

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é citado na literatura como a primeira alternativa farmacológica encontrada para a cura de doenças (BADKE et al., 2011, FIRMO et al., 2011).

Nesse sentido, a comunidade científica tem realizado inúmeras descobertas de metabólitos primários e secundários disponíveis na natureza, sejam estes produzidos por plantas ou por microrganismos, que podem oferecer novas oportunidades para diversificar a indústria farmacêutica, de produção de herbicidas (CARVALHO et al., 2016).

Um exemplo foi à descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, de modo que, a busca de sua eficácia não parou, e finalmente, em 1950 foi distribuída para comercialização e dois anos depois foram vendidas 150 toneladas deste fármaco nos Estados Unidos (LOPES, 2011).

Assim, o que se busca até os dias de hoje, ainda são moléculas tão efetivas quanto à penicilina, o que leva pesquisadores a acreditarem no potencial dos microrganismos, em particular os endofíticos, produtores de diversas substâncias bioativas.

Os endófitos se caracterizam por fungos e bactérias que vivem no interior das plantas especialmente em raízes, caules e folhas, sem causarem danos aparentes aos seus hospedeiros (AZEVEDO et al., 1999). Embora fungos endofíticos tenham sido descritos há mais de um século, somente no final da década de 1970, Carroll e colaboradores realizaram estudos envolvendo a taxonomia e ecologia desses microrganismos e constataram a capacidade dos endófitos de proteger as plantas contra patógenos e insetos predadores, diante das pesquisas já realizadas, surgiram maiores interesses dos pesquisadores em explorar a potencialidade dos endofíticos (BERNSTEIN; CARROLL, 1977; CARROLL; CARROLL, 1978).

Deste modo, a riqueza de plantas existentes na natureza abriga uma grande diversidade de endófitos promissores à proteção de seus hospedeiros agindo contra insetos-praga,

patógenos e herbívoros (AZEVEDO, 2000). Além disso, podem conferir maior resistência a seus hospedeiros contra condições de estresse hídrico, alterar propriedades fisiológicas das plantas, produzindo hormônios vegetais, enzimas e outros compostos de interesse biotecnológico (ARAÚJO, 2010).

Um dos mais citados exemplos de substância de importância farmacológica extraído de planta e também sintetizado por endofíticos é o taxol, um anticancerígeno isolado do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia*, e posteriormente do endófito *Taxomyces andreanea* (STIERLE et al., 1993, SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Neste sentido, a espécie medicinal *Himathanthus sucuuba*, amplamente utilizada na etnofarmacologia, apresenta potencial farmacológico, visto que, já foram isoladas substâncias com comprovada atividade biológica (MONTEIRO et al., 2012; VÁSQUEZ et al., 2014).

H. sucuuba apresenta diversas aplicações: folha, caule e látex são utilizados na forma de infusão e decocção como vermífugo, no combate a úlceras, como emplastro nas afecções herpéticas, psoríase e verrugas (SEGOVIA; ORELLANA, 2003), como antitumoral, antifúngico e no tratamento de gastrites, úlceras e artrites (AIRES, 2013), para tratar tosse, gripe, diarreia, hemorroidas, verrugas, luxações, infecções fúngicas, anemia, depuração do sangue, afrodisíaco e nos processos de analgesia (LINHARES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010; PINHEIRO et al., 2014).

Estudos já realizados com *H. sucuuba* mostraram que a mesma tem ação eficaz como inibidor de vias inflamatórias (FAKHRUDIN et al., 2014), analgésico (MIRANDA et al., 2000), leishmanicida (SOARES et al., 2010) e se mostrou seguro para o consumo humano, visto que, apresentou baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica (GUERRA; PETERS, 1991).

Embora a literatura reporte estudos sobre a composição química e atividade biológica de *Himatanthus sucuuba*, não há pesquisas relatando a sua comunidade endofítica e potencial

antibacteriano da mesma. Assim, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar a diversidade de fungos endofíticos presentes em *Himatanthus succuba*, e avaliar a atividade antibacteriana dos metabólitos endofíticos frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e a origem dos Produtos Naturais

Os primeiros registros sobre a utilização de plantas medicinais são datados de 500 a.C., em texto Chinês que relata nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de diversas doenças (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006; ALMEIDA, 2013; PEREIRA, 2013). Posteriormente, o Papiro Ebers de 1.550 a.C. possui descrições de plantas medicinais feitas pelos Egípcios, e relata aproximadamente 100 doenças e um grande número de drogas de natureza animal, vegetal ou mineral utilizados na cura de doenças e para afastar maus espíritos (BANÓSKI, 2008; FIRMO et al., 2011).

Os referidos relatos mostram, que as populações de todo o mundo têm usado as plantas, ao longo dos séculos, na busca por alívio de sintomas, cura de doenças e controle de pragas (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2007; ARGENTA et al., 2011). De acordo com o histórico literário, os medicamentos tiveram origem natural, sendo de fonte vegetal, mineral, microbiano e por fim, animal (NASCIUTTI, 2012).

O Brasil é um país rico em biodiversidade, entretanto, ainda pouco estudada, embora nos últimos 15 anos o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) tenha reunido a primeira base de dados sobre compostos químicos naturais extraídos da biodiversidade brasileira com um acervo de 640 substâncias, incluindo as principais propriedades físico-químicas e biológicas até a estrutura tridimensional dos compostos, o que tem despertado o interesse de pesquisadores de várias partes do mundo (MARQUES, 2014).

Conforme Dam (2012), com os avanços da ciência e dos processos de industrialização, esses produtos naturais passaram a ser processados em laboratório, para purificar seus princípios ativos, testar sua eficácia terapêutica, estabelecer dosagens seguras com melhores

resultados na sua administração e para se obter produtos semi-sintéticos mais potentes e com menos efeitos colaterais.

Aproximadamente 50% dos medicamentos em uso são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese (FOGLIO et al., 2006). Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25% dos medicamentos utilizados nos países industrializados são originários de cerca de 90 espécies de plantas, sendo os países orientais, como China e Japão, os que mais pesquisaram e disponibilizam fármacos de origem natural nos últimos 20 anos (FOGLIO et al., 2006; BRASIL, 2012). Essas conquistas e reconhecimento incentivam pesquisadores a estudar as plantas medicinais amazônicas, como *Himatanthus sucuuba*, visando conhecer não somente seus compostos químicos, mas a relevância de seus princípios ativos.

2.2 *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson

De acordo com Azambuja (1947) até 1656, todas as espécies produtoras de látex eram reunidas em um grupo chamado de Apocynum. A partir de 1759, Bernard de Jussieu aceitou a família Apocynaceae sob o nome de Apocina e ao longo dos últimos anos ocorreram várias reclassificações até a organização das Apocynaceae (Dicotiledônea) em cinco subfamílias: Apocynaceae (Rauvolfioideae e Apocynoideae) e Asclepiadaceae (Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae) (ENDRESS; BRUYNS, 2000). Recentemente ainda foram classificadas 25 tribos e 49 subtribos para esta família (ENDRESS et al., 2014). De acordo com Rapini et al. (2009) existem de cerca de 5.000 espécies de Apocynaceae, distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais de todo mundo. Os autores também elevam o número de gêneros para 450 e as espécies existentes no Brasil para 750, sendo que destas, 85 são consideradas raras, e o número de gêneros pode chegar a 60, habitando principalmente as Regiões Sul e Sudeste do Brasil.

Como parte da Família Apocynaceae, o gênero *Himatanthus* foi descrito pela primeira vez em um inédito manuscrito no herbário de Carl Ludwig Willdenow com base nas espécies únicas "*Himatanthus rigida* Willd", descrito a partir da amostra Sieber SN recolhidos entre 1801 e 1807 e agrupado dentro do gênero *Plumeria* (SPINA et al., 2013). Em 1938, Woodson reconheceu o gênero *Himatanthus*, separando este do gênero *Plumeria* (AZAMBUJA, 1947). O gênero ainda é considerado monofilético e de origem recente, o que torna as espécies semelhantes do ponto de vista morfológico e molecular (SPINA, 2004).

A espécie *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.). Woodson, pertencente à família Apocynaceae, subclasse Asteridae, ordem Gentianales, subordem Apocyninae (CRONQUIST, 1998). É uma árvore de grande porte, variando de 8 a 20 m de altura (FERREIRA et al., 2009), apresentando caule tortuoso pardacento, base do tronco reta e casca fissurada (SEGOVIA; ORELLANA, 2003).

Larrosa; Duarte (2005b) contribuíram com estudos da anatomia do caule incluindo casca, câmbio vascular, xilema, floema interno, parênquima medular e observaram lactíferos ramificados na casca, prismas e drusas de oxalato de cálcio, fibras e células pétreas no floema externo que podem auxiliar na identificação ou diferenciação de espécie semelhantes.

A morfologia externa e a anatomia das folhas foram detalhadamente descritas por Larrosa; Duarte (2005a), se apresentando como folhas simples e alternas, curtamente pecioladas, com aproximadamente 20 cm de comprimento e 7 cm de largura, simétricas, de forma obovado-lanceolada, com ápice agudo a acuminado, base aguda a decurrente, margem inteira, coloração verde escura na face adaxial e verde amarelada na face abaxial. Possui nervação pinada, camptódroma do tipo broquidódromo.

As folhas também apresentam laticíferos ramificados próximos aos feixes vasculares, camada subepidérmica na nervura central, feixes vasculares bicolaterais em arranjo triangular na nervura central e no pecíolo, os idioblastos apresentam cristais de oxalato de cálcio e

compostos fenólicos, os estômatos são anomocíticos com bordas periestomáticas na face abaxial (LARROSA; DUARTE, 2005a).

Quanto à fenologia, o gênero floresce entre os meses de janeiro a maio e de agosto a novembro. As inflorescências são dispostas em panículas terminais com poucas flores, grandes e brancas de perfume adocicado (SEGOVIA; ORELLANA, 2003; LARROSA; DUARTE, 2005b). A frutificação ocorre nos meses de janeiro, março, agosto e novembro independente da estação seca ou chuvosa (CAMPOS; FARINACCIO, 2011).

