatores não é suficiente para que a infecção ocorra. Dois ou mais fatores são imperativos para representar um risco significativo e se relacionam com os sistemas e processos de prestação de cuidados e ainda com os comportamentos de higiene dos profissionais de saúde (PINA et al., 2011; MELLO, 2014).

A resistência microbiana é uma ameaça à prevenção e ao tratamento eficaz de doenças causadas por microrganismos patogênicos. Essas têm sido relatadas para vários agentes infecciosos diferentes, como o insucesso do tratamento com drogas de última geração (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Relatos de resistência a antimicrobianos não são recentes. Já na década de 40, após a descoberta e posterior uso da penicilina em larga escala durante a Segunda Guerra Mundial, cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de penicilinas, conhecidas também como β -lactamases, sobreviviam à terapêutica (CARACIOLO, 2011; MELLO, 2014). Essas enzimas são a principal causa de vários fracassos terapêuticos das penicilinas e análogos diante de inúmeros microrganismos porque são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, inativando a ação antibiótica dessas drogas. Existem ainda as enzimas β -lactamases de amplo espectro ou espectro estendido (ESBL), decorrentes de

mutações de genes de resistência mediadas, principalmente, por plasmídeos (SILVA, LINCOPAN, 2012; BAPTISTA, 2013; MELLO, 2014).

Algumas bactérias patogênicas são mais frequentemente associadas a casos de infecção com resistência a antimicrobianos, como é o caso das Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, e as Gram negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (GRILLO et al., 2013)

Staphylococcus aureus são bactérias Gram-positivas agrupadas em cachos, semelhantes a cachos de uva, não-fastidiosas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, suas colônias possuem pigmentos que variam de branco a amarelo e são catalase-positivas e fazem parte da microbiota humana (NASCIMENTO, 2014). Estas também são um importante agente patogênico oportunista e persistentemente coloniza cerca de 20% da população humana, causando infecções de pele, pós-cirúrgicas, pneumonias, endocardites e bacteremias. Em sua superfície há proteínas que são covalentemente ancoradas ao peptidoglicano da parede celular e estas são fatores de virulência essenciais para a sobrevivência de *S. aureus* no estado comensal e durante infecções invasivas (FOSTER et al., 2014). A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* produz penicilinas, e como consequência disso houve o desenvolvimento de novas penicilinas resistentes às β -lactamases direcionadas à *S. aureus*, tais como oxacilina e meticilina que, em pouco tempo depois de sua introdução no tratamento contra infecções por *S. aureus*, mostrou-se ineficaz por causa do fenômeno de resistência, surgindo assim o termo *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) (DELEO, 2010).

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva organizada em fileira, sendo o principal agente de pneumonia bacteriana em crianças de até 5 anos, exceto no período neonatal, e estima-se uma incidência de 1,8 milhões de casos por ano (YOSHIOKA et al., 2011). O aumento de resistência verificado em isolados de *Streptococcus pneumoniae* frente a diferentes classes de antimicrobianos tem sido relatado em vários países (QUEIROZ et al.,

2012). A resistência à penicilina devido a alterações em proteínas de membrana neste microrganismo ainda é uma preocupação no tratamento da meningite. A natureza transformável de *S. pneumoniae*, em paralelo com o estresse causado pela pressão seletiva induzida pelo uso de antimicrobianos, tem contribuído para a evolução da resistência microbiana (CORNICK; BENTLEY, 2012).

Escherichia coli é uma bactéria Gram negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, compõe a microbiota humana e de outros vertebrados, porém muitas vezes pode estar associada a infecções do trato urinário, meninges e sepses (PINA et al., 2011; APOLINÁRIO, 2014; NASCIMENTO, 2014). Diversos fatores de virulência, compartilhado por outras espécies de *Escherichia*, são associados à patogenicidade oportunista das mesmas, como a capacidade de produzir bacteriocinas, fímbrias, adesinas, sideróforos e uma cápsula com ação antifagocítica (NASCIMENTO, 2014). É a mais frequente, dentre as Enterobactérias, encontrada, tanto em infecções hospitalares quanto as adquiridas na comunidade (VASCONCELOS et al., 2010). O mecanismo de resistência de *E. coli* para diminuir a concentração citoplasmática de drogas, como a tetraciclina, é o bombeamento ativo desta para o exterior da célula, pela ação de proteínas específicas. Dessa forma, as concentrações citoplasmáticas nas células bacterianas não são suficientes para produzir a inibição da síntese proteica ribossomal (BAPTISTA, 2013).

Esses fatos se tornam preocupantes, já que a *Escherichia coli* é o principal agente etiológico de infecções entéricas transmitidas por água e alimentos contaminados, principalmente em grupos populacionais que não dispõem de sistema de saneamento, ou se apresentam vulneráveis como os idosos, crianças ou imunocomprometidos (CARDOSO; MARIN, 2014; PASTORE, 2015).

A bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*, pertence à família das Enterobactérias, é imóvel, encapsulada e em forma de bastão, sendo encontrada em locais como água, solo, plantas e esgoto. Sua colonização em seres humanos provavelmente ocorre

por contato com as diversas fontes ambientais e pode ser encontrada colonizando a orofaringe e fezes de pessoas saudáveis, já no organismo de pessoas imunocomprometidas esta bactéria encontra um ambiente propício para seu crescimento, levando aos quadros de infecção (MOREIRA; FREIRE, 2014).

A *K. pneumoniae* KPC é produtora da enzima carbapenemase (KPC), uma β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que expressa resistência a até 95% dos antimicrobianos existentes no mercado farmacêutico, sendo uma das principais causas de falha terapêutica a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) por esta bactéria (MOREIRA; FREIRE, 2014). São capazes de produzir β -lactamases codificadas por cromossomo ou por plasmídeo e, portanto, com maior facilidade de se disseminar rapidamente para outras enterobactérias (SOUZA et al., 2015). Está relacionada à cerca de 2-5% do total de infecções hospitalares do trato urinário ou respiratório e no Brasil, sua prevalência de isolamento chega a 30-60% de pacientes internados (SCARPATE; COSSATIS, 2009; MEYER; PICOLLI, 2011). Sepses em pacientes neonatos por esse agente são difíceis de tratar porque a presença de cepas multirresistentes inviabiliza o tratamento com β -lactâmicos, como as cefalosporinas e monobactâmicos (MEYER; PICOLLI, 2011).

Isto demonstra que, provavelmente, a produção de biocidas naturais por microrganismos trata-se de estratégia de competição por nutrientes entre eles e de estratégia de sobrevivência contra ambientes inóspitos. Sendo assim, foi com a pressão de seleção causada pela secreção de agentes biocidas por alguns microrganismos ambientais que, em outros, como resposta, foi induzido o surgimento das estratégias de resistência aos agentes antimicrobianos, e também o surgimento de novos compostos com ação antibacteriana (ROCHA et al., 2010), demonstrando que a busca por esses compostos ainda tem como principal fonte o meio ambiente e seus nichos ecológicos.

2.2 Produtos Naturais como Fonte de Novos Antibióticos

Os produtos naturais constituem importantes alternativas para investigações científicas que possibilitem a descoberta de novos compostos bioativos para auxiliar em vários setores, como a indústria farmacêutica, alimentícia e agrícola (COSTA-LOTUFO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013; CHAPLA, 2013).

A Etnofarmacologia é alvo de inspiração para pesquisas químicas, farmacológicas e demais áreas envolvidas na aquisição de novas drogas. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS; BOLZANI, 2006).

Do total de medicamentos disponíveis na terapêutica atual, 29% foram desenvolvidos de fontes naturais (CHAPLA, et al., 2013), podendo ser citados alguns exemplos de plantas como fonte de medicamentos atualmente utilizados como a *Cinchona calisaya*, planta de onde foi extraído a quinina que foi modificada originando os antimaláricos atualmente utilizados, cloroquina e primaquina (AGOSTA, 1997; OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009), *Salix alba* de onde foi extraído o ácido salicílico que foi acetilado dando origem a um dos medicamentos mais utilizados atualmente, o ácido acetil-salicílico (SILVA; BARRETO, 2013) e mais recentemente o Taxol® (paclitaxel), um produto de origem natural, diterpeno com ação antineoplásica consagrado isolado pela primeira vez a partir do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), que em 1993, Stierle e colaboradores relataram a biossíntese de Taxol® por um fungo endófito isolado de *Taxus brevifolia* (HEINIG et al., 2013). Outro importante anticancerígeno é a vincristina isolada da planta *Catharanthus roseus*, também produzido pelo fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, isolado da mesma planta (CHAPLA, 2014).

Além de plantas, organismos marinhos têm apresentado metabólitos como produtos bioativos (BAERGA-ORTIZ, 2009; TULP, 2014). Os seres marinhos, incluindo algas,

plantas, animais e microrganismos, e seu ecossistema ainda são pouco conhecidos e explorados e, por isto, considerados como fontes promissoras de substâncias bioativas, com potencial biotecnológico (FREITAS et al., 2012; TULP, 2014).

Os agentes antimicrobianos são compostos com capacidade de destruir ou de inibir o crescimento de microrganismos patógenos, e a maioria desses agentes tem sua principal origem nos produtos naturais, principalmente de fontes microbianas, ou estes podem servir de modelo para a construção de agentes semi-sintéticos ou sintéticos (GUIMARÃES et al., 2010; AGUIAR, 2014).

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, no início do século XX, despertou o interesse científico sobre microrganismos produtores de substâncias bioativas, como os fungos (ROCHA et al., 2011; CHAPLA et al., 2012, GRAVIL et al., 2015). A demonstração de que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antimicrobianos, levando a prospecção em culturas de microrganismos, especialmente fungos e actinobactérias (TULP, 2014; GRAVIL et al., 2015). A partir de pesquisas elaboradas com esses seres, o avanço para a obtenção de drogas antimicrobianas, imunossupressoras, antitumorais foi promissor (TULP; BOHLIN, 2004; GUIMARÃES et al., 2010).

Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos têm sido produzidos por fungos. Estes são estimados em 1,5 milhões de espécies distribuídos principalmente entre fungos micoparasitas, coprófilos, de solo, de água doce, epifíticos e endofíticos (SILVA et al., 2010).

Um grupo de microrganismos que vem despertando interesse na pesquisa de novos antibióticos são os microrganismos endofíticos, que estão intimamente relacionados a seus hospedeiros, incluindo na produção de alguns metabólitos secundários.

2.3 Microrganismos Endofíticos

O termo “endófito” deriva do grego, que significa (*éndon* + *phytón*) “interior da planta” e abrange bactérias, fungo, vírus e algas que convivem em harmonia com seu hospedeiro (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Bary em 1866 notou que haviam certos microrganismos que não eram patogênicos para plantas, observando assim, a primeira distinção entre microrganismos endofíticos e patógenos (AZEVEDO et al., 2002). Mais tarde, por volta da década de 70, outros pesquisadores afirmavam que os endofíticos teriam pelo menos uma parte de seu ciclo vital em tecidos vegetais sem causar dano ao seu hospedeiro (CARROL, 1986; PETRINI et al., 1991).

O conceito foi então ampliado por Hallmann (1997), afirmando ser o microrganismo endofítico um ser que habita o tecido vegetal sem causar doença, diferenciando-se dos epifíticos, os quais estariam presentes à superfície vegetal.

O conceito mais elaborado sobre os endofíticos foi apresentado por Azevedo e colaboradores (2000), onde afirmaram que os endófitos são considerados microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro, cultiváveis ou não, e que não desenvolvam estruturas externas. Dessa forma, o conceito deixa de fora as bactérias ondulantes e os fungos micorrízicos, pois estes não são considerados endófitos (AZEVEDO et al., 2002; GUIMARÃES, 2005).

Os fungos endofíticos são encontrados em todos tecidos vegetais, mas principalmente nas partes aéreas da planta (MUSSI-DIAS et al., 2012). Desenvolvem estreita relação com o hospedeiro, produzindo vários efeitos benéficos como o aumento da resistência às condições de estresse, alterações fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos e enzimas (CHAPLA et al., 2013; FERRARA, 2013). As espécies vegetais podem ser colonizadas por

vários gêneros de endofíticos, mas pode haver predominância de pelo menos uma espécie. Essa predominância pode estar relacionada com fatores ambientais (MOREIRA, 2013).

Algumas pesquisas demonstraram que a porcentagem de isolados endofíticos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana pode ser, em determinados casos, superior a 30% (MUSSI-DIAS et al., 2012).

A ocorrência de transmissão às plantas dos fungos endofíticos podem ser por duas vias, transmissão vertical ou transmissão horizontal (ALY et al., 2011). Entende-se vertical, a transmissão que ocorre entre sementes do hospedeiro, enquanto que horizontalmente, ocorre com a penetração do fungo por orifícios naturais, como os estômatos, ou por aberturas em detrimento de atritos durante o crescimento das raízes, lesões, que possibilitam a inclusão nos tecidos ou diretamente pela parede celular utilizando-se de apressórios e haustórios (SAIKKONEM et al., 2004).

As potencialidades encontradas na associação entre fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras tem elevado o interesse científico por essa relação simbiótica. Entre estas destacam-se as de cunho ecológico, biológico e econômico (ASSUNÇÃO, 2010; OLIVEIRA, 2010; CHAPLA et al., 2012). Estes microrganismos têm sido estudados para o biocontrole de pragas, visando à aquisição de produtos mais saudáveis e a redução de agrotóxicos (TARGA et al., 2011); para promover a recuperação ambiental, por exemplo, na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos (SILVA; RONDON, 2013); reciclagem de resíduos agrícolas e industriais, como a biodegradação de materiais lignocelulósicos (FERRAZ, 2004); e os produtos oriundos do metabolismo primário e secundário de fungos endofíticos já tem comprovadas aplicações em diversas áreas (SANTOS et al., 2013).

Para a área da saúde, diversos trabalhos têm estudado estes fungos a fim de verificar suas potenciais atividades biológicas já tendo sido relatada atividade antimicrobiana, como a pestaloteol A e a tricofermina (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; WANG et al., 2012), a

vimblastina, antraquinonas e a hidroxicamptotecina, como antitumorais (SHWETA et al., 2010; MAFRA; RODRIGUES, 2011), a sordaricina, com atividade antifúngica (SPECIAN et al., 2014), compostos isolados de *Phomopsis* sp. apresentaram atividade antiprotozoária (CHAPLA, 2010), compostos antivirais como pestaloteol C e os ácido citotônico A e B (CHAGAS, 2013; SPECIAN et al., 2014), entre outras.

Essas e outras aplicações comprovam que há muito a ser estudado e descoberto sobre o mecanismo de interação entre o fungo endofítico e sua planta hospedeira e a influência dos fatores abióticos e bióticos do ambiente, principalmente nas regiões tropicais do planeta. A floresta Amazônica disponibiliza grande diversidade para ser estudada, o que beneficia novas pesquisas acerca de plantas nativas e seus fungos endofíticos como possíveis fontes produtoras de compostos bioativos, como ocorre com a espécie *Calycophyllum spruceanum*.

2.4 *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum

Calycophyllum spruceanum é uma espécie natural da região amazônica, conhecida no Brasil como pau-mulato, pau-mulato-de-várzea, escorrega-macaco e pau-marfim (RECORD; HESS, 1943; RIZZINI, 1971; GUITTON, 1991); e, no Peru, como capirona, capirona de bajo ou capirona negra (UGARTE-GUERRA, 2010). Trata-se de uma árvore com madeira densa ($0,78 \text{ g cm}^{-3}$), muito utilizada na produção de cabo para ferramentas, molduras, pisos e esquadrias. Isto porque esta madeira, com elevada flexibilidade e facilidade para secagem ao ar, possui resistência moderada à deterioração, além de apresentar características que a enquadram como de boa manipulação (serragem, aplainagem, faqueagem, desenrolagem, torneagem, colagem, parafusagem e pregagem), envernizagem, pintura e emassamento (GUITTON, 1991; LORENZI, 1998; UGARTE-GUERRA, 2010). Pela baixa exigência em fertilidade dos solos, *C. spruceanum* também costuma ser empregada em plantios de áreas

ciliares degradadas (LORENZI, 1998; MARANHO et al., 2013), sendo considerada uma boa alternativa para a recuperação deste tipo de área (MARANHO et al., 2013).



Figura 1. Árvore de *Calycophyllum spruceanum* (A). Detalhe do tronco retilíneo da espécie (B). Inflorescência de *Calycophyllum spruceanum* (C).

Fonte: Autor.

2.4.1 Caracterização da Espécie

A árvore de *Calycophyllum spruceanum* atinge 20-35 m de altura, com 0,7-1,8 m de diâmetro à altura do peito e 4-5 m de diâmetro na copa (RECORD; HESS, 1943; LORENZI, 1998). Apresenta como características morfológicas o troco retilíneo e esguio, ramificado apenas no ápice, com casca fina de coloração esverdeada quando nova, tornando-se marrom ou castanho-escura, conforme Figura 1. Este descasca anualmente em longas tiras, deixando exposta a camada interna avermelhada e sua textura lisa, com aparência de ter sido envernizada e se rebrota com facilidade. A árvore desta espécie apresenta ápice agudo ou obtuso, com base pouco atenuada (RECORD; HESS, 1943).

A planta é perenifólia e higrófito, com adaptabilidade a luminosidade ainda pouco esclarecida (não há consenso se a espécie é heliófita ou esciófita) (RECORD; HESS, 1943;

RIZZINI, 1971; LORENZI, 1998; UGARTE-GUERRA, 2010). As folhas são simples, opostas, glabras, subcoriáceas, oblongas ou ovado-oblongas, medindo 9-17 cm de comprimento e 6-7 cm de largura, pecioladas, peninérveas (RIZZINI, 1971; GUITTON, 1991; LORENZI, 1998). Apresenta inflorescência terminais cimosas, sendo as flores agrupadas em cimeiras triflorais envolvidas, quando em botão, numa bráctea foliácea, sendo aromáticas, branco-esverdeadas, medindo de 10-12 mm de comprimento e hermafroditas (RIZZINI, 1971; GUITTON, 1991; LORENZI, 1998). O fruto tem uma cápsula oblonga, deiscente de 8-10 mm de comprimento, pelos esparsos e duas valvas, com endosperma carnosos (RIZZINI, 1971; REVILLA, 2001).

Apresenta sementes aladas muito pequenas de cor parda escura e dispersas pelo vento com área de dispersão bastante ampla, ao longo de todo o rio Amazonas, principalmente em solos argilosos, férteis e inundáveis (RECORD; HESS, 1943; UGARTE-GUERRA, 2010). As sementes começam a germinar em 20-40 dias e o índice de germinação é baixo. As mudas ficam prontas para o plantio em local definitivo em 6-8 meses (MARANHO, 2013). O desenvolvimento das plantas no campo é moderado e apesar da grande disseminação de suas sementes pelo vento, há dificuldades de produção de mudas a partir destas porque seu crescimento é lento e desuniforme (GATTI, 2002). O período de florescimento é entre os meses de junho-julho e a frutificação ocorre nos meses de outubro-novembro (LORENZI, 1998; ALMEIDA, 2003).

Sob o aspecto qualitativo microscópico de seu xilema, foram possíveis relatar, em estudo pioneiro realizado por Baldin e colaboradores (2014), que as características morfológicas são compatíveis com as encontradas, em linhas gerais, para plantas da Família Rubiaceae, tais como anéis de crescimento distintos, vasos arredondados de paredes espessas, elementos vasculares médios, placas de perfuração simples, providos de apêndices em uma ou

ambas extremidades, ausência de parênquima axial, raios heterogêneos e de dois tamanhos distintos, e fibras libriformes septadas.

2.4.2 Ocorrência da Espécie

Calycophyllum spruceanum ocorre em toda a Região Amazônica, abrangendo o Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (RIZZINI, 1971, UGARTE-GUERRA, 2010). É especialmente difundida ao longo do rio Amazonas, onde é encontrada em agrupamentos quase homogêneos, chamados matas-de-pau-mulato no Brasil ou capironais no Peru (LORENZI, 1998; UGARTE-GUERRA, 2010).

O estabelecimento da espécie parece estar associado ao tipo de solo. Neste âmbito, a espécie tem preferência por solos argilosos e arenosos, com conteúdo orgânico de médio a alto, pH 7 e saturação de alumínio menor que 30% (REVILLA, 2001).

Em contrapartida, é certo que a ocorrência está, em grande parte, condicionada à dinâmica dos rios, sendo frequentemente encontrada em praias de várzeas e em clareiras de matas de solos argilosos (DUCKE; BLACK, 1954; LORENZI, 1998; ALMEIDA, 2003). No Brasil, a espécie está praticamente restrita à Região Amazônica, sendo bastante difundida no Alto Amazonas, ao longo do rio Amazonas e no Alto Envira/Tarauacá, no Estado do Acre (GUITTON, 1991; LORENZI, 1998; ALMEIDA, 2003).

2.4.3 Etnofarmacologia

Diferentes órgãos de *Calycophyllum spruceanum* são utilizados na medicina empírica. No Peru, o decocto e a infusão do córtex são empregados no tratamento de infecções da pele ou da mucosa oral (CARHUAPONA; ÂNGULO, 1999); pastas da casca são utilizadas no tratamento de infecções oculares e no tratamento tópico de celulite (REVILLA, 2001); e o

decocto da casca da árvore, no tratamento da “sarna negra”, doença causada pelo ácaro *Demodex canis*, que vive sob a pele de cães (SHULTES; RAFFAUF, 1990). No Paraguai, é utilizada para tratar diabetes; e, na Colômbia, no controle de parasitas e doenças da pele (REVILLA, 2001). No Brasil, a casca é utilizada na forma de chá como forma de controlar manchas de pele e na prevenção ao envelhecimento (CAETANO et al., 2014).

De maneira geral, a casca de *C. spruceanum* é usada na forma de cataplasma, no tratamento de inflamações e de infecções fúngicas. Esta estrutura também é utilizada no preparo de emplastos capazes de curar cortes, feridas e queimaduras. Do córtex é feita a infusão, usada em infecções oculares, diabetes e males do ovário, sendo também utilizado no controle de doenças gástricas e uterinas (ALMEIDA, 2003). Além disto, em um levantamento sobre o uso de plantas medicinais em comunidades de várzea dos rios Solimões e Amazonas, *C. spruceanum* foi citado como planta utilizada no tratamento de distúrbios do aparelho geniturinário, de inflamações, de colesterol alto e de problemas de tireoide, sendo a casca usada para fazer decocto ou para banhos de imersão (CASSINO, 2010). Na cosmetologia, é utilizado na preparação de xampu no controle da queda de cabelo, bem como no preparo de cremes e hidratantes curativos de rugas, manchas de pele e cicatrizes (REVILLA, 2001; ARAÚJO et al., 2007; LINO et al., 2009; MORAIS et al., 2009).

2.4.4 Metabólitos

Os metabólitos produzidos por *Calycophyllum spruceanum* são pouco estudados. Contudo, taninos e fenóis são bem relatados. Estes metabólitos parecem ser os responsáveis pelo desempenho da planta no retardo do envelhecimento celular e na fotoproteção por ações antioxidantes (ARAÚJO et al., 2007; LINO et al., 2009). Aos taninos também é creditada a produção de ácido gálico, de cor marrom, que é empregado na indústria de tecido e couro (EMERY et al., 2010).