Os frutos são deiscentes em forma de cápsula lenhosa medindo entre 20 e 40 cm de comprimento e até 14 cm de diâmetro normalmente em pares contendo sementes elipsoides aladas distribuídas no fruto na forma de escamas (LARROSA; DUARTE, 2005b), conforme Figura 1. Esta estrutura reveste inteiramente a semente protegendo e facilitando a dispersão da espécie pelo vento (anemocória) e pela água (hidrocória), uma vez que foram observadas no ambiente natural de várzea e em experimento em viveiro, que a semente de *H. sucuuba* pode permanecer horas flutuando até afundar por completo o que se torna um fator favorável para a manutenção da espécie em áreas de várzea, o que pode facilitar a coleta do látex pelas comunidades extrativistas (FERREIRA et al., 2005).

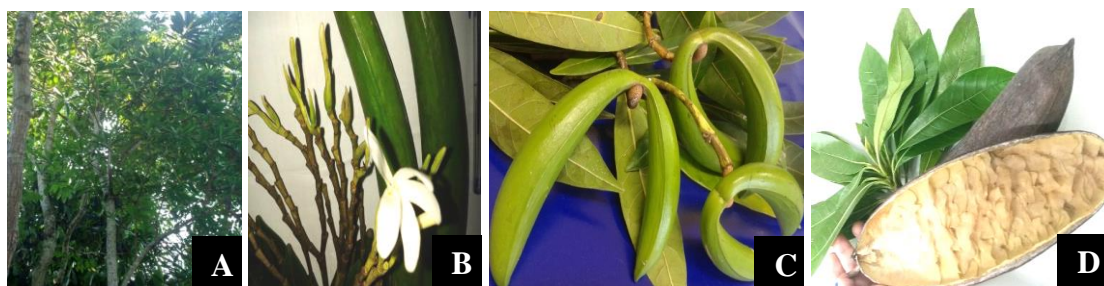


Figura 1. Morfologia da espécie *Himatanthus sucuuba*. (A) Árvore; (B) Flores; (C) Frutos imaturos; (D) Fruto seco com sementes em fase de dispersão.

Fonte: Arquivo pessoal.

Monteiro (2010) se refere às Apocináceas como produtoras de látex utilizado para fins como produção de borracha, goma de mascar e uso medicinal. O autor ainda descreve o látex como, um líquido viscoso, de cor amarelo-esbranquiçada, produzido pela planta, em

estruturas especializadas, denominadas de vasos lactíferos presentes no caule, que ao ser seccionado secreta o látex para a superfície, que coagula e veda por sistemas enzimáticos o ferimento feito na planta.

A espécie *H. sucuuba* ocorre ao longo da América do Sul, em países como Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e na Bolívia (MORAGAS, 2006). No Brasil, ocorre nas regiões Norte (Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Estado do Maranhão) e Centro-Oeste (Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal) sendo uma espécie arbórea nativa da Amazônia e do cerrado (LARROSA; DUARTE, 2005a; FORZZA; LEITMAN, 2010; SOARES et al., 2010).

A espécie é considerada de boa adaptação aos diferentes ambientes e substratos, se desenvolvendo tanto, em áreas alagadiças, quanto em terras inundáveis, incluindo o desenvolvimento de estratégias para tolerar os baixos níveis de oxigenação, o que permite a germinação e sobrevivência dos indivíduos jovens após longos períodos de inundação nas florestas de várzea (FERREIRA et al., 2009).

2.2.1 Principais aplicações etnofarmacológicas da espécie

A espécie *Himatanthus sucuuba* é bastante utilizada por vários povos, no entanto é importante a correta identificação, considerando que, cada país ou região apresenta um nome popular diferente. No Brasil é conhecida como sucuuba, sucuba, janaguba, ucuuba, caracucha, caracuchu-blanco, leiteiro, pau-de-leite, sanango, tiborna; pelos povos Tikuna do Brasil como naaypere; na Colômbia é chamada platanote; no Peru conhecida como bellaco-caspi; no Equador é conhecida pelos povos Waorani como ceneiwe (LARROSA; DUARTE, 2005a; SOARES et al., 2010; VIANA et al., 2011). Na Bolívia é popularmente conhecida como caimo-plátano, plátano, jihuibepia; pelos povos nativos Tacana da Amazônia de Pando como

bashipasha, nashaal; na Venezuela amapola, eukui-ye, kamajumimo, lechero, maripa-aripao, mapolo, platanote, rabipelado; na Guiana, frangi-pani e maho, e na Guiana Francesa, balata-sauvage, bois-chenille, bois-lait (MORAGAS, 2006).

Espécies do gênero *Himatanthus* são amplamente utilizadas em estados das regiões Norte e Nordeste do Brasil, e em outros países da América do Sul como Peru e Colômbia para o tratamento de diversas doenças como gastrite, artrite, câncer, diarreia, ameba, hérnia, furúnculo, tumores, dor de dentes, e a tintura da casca para luxações (PERDUE; BLONSTER 1978; RODRIGUES et al., 2010). Assim, a espécie mais utilizada popularmente é *H. succuba* sendo citada pela grande maioria das pessoas entrevistadas que fazem uso de plantas medicinais (FRANCO; BARROS, 2006; LEÃO et al., 2007; SOARES et al., 2010). Quanto às formas de uso, na medicina popular, folha, caule com casca e látex têm as mais variadas formas de preparo.

As folhas são preparadas na forma de infusão para tratar tumores, gastrites, úlceras, artrites e como antifúngico (AIRES, 2013), na forma de decocto contra constipação, dores e irritação do estômago (LAROSSA; DUARTE, 2005a).

A infusão da casca seca é conhecida pela atividade antiúlcera e afrodisíaca (WOOD et al., 2001), sendo também, bastante utilizada, como antitumoral, antifúngico e no tratamento de gastrites, artrites (AIRES, 2013), inflamações, câncer, diarreia, ameba (LEÃO et al., 2007), dor de dentes, e a tintura da casca para luxações (RODRIGUES et al., 2010). As comunidades ribeirinhas da Amazônia ainda usam a casca do caule seco como analgésico e para cura da tosse (WOOD et al., 2001). No Peru, a infusão da casca do caule é usada como agente cicatrizante de feridas, tratamento de tumores, furúnculos e inchaços, contra a artrite, como laxante vermífugo e como alucinógeno. Na Colômbia, a raiz ainda é considerada muito venenosa o que limita os usos tradicionais e a exploração da espécie (WOOD et al., 2001).

O látex de *H. succuba* é muito utilizado na medicina popular da região Norte do Brasil e no Peru principalmente na forma de suco para o tratamento do câncer, antifúngico, antianêmico, anti-inflamatório (BARRETO et al., 2007), contra gripe, tosse, depurativo (FRANCO; BARROS, 2006), gastrite, hemorróidas, anemia, artrite, verminoses (MIRANDA

et al., 2000), no combate a úlceras e como emplastro nas afecções herpéticas, psoríase e verrugas (SEGOVIA; ORELLANA, 2003; LAROSSA; DUARTE, 2005a). Segundo Rodrigues et al. (2010), o látex de *H. sucuuba* ainda é indicado para os casos de dores lombares.

Conforme Linhares; Pinheiro (2011) a forma de extração do látex utilizado pelas comunidades extrativistas ainda é bastante rudimentar, pois consiste na extração da casca com uso de facão e posterior retirada do látex com auxílio de esponja embebida em água, e após este processo, se faz a decantação. Segundo relatos dos extrativistas o período de melhor extração do látex é a estação chuvosa com rendimento de 82%. Entretanto, as comunidades atribuem à estação seca como de melhor qualidade para o látex e consideram as fases lunares como o principal fator de interferência.

A técnica de coleta por contato direto não garante, portanto, a qualidade microbiológica do produto comercializado nas feiras o que sugere elaboração de técnicas com melhor assepsia e capacitação dos extrativistas para garantir a qualidade do látex comercializado. Em relação aos cuidados empregados para não sacrificar a árvore, o cuidado mais frequente é para não danificar o córtex, embora, tenha ocorrido uma diminuição dos indivíduos nos últimos anos provocada pela ausência de critérios durante a coleta (LINHARES; PINHEIRO, 2011).

2.2.2 Estudos químicos e isolamento de substâncias

O látex de *H. sucuuba* espécie é uma suspensão contendo partículas de hidrocarbonetos do grupo dos terpenos numa matriz aquosa em forma de coloide, isto é, uma fase sólida dispersa em uma fase líquida. A fase sólida, de 30 a 50%, é o hidrocarboneto chamado isopreno e outras substâncias, como açúcares, alcalóides, protídeos, ceras, amido, cristais, taninos e resinas. A fase líquida, de 50 a 70%, é o soro, constituído em sua maior parte por água, ácido orgânico e enzimas (MONTEIRO, 2010).

Pinheiro et al. (2014) realizaram as análises de alguns parâmetros físico-químicos do látex de *H. succuba* onde os valores de pH variaram entre 3,36 e 4,39, a condutividade elétrica entre 0,08 e 0,38 mS/cm, a acidez entre 0,72 a 3,18 %, os sólidos solúveis totais (SST) encontrados foram de 2,00 e 5,67 °Brix, a umidade 90,41 e 98,64%, a média de densidade obtida foi igual a 1,08 kg/m³, a viscosidade ficou em média igual a 30,38 cSt, indicando um produto pouco viscoso e as cinzas encontradas tiveram um valor médio de 0,13%.

Silva et al. (2014) também avaliaram parâmetros físico-químicos do chá da casca em pedaços e da droga pulverizada. Os valores de pH para os chás das cascas em pedaços obtiveram média de 5,06 e o chá da casca pulverizada, média 4,23, valores estes significativamente diferentes ($p < 0,05$). A acidez, também teve médias distintas, sendo maior para o chá da casca pulverizada (1,33%) do que para o de casca em pedaços (1,05%). A condutividade elétrica, não foi afetada pela pulverização, sendo os resultados encontrados pouco distintos.

Os autores relatam que a pulverização da casca pode ter sido responsável pelo aumento da acidez do chá e pela elevação da densidade, pois os resultados encontrados foram significativamente distintos, sendo que o grupo de chás das cascas pulverizadas se mostrou mais denso, sendo este resultado atribuído a maior capacidade de arraste de substâncias considerando a superfície de contato da droga pulverizada (SILVA et al., 2014).

Diversos estudos relatam as classes químicas mais encontradas em Apocináceas destacando os alcalóides, glicosídeos cardiotônicos e iridóides (MORAGAS, 2006). Neste sentido, para se fazer uso de plantas medicinais de forma segura, se faz necessário o isolamento e identificação das substâncias, o conhecimento das estruturas químicas, a distribuição e concentração nos órgãos vegetais para poder se estabelecer dosagens que minimizem os efeitos colaterais e resistência nos pacientes. O Quadro 1 traz de forma resumida as substâncias isoladas de *H. succuba*, indicando o órgão da planta e ação farmacológica.