A época de colheita (estiagem ou chuvoso) da casca (epiderme e/ou periderme) está diretamente relacionada à quantidade de taninos e polifenóis produzido (COSTA et al., 2011). Do mesmo modo, o teor de cinza e o extrato apresentam diferenças quanto à época de colheita. Costa et al. (2011) demonstraram que o rendimento de cinzas na estiagem é 40,52% maior que no período chuvoso.

Extratos aquosos de *C. spruceanum* foram estudados quanto ao método de preparo da solução de extração (decocto ou infusão – fator A), o tempo de extração (5 ou 15 minutos – fator B) e a relação droga/solvente (fator C), a fim de estabelecer o teor de tanino total e o resíduo seco. Os resultados demonstraram que o método de extração, correspondente a interação do fator A e C, obteve maior teor de tanino (9,9g%) e resíduo seco (0,88g%), sendo que há a possibilidade de outras substâncias ativas de interesse terem sido negligenciadas por limitações técnicas (COSTA et al., 2011), deflagrando a necessidade de mais estudos sobre métodos para a extração de metabólitos da espécie.

Zuleta et al. (2003) descreveram três novos secoiridóides presentes nos extratos etanólicos da casca de *Calycophyllum spruceanum* (7-metoxididerrosideo, 6'-acetil- β -D-glucopiranosildiderrosideo e 8-0-tigloildiderrosideo), conforme Figura 2. Além destes, os autores relataram a ocorrência de outros iridóides previamente relacionados à espécie (loganetina, loganina, secoxiloganina e diderrosideo). Esses compostos poderão contribuir, por exemplo, na quimiotaxonomia de *C. spruceanum*, por meio do estabelecimento de limites entre os diversos gêneros encontrados na família Rubiaceae, considerada extremamente complexa.

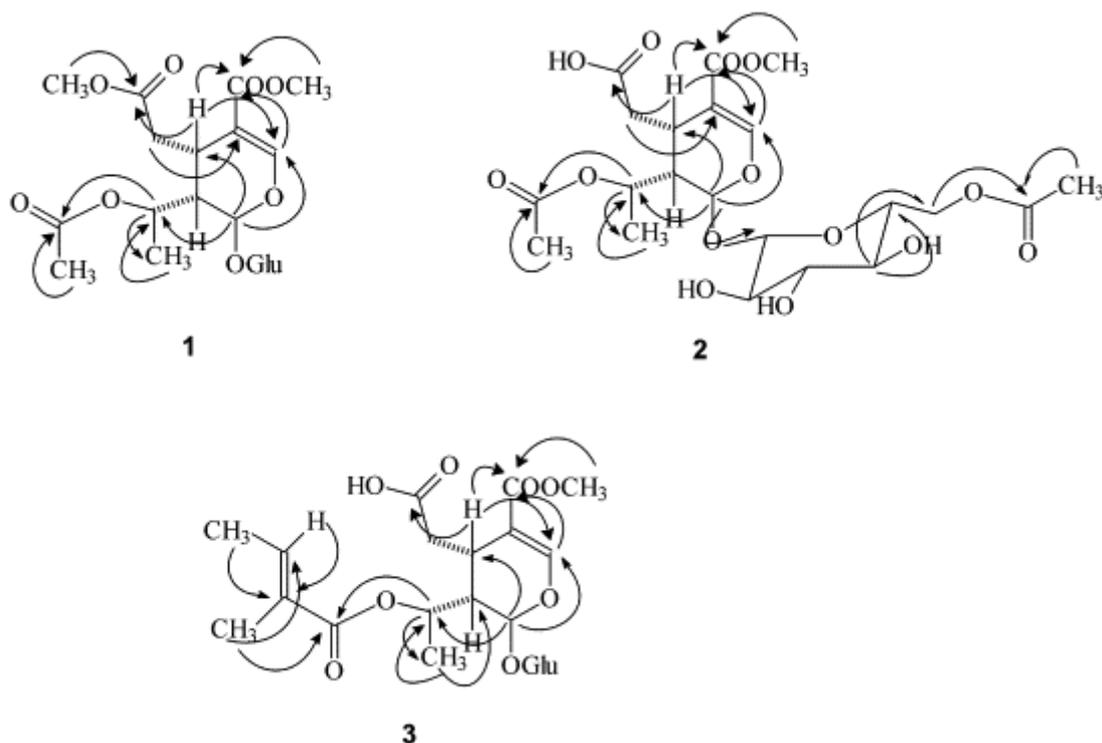


Figura 2. Secoiridóides presentes nos extratos etanólicos da casca de *Calycophyllum spruceanum* (1: 7-metoxididerrosideo; 2: 6'-acetil-β-D-glucopiranosildiderrosideo; e 3: 8-O-tigloildiderrosideo). Setas indicam correlações em Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) entre moléculas de carbono e H-8 em $\delta = 5,09$.

Fonte: Zuleta et al. (2003). Uso da figura autorizada pelos autores.

2.4.5 Atividades biológicas

Como mencionado anteriormente, *Calycophyllum spruceanum* possui metabólitos eficazes na proteção contra raios ultravioleta (UV), funcionando como rejuvenescedor. Lino et al. (2009) comprovaram as atividades antioxidantes e fotoprotetores dessa planta por meio de estudo com extratos aquosos e etanólicos das cascas.

Analisando a atividade contra formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* in vitro, Zuleta et al. (2003) observaram que os secoiridóides secoxiloganino e diderrosideo isolados do extrato etanólico da casca de *C. spruceanum* possuem atividade antitripanosoma. Outras

espécies vegetais também apresentaram atividade biológica relacionada à secoiridóides. Portanto, a descoberta desses compostos também em *C. spruceanum* abre oportunidades para outros testes de atividade biológica de sucesso.

O número escasso de trabalhos acerca de aspectos químicos e farmacológicos do *C. spruceanum* justifica a necessidade de ampliar o conhecimento dessa espécie. Quando se busca estudos sobre os microrganismos, mais especificamente, fungos endofíticos presentes nessa espécie vegetal, este trabalho torna-se pioneiro, justificando também a necessidade de estudos que relacionem a produção de metabólitos secundários de seus endófitos como fontes de produtos bioativos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliação da diversidade e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*.

3.2 Específicos

3.2.1 Analisar a diversidade de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*;

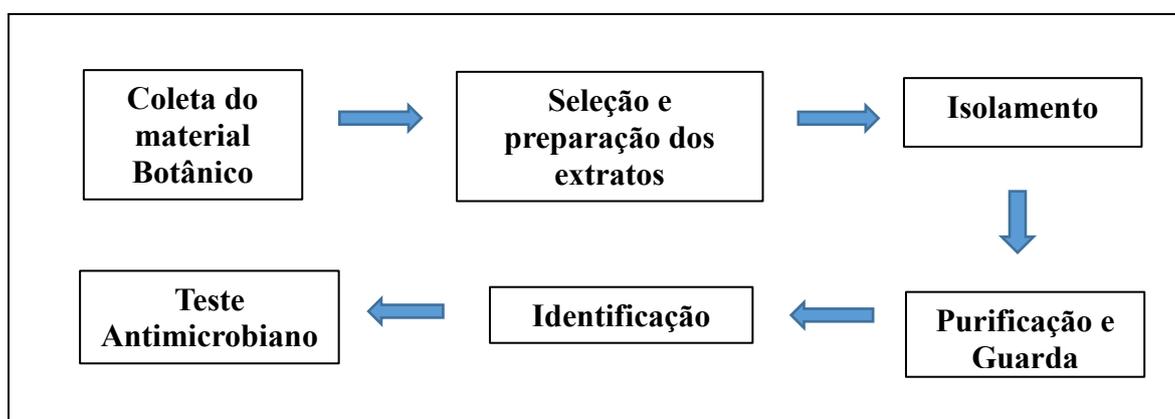
3.2.2 Avaliar a atividade antibacteriana de metabólitos de fungos endofíticos de *C. spruceanum* frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de Atividades

Para o desenvolvimento do trabalho, foram seguidas as seguintes etapas, de acordo com o fluxograma apresentado no Quadro 1.

Figura 3. Fluxo de atividades de isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*.



4.2 Coleta de Material Botânico

Foram coletadas amostras caulinares e foliares de três indivíduos da espécie *Calycophyllum spruceanum* do Campus de Pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA-AC, localizado no município de Rio Branco à Rodovia BR-364, Km 14, Ramal da EMBRAPA s/n, em três diferentes períodos, de acordo com o Quadro 2. Para a coleta da primeira amostra, foi realizada a derrubada da árvore, que pertencia ao campo de desbaste experimental da Embrapa. Em seguida, foram cortados galhos com folhas que aparentavam estar saudáveis. Para as coletas posteriores das duas árvores nativas, foi utilizado o podão e a realizadas as mesmas vistorias quanto ao estado de caules e folhas.

Quadro 2. Informações dos indivíduos coletados de *Calycophyllum spruceanum*.

Indivíduo	Local da coleta (Sistemas de Coordenadas UTM)	Características da planta	Data da coleta
I	Zona de plantio controlado de <i>C. spruceanum</i> (área de desbaste: Zona 19L Leste-Oeste: 643298, 875; Norte-Sul: 8891427,660)	Planta jovem, de pequeno porte, com idade de 6-7 anos; presença de frutos e sementes.	Outubro/2014
II	Proximidades do Estacionamento do Centro de Atendimento ao Cidadão do Campus EMBRAPA-AC: Zona 19L Leste-Oeste: 641954,2; Norte-Sul: 8891640	Planta nativa de médio porte, sem sementes ou floração.	Fevereiro/2015
III	Estacionamento do Centro de Atendimento ao Cidadão do Campus EMBRAPA-AC: Zona 19L Leste-Oeste: 641954,8; Norte-Sul: 8891595	Planta nativa de grande porte, em plena floração.	Abril/2015

Foram confeccionadas exsicatas que foram depositadas no herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre – UFAC, sob o número 22.000.

A execução do projeto de pesquisa foi dividida nas seguintes etapas: coleta do material botânico; isolamento e guarda de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* provenientes dos fragmentos foliares e caulinares; identificação dos fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*; teste de atividade antibacteriana dos metabólitos secundários de fungos endofíticos *Calycophyllum spruceanum*.

4.3 Isolamento e Guarda de Fungos Endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta, tendo sido selecionadas amostras que aparentemente estavam livres de sinais de doença, como a ausência de manchas, descolorações, fragmentações, presença de fungos. Uma vez selecionados, foi realizada a lavagem utilizando sabão neutro, água corrente e esponja macia para eliminação do excesso de epifíticos, e posteriormente, foram separadas amostras para o preparo de meios de cultura contendo o extrato do tecido vegetal estudado, caule ou folha, e amostras para isolamento de fungos endofíticos que foram submetidas ao processo de desinfecção superficial, sendo submetidos ao tratamento com os agentes químicos de controle de microrganismos: álcool 70 % por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% por 2 minutos, álcool 70% por 30 segundos e água destilada esterilizada por duas vezes em capela de fluxo laminar, conforme protocolo estabelecido por Pereira et al. (1993) (Figura 3).

Após assepsia, foram obtidos um total de 80 fragmentos, tanto de caule quanto de folhas, medindo aproximadamente 5 mm de diâmetro que foram inoculados nos meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar-BDA (infusão de 200g de batatas; 15g de ágar; 20g de dextrose e água destilada em quantidade suficiente para preparar 1000 mL), Sabouraud-Dextrose-Ágar-SAB (10g de peptona, 40g de dextrose, 15g de ágar em quantidade suficiente para preparar 1000 mL), com e sem extrato do tecido vegetal estudado a 10%. O extrato dos tecidos vegetais foi confeccionado utilizando-se 100 g de folhas ou fragmentos de caule triturado em 500 mL de água destilada e filtrado em papel de filtro. A este foi adicionado 500 mL de infusão de 200g de batata para preparação do meio BDA ou 500 mL de água destilada para a preparação do meio SAB e nestes foram solubilizados os reagentes. Todos os meios foram acrescidos de cloranfenicol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para inibir o crescimento bacteriano.