Quadro 1. Principais substâncias químicas isoladas de *Himatanthus sucuuba*.

Estrutura da planta	Extrato	Substância isolada	Ação farmacológica	Autor
Casca e Folha	Hidro-alcóolico	Flavonóides, taninos, iridóides e triterpenos	N. A.	RODRIGUES et al., 2010
Casca	Não citado	Ácidos orgânicos, açúcares redutores, antraquinonas, catequinas, saponinas espumídicas e taninos	N. A.	LAMEIRA et al., 2003
Casca e látex	Hexânico	Acetato de lupeol	N. A.	MORAGAS, 2006
Casca	Hexânico	Fulvoplumierina	Citotóxico Anticancerígeno	PERDUE; BLOMSTER, 1978
Casca	Hexânico	Plumericina e isoplumericina; ácido cinâmico, lupeol e α -amirina	Fungitóxicos	SILVA et al., 1998
Casca	Etanólico	Cinamato de amirina, acetato decinamato, β -fenilpropionato de etilo, ésteres de lupeol	N. A.	WOOD et al., 2001
Casca	Metanolólico	Plumeridoide C, plumericina, plumieridina, allamandicina, biochanina, dihidrobiochanina A, dalbergioidina, naringenina, ferreirine, dihidrocajanine, pinosinol lignana	N.A.	WALTENBERGER et al., 2011
Látex	Hexânico	Iridóides 15-desmetilplumierídeo, 15-desmetilplumierídeo, plumierídeo e isoplumierídeo	Fungicida antianêmico anti-inflamatório anticancerígeno	BARRETO; AMARAL, 2007
Látex	Não citado	<i>cis</i> -poliisopreno	-	SILVA et al., 2003
	Não citado	Carboidratos arabinose, glucose, xilose, ramnose e galactose.	Funções biológicas	
	Não citado	Cálcio, Magnésio	Funções biológicas/Anti-inflamatório e antitumoral	

N.A.= Não analisado

As substâncias citadas possuem grande diversidade de atividade biológica, e por isso, se tem estimulado o interesse em métodos seguros para a sua determinação e isolamento visando o controle desses princípios ativos e o uso racional do látex e da casca de *H. succuba* na medicina (SILVA et al., 2007).

2.2.3 Propriedades medicinais

Nos diversos trabalhos realizados com esta espécie vegetal, foram detectados e isoladas substâncias com potencial farmacológico, sendo as principais da classe dos triterpenos e iridóides, aos quais se tem atribuído os efeitos anti-inflamatório (MIRANDA et al., 2000), fungicida (SILVA, 1998) e anticancerígeno (PERDUE; BLOMSTER, 1978). Fakhrudin et al. (2014) não citam a parte da planta e o solvente utilizado mas, relata que a substância plumericina purificada do extrato da planta teve efeito satisfatório como inibidor do Fator de transcrição nuclear de kappa-B (NF- K β) que sinaliza diversos sinais pró-inflamatórios e a sua inibição é considerada uma estratégia promissora para combater inflamação.

Outro grupo de substâncias ativas encontradas no extrato metanólico da casca de *H. succuba* foram os depsídeos, que são um grupo de compostos proveniente de líquens, os quais se apresentaram como inibidores da enzima beta monoamino-oxidase (MAO-B). A purificação desse extrato apontou que essa atividade era atribuída ao ácido confluêntico que é uma substância usada no tratamento de alguns tipos de depressão e mal de Parkinson (LINHARES, 2010). No entanto, não se sabe ao certo se a substância pertence à planta ou aos líquens agregados à casca (SILVA et al., 1998).

Ainda conforme Silva et al. (1998), o extrato da casca apresentou atividade fungicida contra o fungo fitopatogêno *Cladosporium sphaerospermum* cinco vezes maior do que o

observado para o antifúngico controle nistatina, sinalizando grande potencial da espécie em questão.

Rodrigues et al. (2010) realizaram a investigação farmacológica de extratos etanólicos de folhas e caule de *H. sucuuba* e foi demonstrada atividade analgésica discreta apenas no teste de contorções abdominais para os extratos de folhas e as alterações observadas foram ptose palpebral, sedação e diminuição da atividade motora e alguns sinais de toxicidade, tais como ataxia, piloereção e redução de bolos fecais. De modo geral, foram observadas diminuição da atividade motora em todos os extratos nas diferentes doses analisadas.

Miranda et al. (2000) relatam que testes realizados com frações do látex de *H. sucuuba* foram avaliadas farmacologicamente com vista a verificar a utilização popular como anti-inflamatório no edema de pata de rato induzido por carragenina e nos testes de constrição de rato induzido por ácido acético. Os resultados confirmam que a atividade anti-inflamatória da fração hexânica utilizada está relacionada com os compostos derivados dos triterpenos presentes na espécie. A inibição do edema observado para os derivados triterpeno de *H. sucuuba* foi superior ao descrito na literatura para alguns compostos triterpenos isolados, como o α -amirina (26%) e lupeol (20%) quando avaliada na mesma dose, sendo, portanto, a primeira vez que a atividade anti-inflamatória e analgésica foi relatada para os compostos triterpenicos cinamato, sugerindo que os cinamatos são responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios atribuídos a esta planta.

Estudos farmacológicos demonstram atividade anti-inflamatória, antitumoral, alta toxicidade contra amastigota intracelular de *Leishmaniose amazonensis*, sendo esta atividade atribuída ao iridóide isoplumericina e plumericina presentes no látex de *H. sucuuba* (SOARES, 2010).

Estudos realizados com a decocção das cascas do caule revelaram uma baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas, indicando que seu consumo é seguro para a

espécie humana no tratamento de gastrites e hemorroidas (GUERRA; PETERS, 1991). Perdue; Blomster (1978) testaram o extrato etanólico da casca do caule contra edema induzido por carragenina obtendo resultado positivo para redução da inflamação e ainda, ação farmacológica contra o carcinoma epidermóide humano da nasofaringe.

A toxicidade celular do látex também foi avaliada em ratos em testes de integridade de membrana plasmática e atividade mitocondrial e a administração do látex por via oral apresentou baixa toxicidade para os macrófagos do hospedeiro (SOARES, 2010).

Em contraditório, Paz et al. (2013), em testes com o látex de *H. sucuuba* demonstrou que este, nas diversas concentrações testadas, pode ser considerado como uma mistura complexa de químicos com atividades tóxicas, citotóxicas e mutagênicas, pela frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas em meristemas de raízes de *Allium cepa*, devido a efeitos clastogênicos e aneugênicos. Também foi possível evidenciar genotoxicidade em linfócitos isolados de sangue periférico, pelos índices e frequências de danos ao DNA, sugerindo, que caso não ocorra reparo, existem grandes chances de indução de mutações, que constituem importantes indicativos para o desenvolvimento de neoplasias malignas.

Apesar de haver diversos estudos sobre descrição botânica, aplicação etnofarmacológicas, composição química e propriedades medicinais como anteriormente relatado, não foi encontrado na literatura trabalhos que tenham estudado a comunidade endofítica de *Himatanthus sucuuba*.

2.3 Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que colonizam órgãos vegetais como folhas, pecíolo, flores, frutos, sementes, caules e raízes sem causar danos visíveis aos hospedeiros, ou seja, não desenvolvem sintomas de patogenicidade (AZEVEDO, 1998; SILVA, 2014). Isso inclui todos os microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, sendo

classificados em tipo I, os que não apresentam estruturas externas na planta, e do tipo II, os que produzem estruturas externas, como é o caso dos fungos micorrizos e das bactérias simbiontes fixadoras de nitrogênio (ARAÚJO et al., 2010).

A entrada dos microrganismos na planta hospedeira ocorre através de aberturas naturais presentes nas folhas, como estômatos ou hidatódios, raízes, flores, sementes, lesões causadas por predadores e ainda carregadas por bactérias (AZEVEDO, 1998). Segundo ARAÚJO et al. (2010) a transmissão vertical que ocorre através das sementes estaria associada a processos co-evolutivos da planta com sua comunidade endofítica, podendo passar esses microrganismos e suas características aos seus descendentes.

Quanto à relação dos microrganismos com o hospedeiro, não se pode definir se o patógeno se adaptou as vantagens da planta e se tornou endófito ou se o endófito se torna patogênico quando essa relação com a planta não lhe é favorável, sendo chamados de saprófitos latentes (POLLI et al., 2012). O que se sabe ao certo é que muitos endófitos pertencem ao mesmo gênero dos patógenos de seus hospedeiros (TAHERI et al., 2016) como o endófito *Rickettsia parkeri* isolado de crucífera (AZEVEDO, 1998).

Marques et al. (2010) menciona que é pequena a sobreposição entre patógenos e endófitos e sugere que os patógenos compõem uma pequena fração da microbiota endofítica. A forma com que os fungos endofíticos e patogênicos penetram e se estabelecem nos órgãos vegetais são semelhantes, no entanto, os receptores das plantas ajudam a detectar os fungos patogênicos por mecanismos de defesa.

Isso demonstra que a inoculação de linhagens fúngicas no controle biológico poderá não apenas ser praticada com sucesso, mas que o microrganismo modificado, uma vez inoculado, mantém-se no hospedeiro, podendo prevalecer e até superar linhagens selvagens da mesma espécie e se tornar hereditário (FREIRE et al., 2015).

Fósseis de plantas comprovam associação com os fungos endofíticos há mais de 400 milhões de anos, desempenhando, assim, importante papel na evolução da vida na superfície terrestre (REDECKER et al., 2000). Assim, os endofíticos não apresentam tanta especificidade quanto as plantas hospedeiras. Uma única espécie de endofítico pode se estabelecer em vários órgãos de diferentes plantas, sendo capaz de utilizar diferentes substâncias do hospedeiro e se adaptar a diversas condições climáticas e regiões geográficas (FREIRE et al., 2014).

Diante das adaptações estabelecidas entre os endofíticos e os hospedeiros é comum estudos que avaliam a diversidade de espécies endofíticas presentes nas diferentes espécies vegetais. No Brasil, duas revisões destacam a importância dos endofíticos na proteção de plantas contra insetos pragas e o papel dos endofíticos em plantas tropicais (AZEVEDO *et al.*, 2000; 2002). Mas ainda assim, pouco se conhece sobre a biodiversidade endofítica brasileira e seu potencial bioativo (MARIANO et al., 1997; FREIRE; BEZERRA, 2001; SILVA et al., 2006; GONÇALVES et al., 2013).