Figura 3. Isolamento de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*. A) coleta das partes vegetais; B) Desinfecção do material vegetal selecionado; C) Fragmentação do material vegetal; D) Inoculação dos fragmentos no meio de cultura.

Foram inoculados 5 fragmentos por placa de Petri, sendo utilizada duas placas para cada meio de cultivo. As placas inoculadas foram incubadas em duas temperaturas distintas, 18 °C e 28 °C, e observadas diariamente por até 30 dias. Todos os fungos emergentes desses fragmentos receberam um número de registro e foram purificados em meio de cultivo BDA com cloranfenicol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando a técnica de estriamento por esgotamento, e posteriormente, uma colônia pura foi inoculada em tubo de ensaio contendo meio de cultivo BDA pelo método de repique para tubo inclinado (Figura 4).

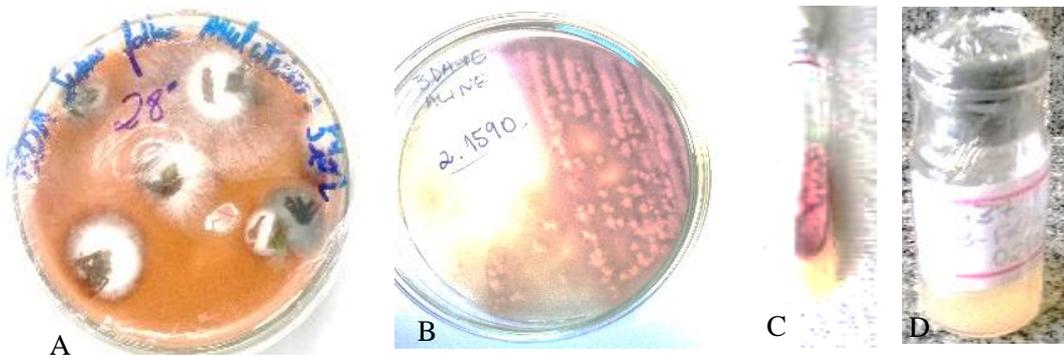


Figura 4. Purificação de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*. A) Emergência dos endofíticos; B) Purificação pela técnica de estriamento por esgotamento; C) Transferência para tubo com meio BDA; D) Guarda em água e óleo mineral.

Após o crescimento dos fungos endofíticos de *C. spruceanum* nos tubos de ensaio contendo BDA, estes foram agrupados em táxons ou morfotipos conforme suas semelhanças macromorfológicas. De cada táxon, foi realizada a guarda de até três indivíduos em óleo, que

consiste na conservação dos fungos endofíticos isolados utilizando-se a técnica em óleo mineral, baseada na inoculação do fungo em meio sólido e posterior cobertura com óleo mineral (ARAÚJO et al., 2010) e em água pelo método de Castellani, pela transferência do fungo para frascos contendo água destilada esterilizada e mantidos em temperatura ambiente para viabilidade por maior período (SOLA, 2012).

4.4 Identificação dos Fungos Endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*

Para a identificação e avaliação de atividade antibacteriana foi utilizado um fungo representante de cada táxon. Para identificação foi feito o microcultivo e observados os aspectos macro e micromorfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas. Para análise macromorfológica, foram observadas características como cor, textura e produção de pigmentos, conforme Figura 5. A avaliação micromorfológica dos endofíticos foi realizada com a técnica do microcultivo em lâmina utilizando os meios de cultivo BDA e de aveia que foi incubado por sete dias a temperatura ambiente. Decorrido este período, foi preparado lâminas utilizando o corante lactofenol azul de algodão, e aqueles que produziram estruturas reprodutivas foram comparados com literatura específica (BARNETT; HUNTER, 1972).

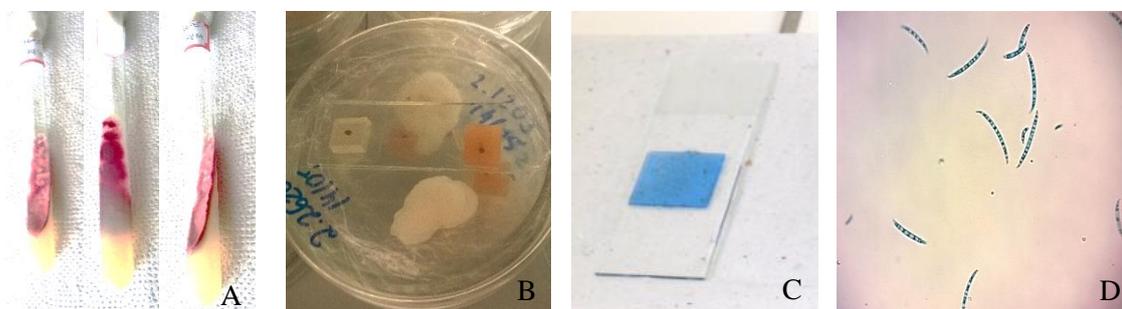


Figura 5. Identificação dos fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*. A) Análise macromorfológica da colônia fúngica; B) Cultivo em lâmina de fungo endofítico; C) lâmina corada com lactofenol para leitura em microscópio óptico; D) visualização das estruturas reprodutivas.

4.4 Avaliação de Atividade Antibacteriana

Um fungo representante de cada táxon foi inoculado em meio de cultivo BDA e incubados a 28 °C por 14 dias, de onde foram retirados 10 fragmentos medindo aproximadamente 5 mm² para fermentação em 20 mL de caldo Batata-dextrose BD (infusão de 200g de batata, 20g de dextrose, água em quantidade suficiente para 1000 mL), incubados a 28 °C, sem agitação por 14 dias. Após este período, foram retirados 2 mL de meio contendo os metabólitos fúngicos, acondicionados em microtubos e armazenados à -20°C (Figura 6).

Posteriormente, os metabólitos fúngicos foram descongelados à temperatura ambiente e extraído por partição líquido-líquido com 1 mL de acetato de etila por duas vezes e agitados em vórtex. A fase orgânica foi coletada e seca a 37 °C por 24 horas. Após a completa evaporação do acetato de etila, foram adicionados 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (VITOLLO, 2015).

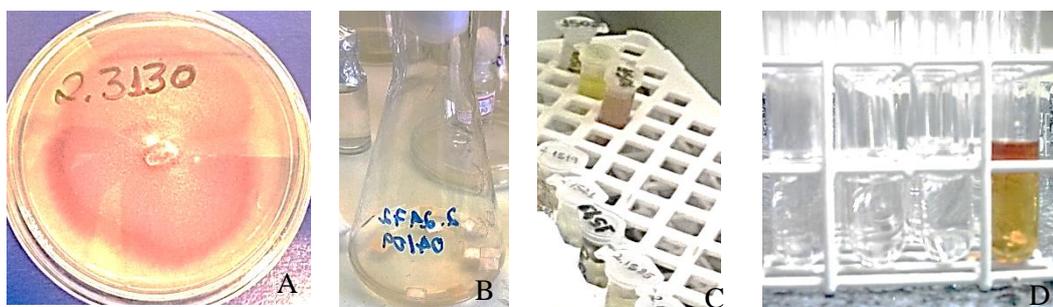


Figura 6. Produção de caldo metabólito fúngico. A) Repique de um ponto; B) Fermentação no erlenmeyer; C) Coleta de caldo metabólico; D) Partição líquido-líquido dos metabólitos com acetato de etila.

Os metabólitos fúngicos obtidos foram submetidas aos testes de difusão em disco, como preconizado em NCCLS (2003). As bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella*

pneumoniae (ATCC 700603) foram inoculadas em meio de cultivo Luria Bertani (LB) e incubadas de 4-6 horas a 37 ° C, sendo a turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. As bactérias então foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Müller-Hinton, depositados sobre estas discos de papel e 20 µL dos extratos fúngicos e armazenados em geladeira por uma hora para melhor difusão do metabólito no papel, e então incubados a 37 ° C por 24 horas. Posteriormente ao processo de incubação, foram avaliados os halos de inibição de crescimento bacteriano, quando houveram, sendo considerados com atividade antibacteriana, os extratos de fungos endofíticos que não permitiram o crescimento bacteriano ao redor do disco com halo sendo este medido em milímetros (Figura 7).

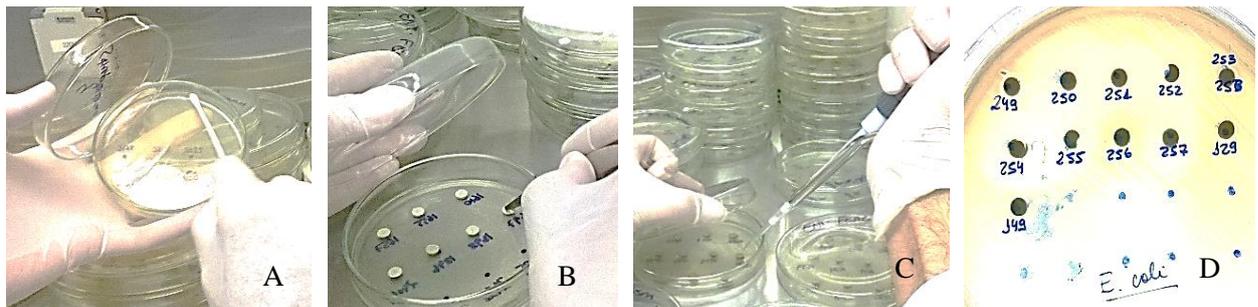


Figura 7. Bioensaio antibacteriano. A) Inoculação das bactérias patogênicas em meio Müller-Hinton; B) Aplicação dos discos de papel; C) Inoculação dos extratos fúngicos nos discos; D) Observação de halos de inibição após incubação.

4.5 Diversidade da Comunidade Endofítica: Cálculos dos Índices de Infecção, Diversidade, Riqueza e Dominância de *Calycophyllum spruceanum*

O índice de infecção (IF) foi calculado a partir da relação entre o número de fragmentos que tiveram emergência de fungos endofíticos pelo número total de fragmentos utilizados no experimento.

$$IF = \frac{\text{Nº de fragmentos com fungos emergentes}}{\text{Nº total de fragmentos}} \times 100$$

Para a análise da diversidade da comunidade endofítica de *Calycophyllum spruceanum* foram calculados o número de espécies dominantes, o Índice de Simpson e o Índice de Shannon.

Número de espécies dominantes determinada se uma espécie é considerada dominante quando apresenta frequência superior a $1/S$, onde S é o número total de espécies na comunidade.

Índice de Simpson é um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Varia de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade (URAMOTO et al., 2005; MELO, 2008).

$$D = \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

onde:

S = número de espécies;

N = total de táxons presentes;

n = número de exemplares por espécie

Índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice. É calculado por meio da fórmula

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Onde:

p_i : frequência de cada espécie, para i variando de 1 a S (Riqueza). URAMOTO et al., 2005; MOREIRA, 2014).

Frequência é a proporção de indivíduos de uma espécie em relação ao total de indivíduos da amostra:

$$P_i = \frac{n_i}{N}$$

Onde:

n_i : número de indivíduos da espécie i

N : total de indivíduos da amostra.

Índice de Evenness refere-se ao quão similar as espécies estão representadas na comunidade (equabilidade ou uniformidade). Caso todas espécies tenham a mesma representatividade (ou importância), a equabilidade será máxima (MELO, 2008).

Todos os índices foram calculados utilizando-se o programa Past download que se encontra disponível gratuitamente na internet.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da Comunidade de Fungos Endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*

Foram isolados um total de 650 fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* e o índice de infecção para os indivíduos envolvidos no estudo está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Índice de infecção de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* de caules e folhas.

Indivíduo	Tipos de tecido vegetal				Frequência total (%)
	Folha		Caule		
	Emergência em Fragmentos	Frequência (%)	Emergência em Fragmentos	Frequência (%)	
I	60	75	74	92,5	83,75
II	80	100	75	93	96,87
III	80	100	73	91	95,62

O baixo IF do primeiro indivíduo pode estar associado à oxidação das folhas durante o processo de desinfecção, quando submergidas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 3 minutos, por este motivo, nos outros dois indivíduos o tempo de imersão no hipoclorito de sódio foi diminuído para 2 minutos, havendo aumento no índice de infecção destes. Este evento também foi observado durante o experimento de Souza et al. (2004) em folhas de *Palicourea longiflora*.

A obtenção de endofíticos dos fragmentos de caule foi maior (328 fungos) que os emergidos de folhas (322 fungos). Isso pode ter ocorrido devido às perdas de fragmentos foliares do primeiro indivíduo por oxidação, sendo isolados maior quantidade de fungos de caule, contrariando diversos estudos que citam a folha como detentora de maior população

endofítica, por ser esta uma das portas mais favoráveis a infecções (SILVA et al., 2006; OLIVEIRA, 2010; MOREIRA, 2013).

Os fungos emergentes de fragmentos vegetais de *C. spruceanum* cresceram em diferentes meios de cultura e temperaturas. Optou-se por essa técnica porque alguns microrganismos podem ter diferenças nutricionais, onde alguns fungos podem crescer com poucos nutrientes inorgânicos como sua única exigência nutricional, enquanto outros se assemelham aos organismos superiores na sua necessidade de nutrientes orgânicos complexos (CHAPLA, 2010).

O isolamento de fungos endofíticos de *C. spruceanum* demonstrou uma distribuição aleatória da quantidade de endófitos na espécie vegetal.

A Tabela 2 traz a distribuição dos 650 fungos endofíticos isolados de acordo com o tecido vegetal, meio de cultura e temperatura de isolamento. A parte vegetal com maior quantidade de isolados foi de caule, sob a temperatura de 28 °C em meio BDA sem extrato, porém a melhor condição para a expressão da diversidade de endófitos foi em folha incubada à temperatura de 18 °C em meio BDA com extrato.

A temperatura que obteve maior quantidade de fungos isolados foi 18 °C em ambos os tecidos estudados, com 343 isolados (52,77%), enquanto que a temperatura de 28 °C apresentou 307 fungos (47,23%) no total. Em meio BDA para isolamento de caule a 18 °C se concentrou o maior número de endófitos isolados, entretanto foram observados 20 táxons e apenas 04 fungos foram identificados em nível de gênero. Em folhas foram onde se obteve o maior número de fungos identificados e que também apresentou maior diversidade, destacando-se os fragmentos inoculados em meio BDA com extrato que apresentou 08 dos 15 gêneros identificados em *C. spruceanum*.

Tabela 2. Fungos endofíticos isolados de *Calycophyllum spruceanum* de acordo com o tecido vegetal, meio de cultura e temperatura de isolamento.

Parte Vegetal	Temperatura	Meio de Cultivo			
		BDA	BDA + extrato	SAB	SAB + extrato
Folha	18 °C	44 Isolados 23 Táxons: 9 M.S. 5 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 5 <i>Phomopsis</i> sp.	44 Isolados 24 Táxons: 8 M.S. 1 <i>Aspergillus</i> sp. 1 <i>Beauveria</i> sp. 1 <i>Cladosporium</i> sp. 5 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 2 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp.	45 Isolados 27 Táxons: 6 M.S. 3 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 2 <i>Guignardia</i> sp. 2 <i>Penicillium</i> sp. 11 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp.	35 Isolados 20 Táxons: 6 M.S. 1 <i>Beauveria</i> sp. 2 <i>Cladosporium</i> sp. 4 <i>Colletotrichum</i> sp. 2 <i>Guignardia</i> sp. 3 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Pyricularia</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp.
	28 °C	48 Isolados 22 Táxons: 7 M.S. 1 <i>Beauveria</i> sp. 2 <i>Colletotrichum</i> sp. 3 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 7 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp.	28 Isolados 15 Táxons: 8 M.S. 9 <i>Colletotrichum</i> sp. 2 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Epicoccum</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 2 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Trichoderma</i> sp.	41 Isolados 28 Táxons: 9 M.S. 2 <i>Beauveria</i> sp. 2 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Cladosporium</i> sp. 5 <i>Colletotrichum</i> sp. 3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 6 <i>Phomopsis</i> sp.	37 Isolados 25 Táxons: 5 M.S. 5 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 2 <i>Guignardia</i> sp. 8 <i>Phomopsis</i> sp.
Caulo	18 °C	51 Isolados 20 Táxons: 8 M.S. 2 <i>Fusarium</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 7 <i>Phomopsis</i> sp. 4 <i>Xylaria</i> sp.	46 Isolados 17 Táxons: 8 M.S. 1 <i>Aspergillus</i> sp. 1 <i>Cladosporium</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 2 <i>Phomopsis</i> sp. 2 <i>Xylaria</i> sp.	40 Isolados 11 Táxons: 7 M.S. 1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp.	38 Isolados 15 Táxons: 5 M.S. 1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Pyricularia</i> sp. 3 <i>Xylaria</i> sp.
	28 °C	33 Isolados 14 Táxons: 8 M.S. 1 <i>Aspergillus</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp.	44 Isolados 22 Táxons: 8 M.S. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 9 <i>Phomopsis</i> sp. 4 <i>Xylaria</i> sp.	33 Isolados 15 Táxons: 7 M.S. 1 <i>Acremonium</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 5 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Trichoderma</i> sp.	43 Isolados 17 Táxons: 5 M.S. 1 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 5 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp.
Total		176	162	159	153

M.S. = *Mycelia sterilia*;

Isolados = total de fungos isolados do tecido vegetal sob determinada temperatura e meio de cultura;

Táxons = agrupamento de fungos endofíticos com morfosemelhanças macro e microscópicas.

As diferentes colônias de fungos obtidos nos diferentes tecidos vegetais foram agrupadas em 243 táxons após a análise de suas características macromorfológicas, distribuídos ao longo de 15 gêneros e um grupo que recebeu a denominação de "*mycelia sterilia*" por não ter produzido estrutura reprodutiva em lâmina de microcultivo. A Figura 8 apresenta os gêneros de fungos endofíticos identificados e sua frequência em *Calycophyllum spruceanum*.

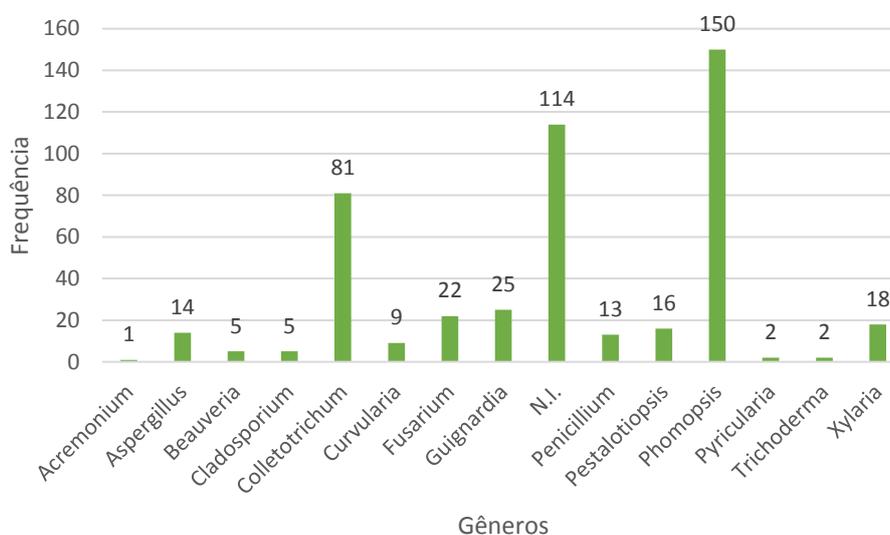


Figura 8. Frequência de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* identificados, até o nível de gênero, de acordo com as características macro e micromorfológicas. N.I = *mycelia sterilia*.

Estudos para a identificação taxonômica que aliam mais de uma técnica para identificar os endofíticos, como os métodos de biologia molecular conseguiram melhor desempenho para elucidar as espécies emergentes. São úteis para a distinção de morfoespécies e de gêneros detentores de espécies complexas, tais como os *Cladosporium* sp. (BEZZERA, 2013) ou mesmo identificar os casos de *mycelia sterilia* em culturas (SURYANARAYANAN, 2011). Nascimento (2010), além das características morfológicas (macro e micro) também utilizou características fisiológicas para a identificação e teve êxito

na maioria dos fungos isolados até o nível de espécie. Usou outras técnicas na tentativa de identificar fungos *mycelia sterilia*, mas sem sucesso.

Foram isoladas 164 leveduras de *Calycophyllum spruceanum*, entretanto, nesse estudo estas tiveram apenas caráter quantitativo, pois não foram incluídas nas fases de identificação e atividade antimicrobiana. Tal achado foi distinto do observado por Moreira e colaboradores (2013), que não obtiveram nenhuma levedura endofítica em suas pesquisas com *Araucaria angustifolia* e contrariando a afirmativa de Wang et al. (2007) de que leveduras podem constituir um grupo escasso dentro da comunidade de microrganismos endofíticos de folhas e caules. Esta diferença pode ser justificada pela composição microbiana endofítica ser influenciada pela espécie vegetal, distribuição geográfica, idade da planta, precipitação anual, presença de diferentes tipos e quantidades de nutrientes, umidade, entre outros fatores (SILVA et al., 2006; MOREIRA, 2013).

Foram perdidos 173 fungos filamentosos devido a contaminação ou quebra dos tubos de ensaio. Dos 477 fungos filamentosos restantes, 23,9% (114 fungos) não produziram estrutura reprodutiva não podendo assim ser identificado, sendo classificado como *mycelia sterilia*. Segundo Bezerra (2013), em seu estudo com *Cereus jamacaru*, nativa de áreas tropicais secas, plantas dessas áreas abrigam uma diversidade de fungos que não esporulam em cultura. O número obtido na pesquisa com *C. spruceanum* ficou bastante próximo ao que Bezerra (2013) que obteve 30,3% de fungos micelia sterilia ao estudar os endófitos de *Cereus jamacaru* e próximo de Bezerra (2012), também com *Cereus jamacaru* que foi de 22,72%, apesar de *C. spruceanum* ser nativo de área tropical úmida. A presença de um grande número de isolados endofíticos com nenhuma ou reduzida capacidade de produzir estruturas reprodutivas *in vitro* dificulta a sua identificação.

As espécies de fungos endofíticos mais frequentemente isoladas nos trópicos pertencem ao filo Ascomycota, incluindo os anamorfos (FERNANDES, 2008). Os fungos desse filo podem ser isolados de todos os órgãos vegetais de praticamente todas as plantas terrestres, são transmitidos horizontalmente e são cosmopolitas, ocorrendo em ambientes temperados e tropicais. Espécies de Basidiomycota e Zygomycota também são isoladas

como endofíticos, mas representam um menor número (NASCIMENTO, 2010; BEZERRA, 2013). Em *C. spruceanum* foi observado achados semelhantes, sendo os 15 gêneros identificados pertencentes ao filo Ascomycota, corroborando com os autores supracitados.

Em plantas brasileiras, espécies de *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Xylaria* são as mais frequentes. Ainda há o grupo de fungos não esporulantes ou *mycelia sterilia*, comumente relatados em trabalhos envolvendo fungos endofíticos (NASCIMENTO, 2010).

A preferência de uma espécie endofítica por um determinado órgão da planta hospedeira pode dever-se à composição química desse tecido. De fato, os diferentes tecidos e órgãos, da planta hospedeira podem constituir micro-habitat distintos, permitindo o desenvolvimento de uma determinada espécie fúngica endofítica (MALHADAS, 2014).