A relevância dos endofíticos já foi constatada em inúmeros trabalhos realizados com plantas medicinais e de interesse econômico (SILVA; RONDON, 2013). Na referida comunidade fúngica aproximadamente 51% dos compostos bioativos isolados possuem estrutura química desconhecida (CHAPLA et al., 2013). Entre esses compostos bioativos, os flavonóides se destacam por sua variada atividade fisiológica e farmacológica, como estrogênica, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica, anti-inflamatória, e a bem conhecida ação antioxidante e queladora de íons metálicos (SANTOS et al., 2013)

Diversas outras substâncias de interesse econômico como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides, podem ser utilizados como bioherbicidas, na produção de fármacos, como fitohormônios (ácido indol acético, ácido indol butírico, giberelinas, citocininas, octadecanóides) todos produzidos por bactérias como *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, que oferecem ainda, resistência a

condições de estresse do hospedeiro, e podem ser úteis como vetores em tecnologia do DNA recombinante (ABREU et al., 2010; MUSSI-DIAS et al., 2012; CORREIA et al., 2015).

Diante de todo o histórico promissor dos endofíticos, dos altos índices de resistência microbiana e da necessidade de descoberta de novos antibióticos, os fungos endofíticos podem se revelar tão promissores quanto os fungos de solo (NASCIMENTO, 2015). Tal fato tem aumentado o número de pesquisadores que se dedicam ao estudo de produtos naturais microbianos, principalmente de endofíticos isolados de plantas medicinais, na busca incansável por novos antibióticos que possam ser eficazes nas próximas décadas (BRITO, CORDEIRO, 2012). No Quadro 2 se observa alguns princípios ativos isolados de endofíticos, com suas respectivas atividades biológicas.

Quadro 2. Princípios ativos isolados de fungos endofíticos com atividade biológica.

Planta	Endófito	Substância	Atividade	Referência
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces andreanea</i>	Taxol	Anticancerígena	STIERLE et al., 1993
<i>Artemisia mongolica</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ácido Colletotric	Antibacteriano e antifúngico	ZOU et al., 2000
<i>Betula pendula</i> <i>Betula pubescens</i>	<i>Phomopsis phaseoli</i> <i>Melanconium etulinum</i>	Acido 3-hidroxi propiônico	Nematicida	SCHWARZ et al., 2004
<i>Erythrina crista-galli</i>	<i>Phomopsis</i> spp.	Fomol *Ácido mevendinico	Antifúngica, antibacteriana e *anti-inflamatória	WEBER et al., 2004
<i>Abies holophylla</i>	<i>Xylaria</i> spp.	Griseofulvina	Antibacteriano e antifúngico	PARK et al., 2005
<i>Laurus azorica</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	Cicloepoxilactona e cicloepoxitriol B	Antifúngico, Bactericida e Algicida	HUSSAIN et al., 2009
<i>Licuala spinosa</i>	<i>Xylaria</i> sp.	1a-10a-Epoxy-7a-hydroxyeremophil-11-en-12,8-b-olide	Antimalárico e antifúngico	ISAKA et al., 2010
<i>Cassia spectabilis</i>	<i>Phomopsis cassiae</i>	3,12-Dihydroxy-cadalena	Fungicida e Inibidor da Acetil colinesterase	ZANARDI et al., 2012
<i>Laguncularia racemosa</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	Viriditoxina	Antibacteriano	SILVA et al., 2013

2.4 Resistência microbiana e necessidade de novos antibióticos

Antimicrobianas são substâncias químicas que têm a capacidade de eliminar ou impedir a multiplicação de microrganismos como bactérias, fungos, protozoários e helmintos com o menor efeitos tóxicos para o paciente. Essas moléculas são chamados de antibióticos, quando provenientes de fungos ou bactérias, ou quimioterápicos, quando produzidos de forma sintética, no entanto, o que difere os antibióticos entre si são as propriedades físicas, químicas, farmacológicas, seu espectro e mecanismos de ação (OLIVEIRA et al., 2010).

Segundo Baptista (2013), os antibióticos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, que estão apresentados a seguir:

- ✓ Inibição da síntese da parede celular → impedindo a síntese de peptideoglicano e consequentemente enfraquecendo a parede celular levando a lise da célula bacteriana;
- ✓ Inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática → rompe os fosfolipídios, levando a alterações na permeabilidade da membrana plasmática, deixando escapar substâncias essenciais das células, causando morte celular;
- ✓ Inibição da síntese proteica nos ribossomos → ocorre pela diferença na síntese de proteínas entre as bactérias e as células do hospedeiro, o que permite ação seletiva;
- ✓ Alterações na síntese dos ácidos nucleicos → ligando-se à RNA polimerase dependente de DNA, inibindo a iniciação da síntese de RNA ou se ligando à subunidade A da DNA girase (topoisomerase) e impedindo o superenrolamento do DNA, impedindo assim a síntese de DNA;
- ✓ Alteração de metabolismos celulares → antibióticos que imitam substâncias usadas pela célula bacteriana como o ácido fólico, os antibióticos se ligam as enzimas impedindo a formação de ácido fólico impedindo o crescimento bacteriano.

A resistência aos antimicrobianos ocorre quando estes perdem a capacidade de controlar o crescimento ou morte bacteriana, ou seja, as bactérias encontram um mecanismo para neutralizar o efeito farmacológico. Assim, uma bactéria é considerada resistente a determinado antimicrobiano quando continua a se multiplicar na presença de dosagens terapêuticas (CONRADO et al., 2015).

Esta resistência pode ser natural, que é a resistência intrínseca do microrganismo, e se expressa continuamente sem estímulo externo como resistência à polimixina apresentada pela *Stenotrophomona maltophilia* e a resistência aos β -lactâmicos apresentada pelos Micoplasmas, ou a resistência adquirida, que é produzida pela célula bacteriana quando esta é exposta a um agente indutor, ou quando adquire genes de resistência (SHARMA et al., 2016). É esta forma de resistência que inspiram maiores cuidados, já que é através do aumento da pressão seletiva e da disseminação de genes de resistência dentro de unidades hospitalares que o caos da saúde vem se instaurando nas últimas décadas (LOPES, 2011).

A resistência, no entanto, pode se apresentar por um dos mecanismos descritos a seguir:

- ✓ Inativação ou destruição do antimicrobiano pela enzima β -lactamase \rightarrow a enzima impede que o antimicrobiano entre na célula, se ligue ao sítio alvo ou promova alteração do sítio alvo (LOUREIRO et al., 2016);
- ✓ Bomba de efluxo \rightarrow a droga entra na célula e é rapidamente eliminada comprometendo sua eficácia (NEVES et al., 2011);
- ✓ Mecanismo bioquímico alternativo \rightarrow compreende diversos processos como, alteração química, via enzimática dos antibióticos, alteração celular do local de ação dos antibióticos, alteração da penetração do antibiótico para o interior da célula, superprodução de proteína sensível ao antibiótico interferente, produção aumentada de

um metabólito e ainda, estabelecimento de uma via metabólica alternativa à via metabólica inibida (LOUREIRO et al., 2016).

Diante desta complexidade de mecanismos de resistência, foram criados diversos métodos para a avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos sendo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) o documento de referência utilizado pelos laboratórios brasileiros e adotado pela Rede Brasileira de Monitoramento da Resistência Microbiana, coordenada pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), em cooperação com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), e em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios da Saúde Pública (CGLAB) (SIMONETTI, 2015).

Entre os microrganismos que têm apresentado resistência estão às bactérias gram negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* que fazem parte da família *Enterobacteriaceae* predominantemente causadoras de infecções pulmonares e urinárias, essa família possui duas membranas celulares, sendo a membrana externa produtora de endotoxinas que as tornam virulentas (SANTOS, 2007).

As bactérias gram positivas *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, pertencentes à família *Micrococaceae*, possuem um fator de virulência menor que as gram negativas, mas ainda assim, são grandes causadoras de infecções da corrente sanguínea por estarem associadas a várias doenças (DEL FIOLE et al., 2010).

Considerando a evolução da resistência aos antibióticos nas bactérias Gram-positivas, constata-se que a espécie *S. aureus* e o gênero *Enterococcus* são as bactérias Gram-positivas que apresentam maiores problemas de resistência (HAWKEY, 2008). Na década de 50, espécies de *S. aureus*, apresentaram estirpes produtoras de penicilinas e resistência aos outros antibióticos disponíveis levando à introdução da meticilina e de outras penicilinas semissintéticas (HAWKEY, 2008).

No entanto, pouco tempo depois da iniciação da metilina em 1960, foram isoladas amostras de *S. aureus* resistentes no Reino Unido, o que levou ao aparecimento de estirpes de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), que logo se disseminaram a nível mundial levando a necessidade de novos antibióticos (GRUNDMANN et al., 2006; GOULD, 2008; HAWKEY; JONES, 2009). No Brasil, o início da resistência a Oxacilina para *S. aureus* foi relatada em 1996 (CRUVINEL et al., 2011).

Para compreender melhor esses mecanismos de resistência também são necessários compreender a importância médica e as características básicas da morfologia bacteriana (ZHANG et al., 2016).

Escherichia coli é um importante indicador de contaminação fecal em alimentos e água sendo usado como referência para avaliar a qualidade de higiene. As cepas de *E. coli* implicadas em doenças de origem alimentar podem ser classificadas em cinco grupos: enteropatógenas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC) e facultativamente enteropatógenas (FEEC). As EPEC geralmente não produzem enterotoxinas, mas produzem um fator de aderência e podem causar diarreia (MARTINS, 2007).

Assim, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é a causa principal de diarreia do viajante (DT). Estima-se que este organismo provoca milhões de casos de doenças diarreicas todo ano, principalmente em países em subdesenvolvidos, sendo contraída pelo consumo de alimentos contaminados (LAMPEL et al., 2012).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria comum em ambiente hospitalar, sendo transmitida por contato direto, também está presente em água e alimentos, sendo considerado um enteropatógeno, uma vez que este organismo produz enterotoxinas estável ao calor e termo-lábil (HT e ST). Em alguns casos, a colonização do trato gastrointestinal é a fase inicial de uma infecção sistêmica (LAMPEL et al., 2012).