Assim, de acordo com sua distribuição nos tecidos vegetais, os fungos endofíticos podem ser classificados em generalistas, quando encontrados em todos os tecidos analisados, ou especialistas, tendo especificidade por um dos tecidos (CHAPLA, 2014; MOREIRA, 2013). Em *C. spruceanum* foram observados como generalistas os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pyricularia*, *Trichoderma* e *Xylaria*, pois foram isolados tanto em folha como em caule. Como especialistas foram observados *Beauveria*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Epicoccum* em folhas, e *Acremonium* em caules.

O gênero *Phomopsis* sp. foi isolado em ambas amostras estudadas, caulinares e foliares, todos os meios e em ambas as temperaturas com 150 isolados, representando 31,5% do total de fungos isolados, comportando-se como generalista e dominante em *C. spruceanum*. Chapla, (2010), em sua pesquisa sobre o gênero *Phomopsis* utilizou 07 meios de cultura diferentes (MDB, Czapek, EM, Nutrient, YM, Milho e Arroz) e concluiu que, de modo geral, *Phomopsis* sp. desenvolveu-se rapidamente nos diferentes meios de cultura, demonstrando fácil adaptação, franco desenvolvimento e foi possível observar uma variação na produção metabólica, por exemplo, no trabalho de Silva e colaboradores (2006) que isolaram cinco sesquiterpenos (cadinenos) com ação antimicrobiana do fungo endofítico

Phomopsis cassiae da planta *Cassia spectabilis*. Em seu estudo com o endófito *Phomopsis* sp. da planta *Senna spectabilis*, Chapla (2010), obteve uma variação metabólica exuberante em seus metabólitos: uracila, ácido nitropropanóico, tirosol, citocalasinas e alternariol. Zanardi e colaboradores (2012), também isolaram sesquiterpenos inéditos produzidos por *Phomopsis* sp. também de *Cassia spectabilis* com ações antifúngica e anticolinérgica.

O gênero *Colletotrichum* sp. alcançou 81 fungos (17%) do total isolado. Foi o segundo mais comum, tendo sido isolado unanimemente de folha em todos os meios de cultura e temperaturas. Os fungos do gênero *Colletotrichum* sp. podem desenvolver diversos modos de vida, podendo atuar como fungos endofíticos, epifíticos, patógenos de plantas e eventualmente como patógenos humanos (RUFINO, 2011). Dentre eles, Campos et al., (2009) destacam a ação protetora da espécie avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum* contra a antracnose do feijoeiro promovendo a indução de resistência (CAMPOS et al., 2009). Isolados de *Colletotrichum* sp. mostram a capacidade de produzir as enzimas aminolíticas, principalmente as glicoamilase e β -amilase com características favoráveis à aplicação industrial (GARCIA, 2013).

O gênero *Guignardia* sp., pertence à família Botryosphaeriaceae, tem membros descritos como endófitos. Esses ascomicetos foram observados como saprófitas sobre o tecido morto de plantas lenhosas, posteriormente esse gênero na sua forma anamorfa foi descrito como patógeno, principalmente em viveiros, plantios agrícolas e florestas. (CHAPLA, 2014).

A espécie fitopatogênica, *Guignardia citricarpa*, é conhecida por causar podridão da videira e da doença “mancha ou pinta negra”. Essa doença acarreta perdas econômicas na agricultura de citros (FAGANELLO, 2013). A existência de uma espécie endofítica, *Guignardia mangiferae*, morfológicamente muito semelhante à espécie patogênica, dificulta o diagnóstico diferencial por características morfológicas. Deve-se salientar que neste trabalho, o tecido analisado estava aparentemente saldável, não apresentando sinais de enfermidade ou ação de insetos.

Em *C. spruceanum*, o gênero *Guignardia* sp. teve 5,25% do total de fungos isolados (25 fungos) e mostrou-se celetista às folhas, estando presente apenas nessa parte vegetal, entre

as amostras em estudo, mas em todos os meios de cultura e em ambas as temperaturas. *Guignardia bidwellii* foi o fungo endofítico de *Schinus terebinthifolius* mais isolado nos estudos de Santos (2013) e teve atividade antifúngica leveduras e dermatófitos de interesse médico comprovadas. Almeida (2015) comprovou a produção de L-Asparaginase, em meio líquido no fungo endofítico *Guignardia mangiferae*, isolado de *Eugenia dysenterica*. Guimarães e colaboradores (2009), demonstraram que os metabólitos produzidos por *Guignardia mangiferae* isolado de *Cladocolea micrantha* (Loranthaceae), apresentaram atividade inibitória contra cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* entre 77-88%.

O gênero *Fusarium* sp. representou 4,62% (22 fungos) da amostra de endófitos isolados de *C. spruceanum*. O gênero *Fusarium* é caracterizado por fungos de rápido crescimento, com coloração pálida ou colorida com um micélio aéreo e difuso ou com esporulação esporodoquial. Muitas espécies deste gênero são encontradas no solo, com distribuição cosmopolita, e ativos na decomposição de substratos celulósicos das plantas. Outras espécies são representadas por parasitas (GOMES et al., 2013). Chagas (2013), relatou que o endófito *F. solani* apresentou atividade inibitória contra *K. pneumoniae* e contra a levedura *Candida albicans*. Em *Brucea javanica*, foi isolado o endofítico *Fusarium chlamidosporum*, do qual foi identificado em seu metabólito a bruceocina, substância com ação anticancerígena (FREIRE et al., 2014). Outra substância de importância é alcaloide camptotecina, isolado de *F. solani*, endofítico de *Camptotheca acuminata* é um potente antineoplásico (SPECIAN et al., 2014).

O gênero *Acremonium* sp. foi isolado uma única vez de fragmento de caule de *C. spruceanum*. Por isso este endófito foi considerado neste estudo como o mais especialista da diversidade encontrada na espécie vegetal. Bezerra (2013) em seus estudos com a espécie *Cereus jamacaru* observou os fungos endofíticos dos gêneros *Cladosporium* e *Acremonium* como os mais comumente isolados. No mesmo estudo, o gênero *Phomopsis* foi considerado como isolado acidental e/ou raro. A diferença entre os achados nos dois trabalhos talvez seja em função dos diferentes ambientes ecológicos a que estão submetidos às plantas estudadas,

forçando um comportamento ecológico diferente em função de quantidades de nutrientes e estresse nos hospedeiros (CHAPLA, 2010; MOREIRA, 2013; BEZZERRA, 2013).

O gênero *Pyricularia* sp. foi seletivo para o meio Sabouraud com extrato a temperatura 18 °C em ambos os tecidos analisados, adotando sessa forma uma característica especialista. Este gênero está relacionado com a brusone, doença que acomete a cultura do arroz. Mas há relatos de achados do gênero em outras gramíneas sem sinais de doenças, o que pode ser atribuída à seleção do hospedeiro (NUNES et al., 2014).

O gênero *Trichoderma* sp. teve caráter especialista para a temperatura, pois só se desenvolveu em 28 °C em ambos os tecidos nos meios BDA com extrato e Sabouraud sem extrato. Chagas (2014) em estudo sobre endófitos da casca incubados em meio BDA a 28 °C de *Hancornia speciosa*, este gênero foi predominante na espécie.

No Brasil são conhecidos 26 gêneros de *Cladosporium*, sendo um fungo endofítico importante no controle biológico de insetos e de fungos fitopatogênicos envolvidos na deterioração do grão de café, ferrugem de pinos e do feijão (ANGÉLICO, 2012). Em *C. spruceanum*, o endofítico foi pouco isolado, ocorreu em ambos os tecidos e temperaturas, mas a melhor temperatura de isolamento foi 18 °C e no meio BDA sem sumo não houve isolamento. *Cladosporium* sp. costuma ser citado como um endófito frequentemente isolado e em alguns trabalhos, se apresenta como o endófito mais frequente (MOREIRA, 2013; CHAGAS, 2014; PIRES et al., 2015). Nos isolados de *Q. variabilis*, o fungo que se mostrou mais ativo foi *Cladosporium* sp. que produz uma substância química identificada como brefeldin A, com ação antifúngica comprovada (CHAGAS, 2014).

Bastos et al. (2014) fez um estudo comparativo entre os meios BDA e Sabouraud durante o isolamento de fungos endofíticos de *Platanus orientalis* Lineu. Dentre os endofíticos isolados, *Trichoderma* sp. e *Fusarium* sp. foram isolados em ambos os meios, porém o primeiro com maior frequência e com significância estatística em meio Sabouraud e o segundo com frequência maior em meio BDA e o endófito *Curvularia* sp. foi isolado apenas em meio Sabouraud.

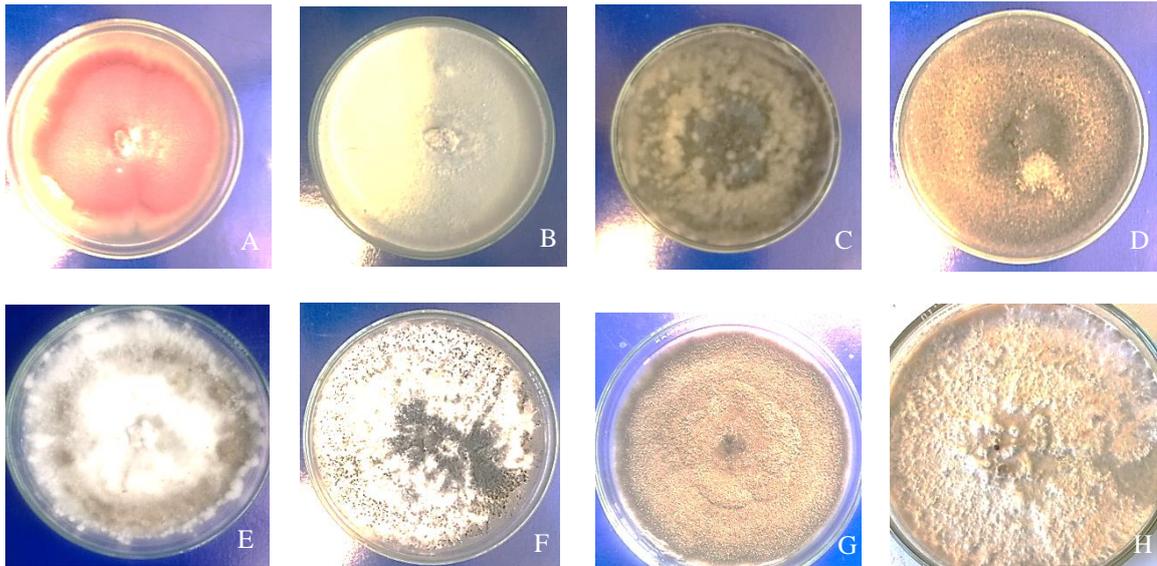


Figura 9. Aspectos macroscópicos de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* em meio BDA. a) *Fusarium* sp.; b) *mycelia sterilia*; c) *Colletotrichum* sp. d) *Curvularia* sp. e) *Xylaria* sp.; f) *Pestalotiopsis* sp.; g) *Guignardia* sp.; f) *Phomopsis* sp.

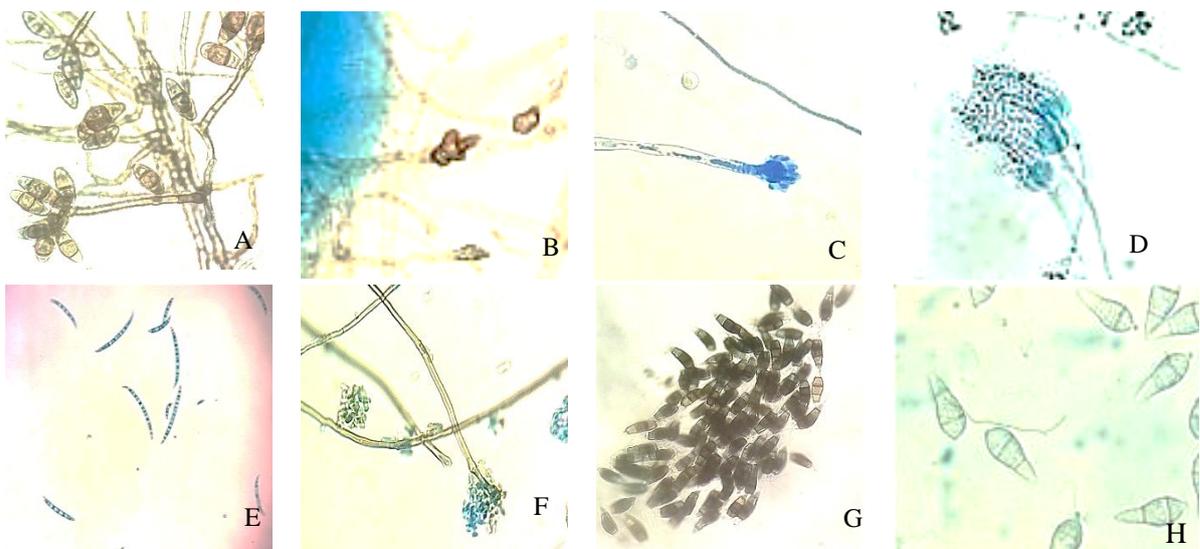


Figura 10. Aspectos micromorfológicos de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*. A) *Curvularia* sp.; B) *Colletotrichum* sp.; C) *Aspergillus* sp.; D) *Penicillium* sp.; E) *Fusarium* sp.; F) *Cladosporium* sp.; G) *Pestalotiopsis* sp.; H) *Pyricularia* sp.

No contexto de Ecologia de Comunidades e em várias aplicações da Biologia da Conservação, diversidade indica variedade de espécies, podendo ou não incluir informações sobre a importância relativa de cada espécie. A mensuração da diversidade pode ser realizada pelos índices não-paramétricos de Shannon e Simpson que consistem na análise de dois componentes: riqueza e equabilidade (MELO, 2008).

A comunidade endofítica associada ao *C. spruceanum* demonstrou ser abundante e diversa. Dos 442 fragmentos vegetais analisados foi obtido um total de 650 isolados. Todos os três indivíduos analisados encontravam-se colonizados por fungos endofíticos. Os diferentes tecidos da planta analisada apresentam diferenças em termos de composição, riqueza e diversidade.

A composição taxonômica dos fungos endofíticos variou de acordo com o tecido estudado. As folhas apresentaram uma menor quantidade de táxons (123) comparando-se com os caules (131). No entanto a maior riqueza foi encontrada nas folhas de *C. spruceanum*.

A diversidade presente entre os gêneros identificados em relação ao total de fungos isolados é confirmada com o índice de Shannon e Simpson e ratificada com o baixo índice de uniformidade de Evenness, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Índice de diversidade de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*.

Espécie	Índice		
	Simpson	Shannon	Evenness
<i>C. spruceanum</i>	0,7839	1,868	0,4317

JIANG e colaboradores (2013), em seus estudos sobre diversidade endofítica em *Angelica sinensis*, utilizando os mesmos índices de infecção, diversidade (Shannon) e uniformidade (Evenness) desta pesquisa, também encontraram grande diversidade na população endofítica em uma das três localidades chinesas onde o estudo foi realizado.

5.2 Atividade Antimicrobiana de Fungos Endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*

Dos 243 táxons obtidos de *Calycophyllum spruceanum* somente 01 representante de cada táxon foi utilizado para produção de metabólitos para realizar o teste de atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco. Nenhum dos metabólitos apresentou atividade para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Entretanto, foi observado atividade sobre bactérias Gram negativas, onde um apresentou atividade para *Klebsiela pneumoniae*, o fungo n.º 2.2800 pertencente ao gênero *Xylaria* com halo de inibição de 10 mm, e 22 fungos endofíticos produziram halos de inibição para *Escherichia coli*, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Metabólitos de fungos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum* com atividade frente à *Escherichia coli* (ATCC 10536).

Nº de Registro	Média de halos de inibição (mm)	Gênero
2. 3119	11	<i>Beauveria</i> sp.
2. 3241	11	<i>Cladosporium</i> sp.
2. 1599	10	<i>Fusarium</i> sp.
2. 3245	10	<i>Guignardia</i> sp.
2. 2481	10	<i>Mycelia Sterilia</i>
2. 2556	10	<i>Mycelia Sterilia</i>
2. 2743	11	<i>Mycelia Sterilia</i>
2. 2761	10	<i>Mycelia Sterilia</i>
2. 3098	11	<i>Mycelia Sterilia</i>
2. 3132	10	<i>Mycelia Sterilia</i>
2. 2426	10	<i>Penicillium</i> sp.
2. 2408	20	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 2444	19	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 2455	19	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 3131	24	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 3162	26	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 3268	20	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 3275	17	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 3365	19	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 3495	19	<i>Phomopsis</i> sp.
2. 2800	10	<i>Xylaria</i> sp.
2. 2802	10	<i>Xylaria</i> sp.
2. 3061	10	<i>Xylaria</i> sp.
2. 3167	10	<i>Xylaria</i> sp.

O gênero *Phomopsis* é conhecido por ser uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos de diversas estruturas, tais como xantonas, éteres diarílicos, citocalasinas, ácido convolvulânico e a micotoxina fomopsina (CHAPLA, 2010).

Os *Phomopsis* sp. isolados de *Aspidosperma tomentosum* e de *Spondias mombin* produziram metabólitos secundários com atividade de inibição de crescimento contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SPECIAN et al., 2014). Como antifúngico, os extratos produzidos por espécies pertencentes a este gênero tem sido relatados como promissores (GOMES, 2008; CHAPLA, 2010; ZANARDI et al., 2012).

Garcia et al. (2012) avaliaram o potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados com a *Sapindus saponaria*. Os autores acima detectaram que os táxons de *Phomopsis* sp. produziram metabólitos ativos contra *E. coli* e *S. aureus*.

Extratos metabólicos de *Xylaria* sp. de *C. spruceanum*, apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*. Nascimento (2010) também observou metabólitos isolados de *Xylaria* sp. capaz de inibir *Mycobacterium smegmatis*. A sordaricina, isolada a partir da *Xylaria* sp., possui atividade antimicrobiana (SPECIAN et al., 2014) e citocalasinas isoladas da *Xylaria* sp. isolada de *Palicourea marcgravii* apresentaram atividade antifúngica (CAFÊU et al., 2005). Todos esses resultados denotam a potencialidade do gênero *Xylaria* sp. como produtos de compostos bioativos.

Um dos fungos do gênero *Fusarium* sp. isolado de *C. spruceanum* apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli*. Cui et al. (2011), em estudo de atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gild. (Thymelaeaceae), verificaram que espécies do gênero *Fusarium* apresentaram atividade contra *E. coli*.

Os gêneros *Beauveria* e *Cladosporium* isolados dos tecidos vegetais de *C. spruceanum* apresentaram atividade antibiótica contra a cepa de *E. coli* testada. Ambos foram

considerados fungos especialistas na espécie vegetal. O endofítico *Cladosporium cladosporioides* isolados de *Calotropis procera* nos estudos de Nascimento (2010) também apresentaram atividade contra a mesma bactéria. Chareprasert et al. (2010) verificaram que *Cladosporium* sp. isolado de *Thespesia populneooides* também inibiu bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Beauverbericina é um ciclo-hexadepsipeptídeo e é a principal toxina produzida pelo gênero *Beauveria*. Tem sido atribuído a este ciclopeptídeo características antimicrobianas contra micobactérias. Entre as bactérias inibidas pela beauverbericina e demais toxinas produzidas pelos integrantes desse gênero estão cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* (VALENCIA, 2011).

Nas pesquisas de Guimarães e colaboradores (2009), houve desempenho de mais de 70% de atividade antibiótica contra cepas de *E. coli*. do fungo endofítico *Guinardia mangiferae* isolado de folhas e caules da planta medicinal *Cladocolea micranta*. Em *C. spruceanum*, o gênero *Guinardia* também demonstrou atividade contra este microrganismo de interesse médico e sanitário. Em Rodrigues et al., (2000) a partir de extratos do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Spondias mombin* L, tiveram atividade antimicrobiana contra *E. coli*.

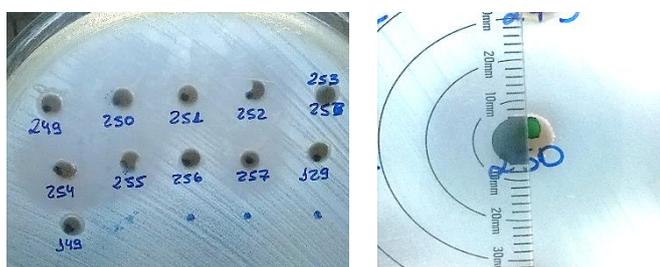


Figura 11. Halos de inibição produzidos por metabólitos de fungos endofíticos de *C. spruceanum* contra *E. coli* (ATCC 10536).

Futuros trabalhos devem ser realizados para caracterização química dos compostos bioativos produzidos pelos endofíticos de *Calycophyllum spruceanum*, como também a otimização das condições de cultivo para a produção dos mesmos.

6. CONCLUSÕES

Há diversidade na espécie *Calycophyllum spruceanum* e por isso representa um importante hospedeiro, constituindo uma boa fonte de fungos endofíticos. Além disso, ela pode ser considerada promissora para estudos complementares, a fim de conhecer mais detalhadamente sua diversidade endofítica em outros tecidos e órgãos.

Foi constatado que os metabólitos produzidos por 22 desses fungos endofíticos possui atividade antimicrobiana capaz de inibir o crescimento *in vitro* de dois importantes agentes patológicos Gram negativos, agentes que tem uma parede celular mais complexa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTA, C. W. Medicines and drugs from plants. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 7, p. 857, 1997.

AGUIAR, C. S. **Avaliação do potencial antimicrobiano do veneno total de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus***. 2014. 81p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ALMEIDA, M. C. **Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes de mulateiro (*Calycophyllum spruceanum* Benth.) Rubiaceae**. 2003. 114p. Dissertação (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

ALMEIDA, R. P. C. **Avaliação da produção de L-Asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado**. 2015. 88p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

ANGÉLICO, C. L. **Application of biological agent *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries' Cladosporin'with bioprotector of coffee quality (*Coffea arabica* L.)**. 2012. 308p. Doutorado (Doutor em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PASTORE JUNIOR, F. (Coord.). **Plantas da Amazônia para a Produção Cosmética: uma abordagem química**. Brasília – DF: Laboratório de Tecnologia Química, Universidade de Brasília, 2007.

ARAÚJO, W. L. et al. Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. **Cop. Luiz de Queiroz**, Piracicaba, 167p, 2010.

ARCHER, G. L.; POLK, R. E. Tratamento e Profilaxia das Infecções Bacterianas. In: FAUCI, A.; KASPER, D. L. **Doenças Infeciosas de Harrison**, Porto Alegre: Editora AGHM, p. 318, 2015.

ASSUNÇÃO, M. M. C. **Fungos endofíticos isolados de folhas de bananeira (*Musa* spp.) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura**. 2010. 171p. Dissertação (Doutor em Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. et al. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 233-268, 2002.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Ed. EMBRAPA, 1998. p.117-137.

BAERGA-ORTIZ, A. Biotechnology and biochemistry of marine natural products. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 28, n. 3, 2009.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. Lisboa: 2013. 43p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologias em Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minneapolis: Burgess Publish Company, 1972.