Streptococcus pneumoniae pode ser encontrada na pele, nas mucosas da boca, trato respiratório e digestivo. São causadoras da fascite necrosante e síndrome do choque tóxico estreptocócico genitourinário de humanos e animais, e em algumas plantas, solo e corpos de água (LAMPEL et al., 2012). É descrito como o microrganismo mais frequentemente envolvido nas otites, meningites sendo responsável por um terço dos cinco milhões de óbitos anuais por pneumonia (LOPES, 2011).

Espécies de *Staphylococcus aureus* são comuns em alimentos devido a contaminação ambiental. Várias espécies de *Staphylococcus* spp. têm a capacidade de produzir enterotoxinas estáveis ao calor, que causam gastroenterite em humanos sendo o agente etiológico predominantemente associada com intoxicação alimentar estafilocócica, tóxico, pneumonia, infecção de ferida pós-operatória. Produzem toxinas extracelulares, que atuam como fatores de virulência (LAMPEL et al., 2012)

Diante da importância médica dessas espécies é notório que as doenças infecciosas continuam a ser a segunda principal causa de morte no mundo, principalmente as infecções bacterianas que afetam principalmente crianças e idosos, o que levanta um alerta mundial da Organização das Nações Unidas sobre novas pesquisas e uso racional destes fármacos (BISSON, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Análise de diversidade e atividade antibacteriana de metabólitos de fungos endofíticos de *Himatanthus sucuuba*.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Caracterizar a diversidade de fungos endofíticos presentes em folhas e caule de *Himathanthus sucuuba*;

3.2.2 Avaliar a atividade antibacteriana de metabólitos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Himathanthus sucuuba* frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de material botânico e herborização

Para o estudo de fungos endofíticos de *Himatanthus sucuuba* foram selecionados três indivíduos de forma aleatória em regiões distintas do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre. A coleta dos caules e folhas foi realizada nas primeiras horas da manhã, foram selecionados ainda, órgãos vegetais no período de florescimento para a identificação no herbário da UFAC. Os três indivíduos coletados foram confirmados como pertencentes à espécie *Himatanthus sucuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson e estão depositados no herbário da Universidade Federal do Acre sob o número de registro 22.001 de janeiro de 2016. As informações dos indivíduos coletados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados dos indivíduos de *Himatanthus sucuuba* coletados para isolamento de fungos endofíticos.

Identificação	Coordenadas UTM	Característica do local	Data da coleta
Indivíduo I	(19L 0623393 UTM8899654)	Área de campo aberto próximo à mata fechada	Janeiro de 2015
Indivíduo II	(19L 0624145 UTM8899952)	Área de campo aberto	Março de 2015
Indivíduo III	(9L 0623845 UTM8899265)	Área de mata fechada	Abril de 2015

UTM= Sistema Universal Transverso de Mercator

4.2 Preparo dos meios de cultura

No laboratório de Microbiologia foram selecionados caules e folhas livres de afecções por pragas, sendo uma parte destinada ao preparo dos meios com extrato e a outra acondicionada em sacos plástico e mantida sob refrigeração a 4 °C por 24 horas para o isolamento dos endófitos.

Para o isolamento foram utilizados os meios de cultura Batata-Dextrose-Ágar-BDA (infusão de 200g de batata em 1000 mL de água destilada, 15g de Ágar, 20g de Dextrose) e o meio Sabouraud-Dextrose-Ágar-SAB (15g de Ágar, 40g de Dextrose, 10g Peptona para 1000

mL de água destilada), com e sem extrato vegetal na proporção de 10%. Para o preparo do extrato foram utilizados 100g de órgãos vegetais (caule/folha) que foi triturado em liquidificador doméstico com 500 mL de água destilada e filtrado em papel de filtro. Para preparação do meio BDA+extrato foi acrescido 500 mL de infusão de 200g de batata ao extrato obtido, e para preparação do meio SAB+extrato 500 mL de água e nestes solubilizados os reagentes utilizados na preparação de cada meio (CARVALHO, 2005). À todos os meios foram adicionados o antibiótico cloranfenicol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a fim de evitar o crescimento de bactérias. Os meios de cultivo foram aquecidos para completar a fusão do ágar, autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos, distribuídos em placas de petri e incubados por 24 horas em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para o teste de esterilidade (LACAZ et al., 1991).

4.3 Isolamento de fungos endofíticos de *Himatanthus sucuuba*

Após 24 horas sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, as folhas e caules foram submetidos a desinfecção superficial, por imersão em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2-2,5% por 3 minutos, e novamente em álcool 70% por 30 segundos e por fim, lavados em água destilada esterilizada por duas vezes, da qual se retirou $200 \mu\text{L}$ da água de lavagem para o controle da desinfecção onde, foram inoculados nos meios de cultura conforme Figura 2 (ARAÚJO, et al., 2010).

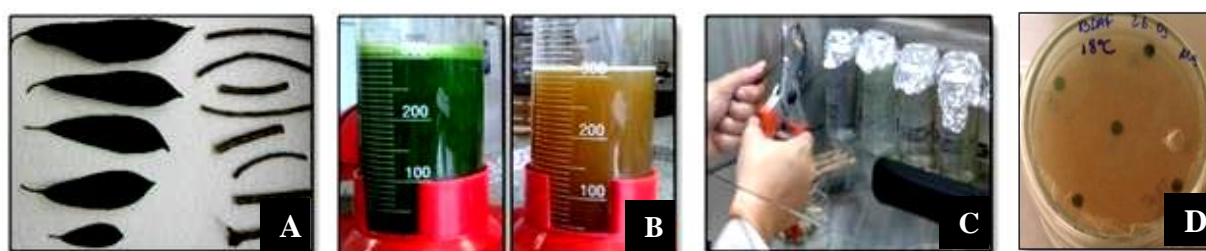


Figura 2. Etapas para isolamento dos fungos endofíticos de *H. sucuuba*. (A) Folhas e caules; (B) extrato de folha e caule; (C) Desinfecção e fragmentação de folha e caule; (D) Inoculação de fragmentos de folha em meio BDA.

As folhas foram cortadas em discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro com auxílio de um furador esterilizado e os caules foram seccionados em corte transversal de aproximadamente 0,5 cm, com uso de tesoura de poda, e retiradas as cascas com auxílio de

bisturi. Em seguida foram inoculados 5 fragmentos de caule ou folha por placa, em cada um dos quatro tipos de meios de cultura preparados. Após a inoculação dos fragmentos, as placas foram incubadas a 18 °C e 28 °C por no máximo 30 dias (ARAÚJO et al., 2010).

A partir do terceiro dia, visto crescimento de fungos endófitos, estes foram codificados e registrados no livro do Laboratório de Microbiologia da UFAC. Em seguida, as colônias foram purificadas em meio BDA com o antibiótico cloranfenicol (100 µg mL⁻¹), seguindo a técnica de estria por esgotamento e incubados a temperatura ambiente (ARAÚJO et al., 2010).

As colônias purificadas foram transferidas para tubos de referência contendo BDA inclinado. Os procedimentos foram realizados dentro de capela de fluxo laminar, com auxílio de alça de platina flambada. Após esse procedimento, foram mantidos a temperatura ambiente para realização das demais etapas experimentais.

Os fungos endófitos obtidos foram preservados mediante duas técnicas imersão em óleo mineral, onde os fungos foram transferidos para frascos tipo penicilina contendo BDA e após seu crescimento foram cobertos com óleo mineral esterilizado e vedados. Também foram armazenados pelo Método de Castellani, onde os fungos foram repicados em placa de petri contendo meio BDA e após crescimento das colônias foram cortados 10 fragmentos de 5x5mm, imersos em frascos contendo água destilada esterilizada e preservados em temperatura ambiente na coleção de referência do Laboratório de Microbiologia da UFAC, conforme Figura 3 (LACAZ et al., 1991; ARAÚJO et al., 2010).

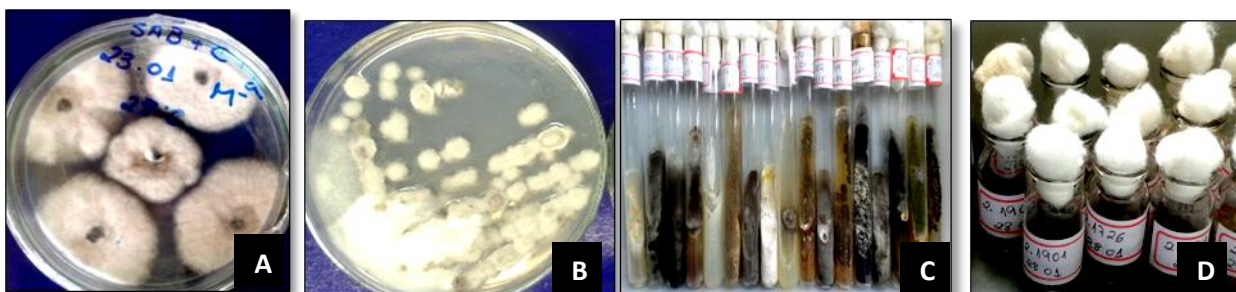


Figura 3. Procedimentos de purificação e armazenamento dos fungos endófitos de *H. sucuuba*. (A) Crescimento em meio BDA; (B) Purificação pela técnica de estria por esgotamento; (C) Tubos com fungos de referência; (D) Preservação dos fungos por imersão em óleo mineral e Método de Castellani.

4.4 Identificação taxonômica dos fungos endofíticos

Para agrupamento em táxons os isolados fungicos de *H. sucuuba* foram analisados quanto às seguintes características macroscópicas das colônias: cor, forma, pigmentação e difusão, superfície, consistência, textura e crescimento. A análise micromorfológica foi feita utilizando o Método de Riddel (1950) que consiste no cultivo do fungo em lâmina, coloração com solução de azul de lactofenol e observação das estruturas em microscópio. Na Figura 4 podem ser observadas as características do micélio vegetativo e reprodutivo para agrupamento dos diferentes táxons (LACAZ et al., 2002). Os resultados da análise micromorfológica foram comparados com literatura específica para identificação em nível de gênero (BARNETT; HUNTER, 1972; LACAZ et al., 1998).

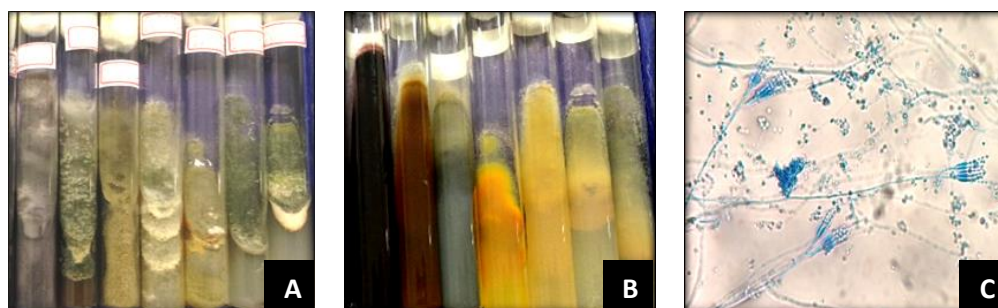


Figura 4. Caracterização macro e micromorfológica de fungos endofíticos de *H. sucuuba*. (A) Macromorfologia do micélio; (B) Produção de pigmento difuso; (C) Micromorfologia do micélio reprodutivo.

4.5 Produção de extratos metabólitos de fungos endofíticos de *Himatanthus sucuuba*

Para produção dos extratos metabólitos, um indivíduo de cada táxon foi repicado a partir do tubo de referência em placa contendo BDA e incubado a 28 °C por 14 dias. Após este período, 10 fragmentos medindo aproximadamente 5x5mm foram transferidos para erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio líquido Batata-Dextrose-BD (1000 mL de infusão de 200g de batata, 20 g de Dextrose). As amostras foram incubadas por 14 dias a 28

°C sem agitação, e após esse período 2 mL do caldo metabólitos foram retirados e armazenados em eppendorf e mantidos a -20 °C.

Para produção dos extratos metabólitos, os 2 mL de caldo metabólito foram extraídos por partição líquido-líquido com 1 mL de acetato de etila por duas vezes, e o solvente evaporado em estufa a 37 °C por 24 horas. O extrato obtido foi ressuspenso em 300µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para realização dos bioensaios (Figura 5).

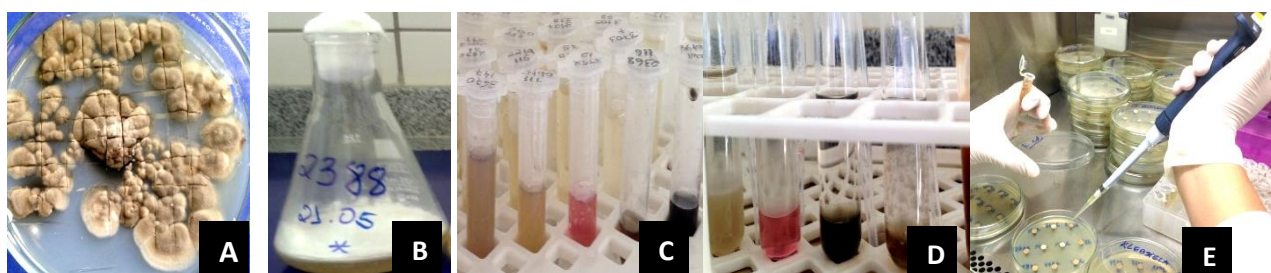


Figura 5. Procedimentos para produção de extratos metabólicos de fungos endofíticos de *H. sucuuba*. (A) Crescimento fúngico em meio BDA; (B) Fermentação em meio BD; (C) Caldo com metabólitos fúngicos; (D) Extração dos metabólitos fúngicos com acetato de etila; (E) Bioensaio de atividade antibacteriana.

4.6 Bioensaio de atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana foi utilizado o teste de difusão em disco, (NCCLS, 2003), utilizando como microrganismos-teste as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603).

As bactérias foram inoculadas pela técnica de estrias por esgotamento em meio de cultivo Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, foram transferidas 3 colônias isoladas para tubo contendo 5mL de caldo Luria-Bertani – LB (10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio, 15 g de ágar, 1000 mL de água destilada) e incubados de 4-6 horas à 37 °C. Em seguida foi ajustada a turbidez das bactérias para escala

0,5 de McFarland que equivale à aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

A suspensão bacteriana foi inoculada com auxílio de swab em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Müller-Hinton desenvolvido para realizar testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Sobre o meio com o inóculo, foram depositados discos de papel esterilizados de 5 mm de diâmetro e sobre estes, 20 µL do extrato fúngico e armazenadas em geladeira por 2 horas para permitir a difusão do extrato no meio de cultivo. Após este período, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e então realizada a leitura do teste, sendo considerada amostra com atividade antibacteriana positiva aquela que formou halo de inibição, sendo estes quantificados medindo-se o diâmetro do halo com auxílio de régua para antibiograma. Para cada amostra foram realizadas três repetições (NCCLS, 2003).

4.7 Frequência de isolamento, análise de diversidade, riqueza e Equitabilidade de Fungos endofíticos de *H. succuba*

A Frequência de isolamento (FI) de fungos endofíticos de *H. succuba* foi calculada em termos percentuais sendo utilizada a fórmula:

$$\frac{FI - Ni \times 100}{N}$$

FI= Frequência de isolamento fúngico

Ni= Número de fragmentos com crescimento fúngico

N=Número total de fragmentos inoculados

A análise de diversidade fúngica de *H. succuba* foi calculada com base no número de espécies dominantes utilizando o Índice de Shannon e Índice de Simpson. A diversidade compõe-se de dois elementos principais: o número ou a variabilidade de espécies e a abundância relativa dos indivíduos (MAGURRAN, 1983).

Dentro do grande número de métodos diferentes, existem três tipos básicos de índices: índices que se baseiam na variabilidade de espécies, índices que se baseiam na abundância relativa dos indivíduos e índices que combinam ambos os fatores (MAGURRAN, 1983).

A riqueza de espécies é o número total de espécies (S) em uma unidade amostral. Logo, a riqueza de espécies é muito dependente do tamanho da amostra, quanto maior a amostra, maior o número de espécies que poderão ser encontradas. Assim, a riqueza de espécies aumenta em função da área, mesmo sem modificação do habitat (GOMES, 2004).

A Equitabilidade se traduz a maneira pela qual o número de indivíduos está distribuído entre as diferentes espécies, isto é, indica se as diferentes espécies possuem abundância (número de indivíduos) semelhantes ou divergentes. Quanto maior a equitabilidade menor a dominância e vice-versa (GOMES, 2004).

A diversidade é uma função do número de espécies e da equitabilidade dos valores de importância da mesma (GOMES, 2004).

Assim, para o cálculo do Índice de diversidade Shannon foi utilizada a fórmula:

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

onde p_i é a frequência de cada espécie, para i variando de 1 a S (Riqueza). Este índice considera a quantidade de espécies e a espécie dominante. Os valores do índice de Shannon variam de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a equitabilidade, isto é, todas as espécies são igualmente abundantes, isto indica que, quanto maior a dominância menor será a diversidade (SCOLFARO et al., 2008).

O cálculo da Dominância de Simpson foi dado pela fórmula:

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

onde, n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de todas as espécies. Leva em conta o número de espécies presentes e a abundância de cada espécie. O

valor estimado de D pode variar de 0 a 1, sendo que 1 representa o máximo de diversidade. Este índice fornece a ideia da probabilidade de se coletar aleatoriamente dois indivíduos da comunidade e, obrigatoriamente, pertencerem à mesma espécie (FREITAS et al., 2002). Sendo assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância. Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança. Os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (RYAN et al., 2001).

O Índice de Evenness é o grau de homogeneidade de distribuição ou a taxa percentual da distribuição máxima denominado de Equitabilidade (Eveness) e foi calculada pela fórmula:

$$E = \left(\frac{H'}{\ln S} \right) * 100$$

Dessa forma, em povoamentos de apenas uma espécie, $H' = 0$ (ausência total de estrutura do sistema, no sentido teórico de informação). H' atinge seu máximo quando todas as espécies se encontram regularmente distribuídas (máximo de homogeneidade estrutural) (FUKAREK, et al., 1994). Assim sendo, $H'_{max.} = \ln S$ (onde S = número total de espécies). Quando $E = 100$, a distribuição das espécies atingiu seu nível máximo. Assim, quanto maior a dominância de uma ou poucas espécies, mais baixo será o valor de Evenness.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade de Fungos endofíticos de *Himathantus sucuuba*

Foram isolados 628 fungos endofíticos de *Himathantus sucuuba*. A análise da frequência de isolamento dos fungos demonstram baixo índice de perdas, tendo sido perdido três fragmentos de folha e quatro de caule, do indivíduo I, e três fragmentos de caule do indivíduo II, impossibilitando o isolamento de fungos endofíticos destes. Com base nos fragmentos com crescimento e no número de fragmentos inoculados, foi possível calcular a frequência de isolamento (FI), (Tabela 2).

Tabela 2. Local de coleta e frequência de isolamento de fungos endofíticos de *H. sucuuba*.

Características	Indivíduo		
	I	II	III
Local de coleta PZ*	Próximo à floresta	Campo aberto	Protegida pela floresta
Fragmentos inoculados	160	160	160
Fragmentos com crescimento	153	157	160
Nº total de isolados	176	184	268
Frequência de isolamento %	95,62%	98,12%	100%

* Parque Zoobotânico – UFAC

Os três indivíduos coletados tiveram baixo índice de perda de fragmentos por contaminação e por falta de crescimento fúngico, sendo os resultados obtidos semelhantes aos encontrados para as espécies *Piper glabratum* Kunth, (caapeba) com frequência de isolamento de 98% (OLIVEIRA et al., 2015), *Piper marginatum* Jacq (pariparoba) que teve frequência de 99,52% em folha, 92,38%, em caules e 74,28% em raízes (ARAÚJO et al., 2009), *Glycine max* (L.) Merrill (soja) com frequência de 100% (WENZEL et al., 2012). Entretanto, nem sempre essa frequência é alta, como pode ser observado no trabalho de Costa-Neto (2010), por exemplo, no isolamento de fungos endofíticos da palmeira tropical *Bactris gasipaes*

(Kunth) (pupunheira) que obteve apenas 23,9% de frequência de isolamento. Tal fato sugere que a frequência de isolados, bem como as espécies de fungos isoladas pode ser variável dependendo das plantas investigadas (MAGALHÃES et al., 2008).