BASTOS, Denise Zelak Leite et al. Fungos associados à casca do caule de *Platanus orientalis* L. **Revista Estudos de Biologia**, v. 26, n.54, p. 37-41, 2004.

BEZERRA, J. D. P. **Diversidade de fungos endofíticos de mandacaru (*Cereus jamacaru* DC. Cactaceae) em áreas sucessionais de Caatinga**. 2013. 68p. Dissertação (Mestre em Biologia de Fungos) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BEZERRA, J. D. P. et al. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, n. 2, p. 53-63, 2013.

BEZERRA, J. D. P. et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.

BEZERRA, J. D. P. et al. Riqueza de micro-organismos endofíticos em espécies da família Cactaceae. **Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas**, v. 9, n. 2, p. 19-23, 2012.

CAETANO, R. S.; DE SOUZA, A. C. R.; FEITOZA, L. F. O Uso de Plantas Medicinais Utilizadas por Freqüentadores dos Ambulatórios Santa Marcelina, Porto Velho-RO. **Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 1, 2014.

CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, p. 991-995, 2005.

CAMPOS, Â. D. et al. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 15-21, 2009.

CARACIOLO, B. F. **Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecções de pele e tecidos moles de pacientes ambulatoriais**. 2011. Dissertação (Mestre em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade federal de Pernambuco, Recife.

CARDOSO, P.; MARIN, J. M. Resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de queijo muçarela artesanal produzido no Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 30, n.2, p. 104-108, 2015.

CARHUAPONA, M.; ÂNGULO, P. **Plantas Medicinales em Atencion Primaria de salud, Agroindustria, Fitoquímica Y Ecoturismo: perspectivas de desarrollo em la region los libertadores wari**. IICA, Lima. Peru. 1999

CARROLL, G. C. Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. **Microbiology of the phyllosphere/edited by NJ Fokkema and J. van den Heuvel**, 1986.

CASSINO, M.F. **Estudo etnobotânico de plantas medicinais em comunidades de várzea do rio Solimões, Amazonas e aspectos farmacognósticos de *Justicia pectoralis* Jacq. forma mutuquinha (Acanthaceae)**. 2010. 135p. Dissertação (Mestre em Botânica) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CHAGAS, M. B. O. **Fungos endofíticos de *Hancornia speciosa* gomes: identificação e atividade antimicrobiana**. 2013. 86p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHAPLA, V. M. **Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp.** 2014. 251p. Tese (Doutor em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CHAPLA, V. M.; BIASSETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2012.

CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 174p. Dissertação (Mestre em Química) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CHAREPRASERT S, et al. Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: their antimicrobial and anticancer potentials. **Botanica Marina**, v.53, p.555-564, 2010.

CORNICK, J. E.; BENTLEY, S. D. *Streptococcus pneumoniae*: the evolution of antimicrobial resistance to beta-lactams, fluoroquinolones and macrolides. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 7, p. 573-583, 2012.

COSTA, L. M. et al. Technological development of aqueous extracts from *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) using factorial design. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 1, p. 181-186, 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CUI, J.; GUO, S.; XIAO, P. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 12, n. 5, p. 385-392, 2011.

DELEO, F. R. et al. Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557-1568, 2010.

DUCKE, A. BLACK, E.A. Notas sobre Filogeografia Brasileira. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**. Belém, n.29, 62p., 1954.

EMERY, S. F.; SANTOS, G. B., BIANCHI, R. C. **A química na natureza**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010.

FAGANELLO, F. S. **Validação de protocolo para detecção de *Guignardia citricarpa* em citros por PCR convencional e PCR em tempo real**. 2013. 89p. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 2, n. 01, 2013.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPÓSITO E.; AZEVEDO J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 49-62, 2014.

FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. O. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, v. 16, n. 1, 2014.

FREITAS, A. C. et al. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1506-1515, 2012.

GARCIA, A. et al. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 10, p. 35, 2012.

GARVIL, M. P.; et al. Impactos da presença do fungo *Penicillium* sp. na indústria. **e-RAC**, v. 4, n. 1, 2015.

GATTI, K. C.; GONÇALVES, R. C.; XAVIER, A.; PAIVA, H. Propagação vegetativa de Jequitibá (*Cariniana estrellensis* (Raddi) por miniestaquia. **Temas Agrários**, Montería, v. 16, n. 2, p. 54-63, 2011.

GIBERTONI, Tatiana B. et al. Distribution of poroid fungi (Basidiomycota) in the Atlantic Rain Forest in Northeast Brazil: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 24, n. 9, p. 2227-2237, 2015.

GOMES, U. D. et al. Avaliação do Desenvolvimento de Plantas de Milho (*Zea mays* L.) Após Colonização pelo Fungo Endofítico *Fusarium Verticillioides*. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 15, n. 2, 2013.

GRILLO, V. T. R. S. et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2013.

GUIMARÃES, A. C. et al. Investigação preliminar da composição micelial e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da erva-de-passarinho amazônica *Cladocolea micrantha* (Eichler) Kuijt (Loranthaceae). **Revista Fitos Eletrônica**, v. 4, n. 02, p. 90-101, 2009.

GUIMARÃES, D. O. et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUITTON, T. L. **Madeiras da Amazônia: características e utilização**. Rio Branco: Laboratório Autônomo de Estudos Florestais da Amazônia, 1991. v.1. 89-90 p.

GUMBO, T. Princípios gerais do tratamento antimicrobiano. In: BRUNTON, L.L. GOODMAN & GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. cap. 48.

HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Application of the Scholander pressure bomb to studies on endophytic bacteria of plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 411-416, 1997.

HEINIG, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal Diversity**, v. 60, n. 1, p. 161-170, 2013.

JIANG, S. et al. Biodiversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 5, n. 4, p. 264-271, 2013.

KURODA, K; CAPUTO, G. A. Antimicrobial polymers as synthetic mimics of host-defense peptides. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 1, p. 49-66, 2013.

LACAZ, C.S. et al. Técnicas Micológicas e Imunológicas. Técnicas de Coloração em Micologia. Micopatologia. Meios de Cultivo. Preparo de Antígenos Micológicos. Métodos Bioquímicos e Imunoquímicos para o estudo de antígenos fúngicos. In: **Tratado de Micologia Médica**, 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LINO, T.S.S.; et al. Efeito antioxidante e fotoprotetor de extratos aquosos e etanólicos da casca do *Calycophyllum spruceanum*. In: **61ª Reunião Anual da SBPC - Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. Manaus, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, v.1, 1998. 317p.

MARANHO, Á. S.; PAIVA, A. V.; PAULA, S. R. P. Crescimento inicial de espécies nativas com potencial madeireiro na Amazônia, Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 5, p. 913-921, 2013.

MELLO, M. R. S. **Deteção da atividade da enzima carbapenemase em Enterobacteriaceae e Pseudomonas aeruginosa isoladas em clínicas veterinárias do Distrito Federal, Brasil**. Brasília: 2014. 26p. Dissertação (Mestre em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Animal, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

MELO, A. S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 21-27, 2008.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 25-31, 2011.

MORAIS, S.M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

MOREIRA, M. G. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze.** 2013. 67 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

MOREIRA, R. L. **Fungos endofíticos e epifíticos associados às folhas de cacauzeiro.** Rio Claro, 2014, Universidade Estadual Paulista, 2014

MOREIRA, V. C.; FREIRE, D. ***Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos.** 2014.

MUSSI-DIAS, V. et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 261-266, 2012.

NASCIMENTO, A. L. D. R. **Ação antimicrobiana do extrato de *Eugenia Uniflora* L. (pitanga) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.** Campina Grande. 2014, 30p.

NASCIMENTO, T. L. **Fungos endofíticos de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.:** aspectos ecológicos e potencial antimicrobiano. 2010. 70p. Dissertação (Mestre em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NCCLS. Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. 8ª ed. **NCCLS, Pensilvania, Estados Unidos da América.** 58 p. 2003.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, p. 70-76, 2013.

NUNES, C. D. M. et al. Variabilidade de *Pyricularia oryzae* Cav. em genótipos de arroz. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 44, n. 3, p., 2014.

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

OLIVEIRA, C. M. et al. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 93-96, 2011.

PASTORE, A. P. W. **Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humana e animal.**

2015. 66p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas de Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PEREIRA, J. O. **Fungos Endofíticos de hospedeiros tropicais** *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. 1993. 105p. Tese (Doutor em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial Ecology of Leaves**. Springer New York, 1991. p. 179-197.

PINA, E. et al. Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 27-39, 2010.

PINHEIRO, E. A. et al. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1633-1638, 2013.

PORTILLO A, VILLA R. A atividade antifúngica de plantas paraguaias usadas na medicina tradicional. **Journal Ethnopharmacoly**, v. 88, p. 93-98, 2001.

QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, v. 10, n. 2, p. 132-8, 2012.

QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, p. 132-8, 2012.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. cap. 50.

RECORD, S. J.; HESS, R. W. **Timbers of the New World**. Yale University Press, New Haven. 1943. 640 p.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: co-edição Sebrae/INPA, 2001.

RIZZINI, C.T. 1971. **Árvores e madeiras úteis no Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Editora Blücher, 1971. 292p.

ROCHA, D. P. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, p. 111-118, 2011.

RUFINO, M. P. **Avaliação química e biológica do fungo endofítico** *Colletotrichum* sp. isolado de *Senna spectabilis*. 2011. 106p. Dissertação (Mestre em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SAIKKONEN, Kari et al. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SANTOS, L. S. et al. Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. In: **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação-Universidade do Vale do Paraíba**, 2009.

SANTOS, M. L. V. S. **Potencial antifúngico de fungos endofíticos isolados de folíolos de aroeira-da-praia** (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 2012. 105p. Dissertação (Mestre em Biologia de Fungos) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SCARPATE, E.C. B.; COSSATIS, J. J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2009.

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F., **The Healing Forest Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia**. Dioscorides Press, Oregon. 1990

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 06, p. 661-686, 2005.

SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 117-122, 2010.

SILVA, A. J.; BARRETO, J. G. Determinação de teor de princípio ativo em comprimidos de ácido acetilsalicílico. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2015.

SILVA, G. H. et al. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1964-1969, 2006.

SILVA, G. H. et al. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). **Química Nova**, p. 2038-2041, 2010.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SILVA, M. B.; RONDON, J. N. Utilização de fungo de bambu na biorremediação de solo contaminado. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 10, n. 10, p. 2175-2184, 2013.

SOLA, M. C. et al. Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-2012.

SOUSA C., R. et al. Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde = Journal of Health Sciences**, v. 7, n. 1, 2015.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde = Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2015.

STROBEL G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, p. 257–268, 2004.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 5, p. 913-928, 2011.

TARGA, S. E. M. et al. Influence of crude extracts of endophytes from *Luehea divaricata* (Malvales; Tiliaceae) on the in vitro development of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae) larvae. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 3, 2011.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

UGARTE-GUERRA, L. J.; DOMÍNGUEZ-TORREJÓN, G. Índice de Sitio (IS) de *Calycophyllum spruceanum* Benth. en relación con la altura dominante del rodal en ensayos de plantación en la Cuenca del Aguaytía, Ucayali, Perú. **Ecología Aplicada**, v. 9, n. 2, p. 101-111, 2010.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2005.

VALENCIA, J. W. A. **Metabólitos de origem fúngica: aplicações potenciais em processos biotecnológicos**. Brasília: 2012. 177p. Tese (Doutor em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

VASCONCELOS, F. R. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 405-410, 2010.

VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VITOLO, M. et al. **Biotecnologia Farmacêutica**. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2015. 107p.

WANG, B. et al. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. **Mycological Research**, v. 111, p. 347-354, 2007

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

YOSHIOKA, C. R. M. et al. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 1, p. 70-75, 2011.

ZANARDI, L. M. et al. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, p. 2233-2236, 2012.

ZULETA, L. M. C. et al. Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 549-553, 2003.