O indivíduo III se destacou em relação à quantidade de endófitos com relação aos outros dois indivíduos analisados, podendo este fato estar relacionado ao local onde este estava estabelecido na floresta, cuja localização se caracterizou como floresta densa, em ambiente úmido e sombreado por outras árvores. Os outros dois indivíduos estabeleceram-se em locais abertos com maior incidência luminosa e aeração. Tal fato assemelha-se ao estudo realizado com *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Erva mate), a qual apresentou maior taxa de colonização fúngica, entre plantas nativas que estavam estabelecidas em ambiente úmido e sombreadas (PIMENTEL et al., 2006). Acredita-se, também, que os agentes transmissores de fungos endofíticos sejam mais atuantes na floresta densa, sob uma condição protegida de predadores e das condições ambientais adversas (AZEVEDO et al., 1999).

Outro fator interferente é a influência de fatores bióticos e principalmente abióticos como, quantidade de luz, temperatura, vento e umidade do local, que propiciam uma maior colonização dos endofíticos. Os indivíduos I e II, estabelecidos em local aberto, contiveram quantidade de isolados semelhante. Esta diferença quando comparada com o indivíduo III pode ser devido à exposição da folha à luminosidade, pois a intensidade e período de exposição pode influenciar diretamente na população de fungos endofíticos, organismos sensíveis à radiação solar (FELBER; PAMPHILE, 2013). Outro fator que pode estar relacionado é a idade de cada planta e o tempo que a espécie leva para ser completamente colonizada (NASCIMENTO, 2010).

Além das condições ambientais em que os indivíduos amostrados se encontram na natureza, o órgão vegetal, a temperatura de isolamento e o meio de cultivo também podem influenciar na frequência de isolamento, e os resultados do presente trabalho comprovam isto, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Fungos endofíticos isolados de *Himatanthus sucuuba* de acordo com o órgão vegetal, meio de cultura e temperatura de isolamento.

Órgão Vegetal	T	Meio de Cultura				Total
		BDA	BDA + extrato	SAB	SAB + extrato	
Folha	18 °C	47 Isolados 24 Táxons: 10 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Geotrichum</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 8 M.E.	42 Isolados 22 Táxons: 4 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Paecilomyces</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 2 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp. 11 M.E.	43 Isolados 19 Táxons: 6 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Cylindrocladium</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 11 M.E.	35 Isolados 22 Táxons: 6 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 11 M.E.	167
	28 °C	39 Isolados 21 Táxons: 7 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 3 <i>Phomopsis</i> sp. 9 M.E.	46 Isolados 29 Táxons: 1 <i>Aspergillus</i> sp. 1 <i>Cladosporium</i> sp. 11 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 11 M.E.	53 Isolados 29 Táxons: 1 <i>Acremonium</i> sp. 12 <i>Colletotrichum</i> sp. 3 <i>Guignardia</i> sp. 3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Trichoderma</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp. 7 M.E.	30 Isolados 20 Táxon: 7 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 1 <i>Guignardia</i> sp. 2 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Trichoderma</i> sp. 7 M.E.	
Caulé	18 °C	36 Isolados 26 Táxons: 1 <i>Cladosporium</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 2 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Phoma</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp. 16 M.E.	29 Isolados 23 Táxons: 1 <i>Penicillium</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 2 <i>Xylaria</i> sp. 16 M.E.	45 Isolados 32 Táxons: 1 <i>Cladosporium</i> sp. 1 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 2 <i>Phomopsis</i> sp. 4 <i>Xylaria</i> sp. 23 M.E.	32 Isolados 27 Táxons: 1 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 2 <i>Penicillium</i> sp. 4 <i>Phomopsis</i> sp. 2 <i>Xylaria</i> sp. 17 M.E.	142
	28 °C	36 Isolados 25 Táxons: 3 <i>Penicillium</i> sp. 6 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Xylaria</i> sp. 15 M.E.	31 Isolados 24 Táxons: 1 <i>Colletotrichum</i> sp. 3 <i>Penicillium</i> sp. 3 <i>Xylaria</i> sp. 17 M.E.	60 Isolados 44 Táxons: 1 <i>Colletotrichum</i> sp. 2 <i>Curvularia</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. 5 <i>Phomopsis</i> sp. 1 <i>Trichoderma</i> sp. 2 <i>Xylaria</i> sp. 30 M.E.	24 Isolados 16 Táxons: 1 <i>Colletotrichum</i> sp. 1 <i>Fusarium</i> sp. 1 <i>Phomopsis</i> sp. 2 <i>Xylaria</i> sp. 11 M.E.	
Total		158	148	201	121	628

T=Temperatura; M.I. = Micélio Estéril não produz esporos durante a fase vegetativa, ou seja, não forma esporos assexuados.

Houve uma maior quantidade de isolados fúngicos em folha, com 335 (53,3 %) e 293 (46,7 %) em caule. Esta observação é relatada em estudos de diversidade e bioprospecção onde diversos autores apontam as folhas como a estrutura vegetal mais utilizada para a obtenção de fungos endofíticos (MOREIRA, 2013). Um maior número de fungos endofíticos isolados de folha também foi observado em *Phthirusa pyrifolia* Kunth (erva de passarinho) (PAES et al., 2014), *Gossypium* sp. (algodão-de-malta) (VIEIRA, 2010), *Piper hispidum* Kunt (jaborandi) (OLIVEIRA et al., 2014) e *Eugenia jambolana* Lam (Jambolão) (YADAV et al., 2016).

Este fato reforça que as folhas são as principais entradas para microrganismos endofíticos, isto ocorre devido à presença de estômatos e hidatódios, aos quais são aberturas naturais das folhas que permitem essa entrada (AZEVEDO, 1999). Apesar da folha ser considerada a principal entrada dos endófitos na planta estes podem migrar para outros órgãos dependendo da espécie que os abriga, das condições próprias de cada estação e variação nutricional de cada órgão conforme a idade da planta (SIQUEIRA, 2008).

Neste estudo, os meios de cultivo sem extrato obtiveram maiores quantidades de isolados, sendo o Sabouraud o meio que predominou, com 201 (32 %) isolados. No trabalho de Bastos et al. (2004) com endofíticos da *Platanus orientalis* L (plátano) com BDA e Sabouraud, este não identificou diferença significativa para o total de isolados quando utilizados os dois meios, porém, para alguns fungos a variação dos meios foi significativa, como pode ser visto na Tabela 3 com os fungos *Acremonium* sp., *Cylindrocladium* sp. e *Phoma* sp. Barbosa (2015) também utilizou dois meios de cultivo para isolamento, BDA acidificado e meio Sabouraud, e obteve 39 fungos de caule, folha e pecíolo da espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Cheirosa) mas não relata, qual dos dois apresentou maior frequência de isolamento.

O segundo meio com maior índice de isolamento foi BDA com 158 (25,15 %) sendo a o meio de cultivo mais utilizado nos trabalhos de isolamentos de fungos endofíticos consultados. No trabalho de Assunção (2010) utilizando BDA isolou 751 fungos de *Musa* spp. (bananeira), Martínez et al. (2016) também com BDA isolou 546 fungos provenientes de *Pinus radiata* (pinheiro). Dessa forma, apenas uma condição nutricional pode não possibilitar a expressão de toda a diversidade fúngica existente na planta.

Neste estudo os dois meios acrescido de extrato de folha foram responsáveis por 153 (24,4 %) dos isolados e acrescidos de extrato de caule por 116 (18,47 %) dos isolados. Apesar dos meios suplementados com extrato terem sido menos expressivos quanto ao número de fungos isolados, ainda assim apresentaram bons resultados sendo responsáveis pelo isolamento de 42,83% dos fungos. Posteriormente, estudos com extratos de plantas como suplementação aos meios de cultura podem ser objeto de investigação mais específicos para definição de concentração e outros testes que comprovem se estes mantem ou não as condições nutricionais apresentadas naturalmente na planta hospedeira.

Outro fator relevante para este tipo de trabalho é a temperatura. Sendo que grande parte dos isolamentos utiliza temperatura entre 28 °C a 37 °C embora, Azevedo et al. (2002) também sugira isolamentos em temperaturas mais baixas como 18 °C para possibilitar o crescimento de fungos menos frequentes e de crescimento mais lento, possibilitando desta forma uma maior representação da comunidade endofítica.

Deste modo, aplicando duas temperaturas para isolamento foram obtidos 319 (50,79 %) isolados a 28 °C e 309 (49,20 %) isolados a 18 °C. Observa-se que a temperatura de 28 °C foi a melhor em termos de isolamento para *H. succuba*, apesar da diferença ser pouco significativa. Estes resultados corroboram os de Pimentel et al. (2006), que trabalhando com a espécie *Ilex paraguariensis* (erva-mate) em duas temperaturas (28 e 25 °C), verificou o maior

número de isolados à 28 °C. Diversos outros autores também escolheram 28 °C como temperatura padrão para seus isolamentos por ser uma média de temperatura com boas condições de desenvolvimento para a maioria dos fungos já isolados como endofíticos (MUSSI-DIAS et al., 2012, FREIRE et al., 2015, SALINE et al., 2015, SHWETA et al., 2015).

Assim, é possível notar que as diferentes condições ambientais e nutricionais são importantes para expressão da diversidade de fungos endofíticos, sendo que alguns gêneros apresentaram preferência por determinado meio ou condição ambiental que podem ser semelhantes à do hospedeiro.

No presente estudo foram isolados 628 fungos endofíticos, estes foram organizados em 259 táxons e analisados quanto a características macro e microscópicas pela análise das estruturas como forma da colônia, difusão de pigmento, crescimento, estruturas reprodutivas como tamanho e forma dos conídios, sendo identificados 135 (52,12 %) táxons, pertencentes a 16 gêneros como apresentado na Figura 6.

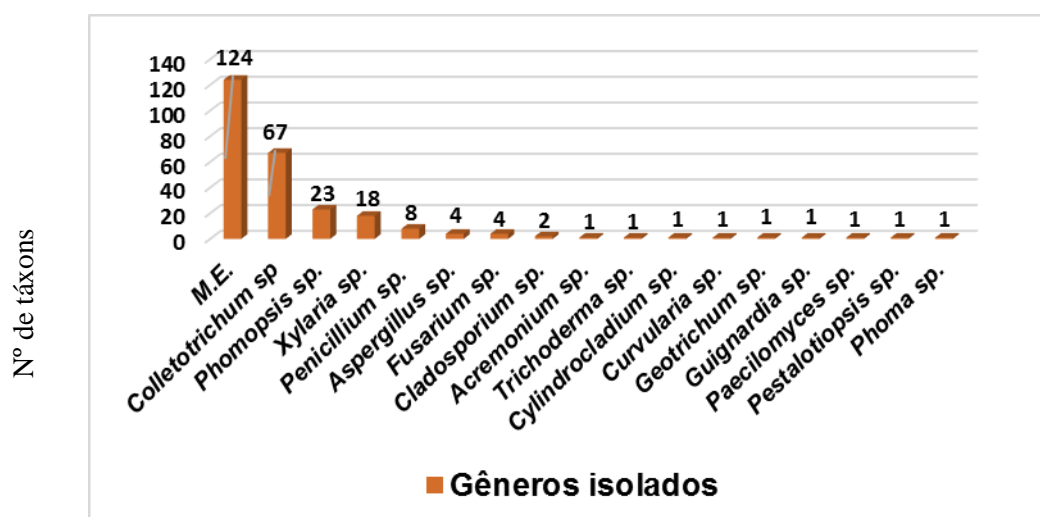


Figura 6. Frequência de isolamento de fungos endofíticos de *Himatanthus sucuuba*. M.E. = Micélio estéril.

A identificação dos fungos endofíticos em nível de espécie não é fácil, devido à carência de especialistas em taxonomia e de literatura recente, portanto, os isolados que apresentaram estruturas reprodutivas, foram classificados após observação dos aspectos macro e micro morfológicos, até o nível de gênero. No entanto, 124 (47,87%) dos táxons obtidos não foram identificados por essa técnica por não terem produzido estruturas reprodutivas, apenas micélio estéril o que impossibilita sua classificação. Dentre estes ainda houve perda de 19 (7,33 %) táxons contaminados antes de serem identificados. A característica macromorfológica de fungos endofíticos de *H. sucuuba* podem ser observados na Figura 7.

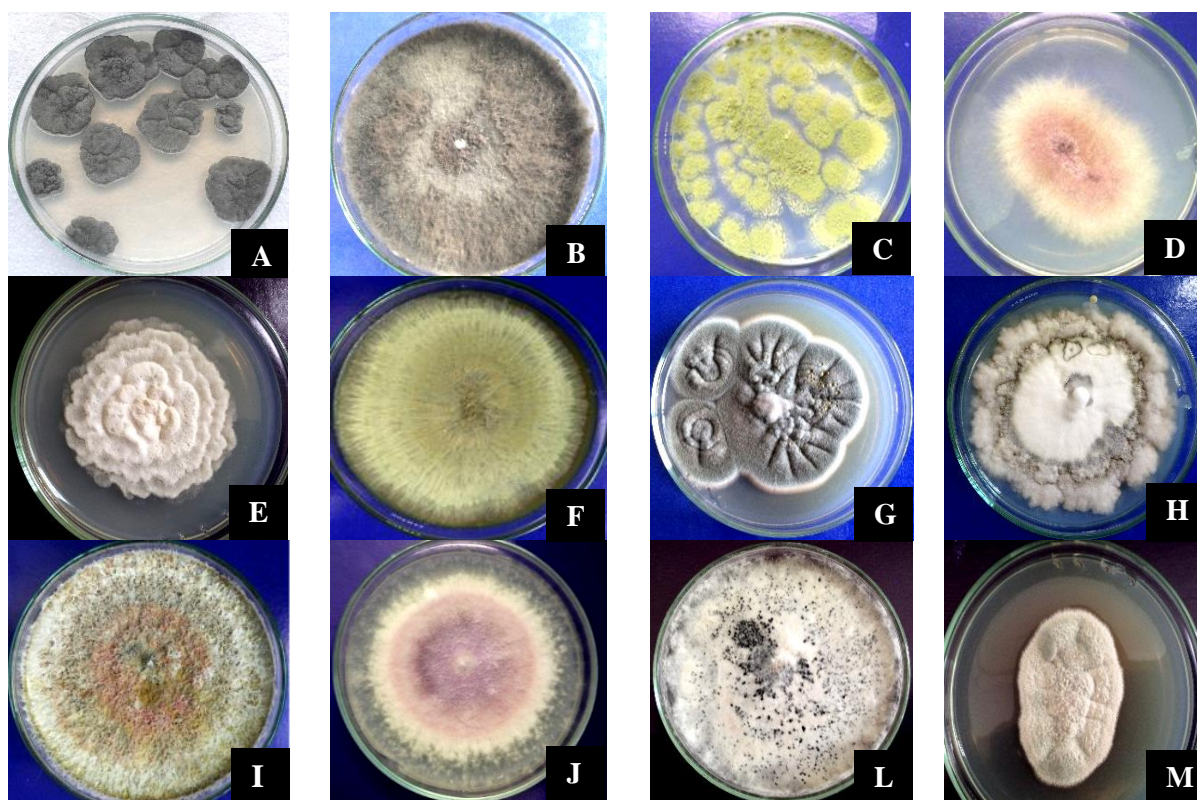


Figura 7. Diversidade de fungos endofíticos isolados de caule e folha de *H. sucuuba*. (A) *Guignardia* sp. (B) *Colletotrichum* sp. (C) *Aspergillus* sp. (D) *Fusarium* sp. (E) M.E.; (F) M.E.; (G) *Penicillium* sp. (H) *Xylaria* sp. (I) M.E.; (J) *Fusarium* sp. (L) *Pestalotiopsis* sp. (M) M.E.

M.E.= Micélio estéril

Fonte: Arquivo pessoal.

Diante dessas dificuldades de identificação Passarini (2013) diz que nenhum dos métodos isolados tem sido aceito como ideal para identificação de microrganismos e recomenda a utilização da taxonomia polifásica (micro e macromorfologia, fisiologia, metabólitos produzidos e dados moleculares) sugerindo que um conjunto de técnicas amplia o conhecimento para uma melhor e maior classificação da diversidade fúngica. Essa abordagem polifásica não é recente já tendo sido relatada por Colwell (1970) (STRALIOTTO; RUMJANEK, 1999; FENSELAU; DEMIREV, 2001; HONG et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011).

Para minimizar o índice de fungos não identificados Maia (2015) utilizou as características morfológicas e amplificação de DNA para uma melhor caracterização em nível de espécie obtendo bons resultados. Nesse sentido, se confirma que a aplicação de duas ou mais técnicas oferecem maior segurança na identificação fúngica (SANTOS, 2013), de modo que, a aplicações dessas técnicas poderiam ter ampliado a caracterização dos fungos de *H. succuba* no presente trabalho, ainda assim, essa elucidação pode ser explorada em novos trabalhos com a espécie.

Independente da técnica de identificação o número de endofíticos pode variar de acordo com a espécie vegetal, o local onde o endófito se instala e a fase de desenvolvimento da planta. Sendo comum um ou mais gêneros de endofíticos predominarem em um hospedeiro, enquanto outros se apresentam em menor frequência de colonização (FELBER; PANPHILE, 2013).

Dos gêneros identificados *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e *Xylaria* demonstraram caráter generalista quanto ao órgão vegetal estudado, temperatura de isolamento e a maioria dos meios utilizados, sendo *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp. os que ocorreram com maior frequência, conforme Tabela 3.

O gênero *Colletotrichum* sp. esteve presente nos três indivíduos e em todas as estruturas vegetais. Esta frequente ocorrência pode estar relacionada com a fácil disseminação desse fungo. As plantas estão sujeitas a este gênero fúngico em todas as fases de desenvolvimento, e este pode ser transmitido de uma planta para outra por meio do vento, e também as sementes podem infectar as plântulas (MENEZES, 2013).

O gênero *Colletotrichum* é um dos gêneros mais isolados, sendo comumente relatado por autores em estudo de diversidade de endofíticos (SOUZA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; PIMENTEL et al., 2006). Este é frequentemente associado à antracnose, sendo a principal doença em frutos pós-colheita (SERRA; SILVA et al., 2004), podendo causar a podridão mole que afeta a comercialização dos frutos (LIMA-FILHO et al., 2003).

Apesar disso, certos endofíticos que causam patogenicidade podem não causar estes efeitos em outra espécie (AZEVEDO et al., 1999), como foi o caso de *H. sucuuba*. Geralmente, os fungos endofíticos encontrados tornam-se patogênicos à planta apenas quando a mesma é submetida a algum tipo de estresse. Este estresse causa desequilíbrio no metabolismo da planta, seja por causa ambiental ou mesmo por práticas culturais mal realizadas, podendo ocorrer desequilíbrio na microbiota endofítica, favorecendo estes como fitopatógenos ou aumentando a ação destes (MUSSI-DIAS et al., 2012).

O gênero *Phomopsis* sp. conta com mais de 1.000 espécies, e se apresentam como parasita atingindo várias espécies de plantas. Estes provocam sintomas de murchas, necroses, cancrios, podridões, seca de hastes e ramos, entre outras patologias, podendo levar a morte da planta (CAETANO, 2010). Causam severas doenças na cultura da soja como cancro da haste causando a seca do caule e da vagem, influenciando na qualidade e na quantidade da produção de grãos. Várias espécies podem ser saprofíticas, enquanto outras são endofíticas, tornando-se patogênicas quando o hospedeiro se encontra debilitado (KRUPPA et al., 2012).

Xylaria sp. ocorreu em todos os meios e temperaturas, este gênero é descrito como fungo decompositor de madeira, com características saprofíticas (BAYMAN, 1998), tendo sido o gênero mais isolado em *Casuarina equisetifolia*, *C. equisetifolia* e *M. Bidentata* (PARK et al., 2005). Há relatos que *Xylaria* sp. é isolada de plantas tropicais com maior frequência do que de plantas de clima temperado (PHOTITA et al., 2001) o que corrobora com os resultados obtidos em *H. sucuuba*.

De forma geral, os gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Xylaria* isolados de *Piper marginatum* (ARAÚJO et al., 2009) também foram isolados de *H. sucuuba* ratificando que estes são isolados com frequência.

Alguns fungos demonstram especificidade sendo isolados somente em um órgão, como os gêneros *Guignardia*, *Aspergillus*, *Acremonium* e *Paeciloyces* que apresentaram especificidade para folha. Esta maior especificidade também pode estar relacionada à boa adaptação aos compostos químicos (fenóis, poli fenóis, flavonóides, alcalóides) existentes nas folhas (SANTOS et al., 2013), pela condição nutricional e pela facilidade de competição direta com as substâncias de defesa da planta, ou seja, liberação de toxinas em uma eventual necessidade de se converter a fitopatogênico. A Figura 8 apresenta a micromorfologia de fungos endofíticos de *H. sucuba*.

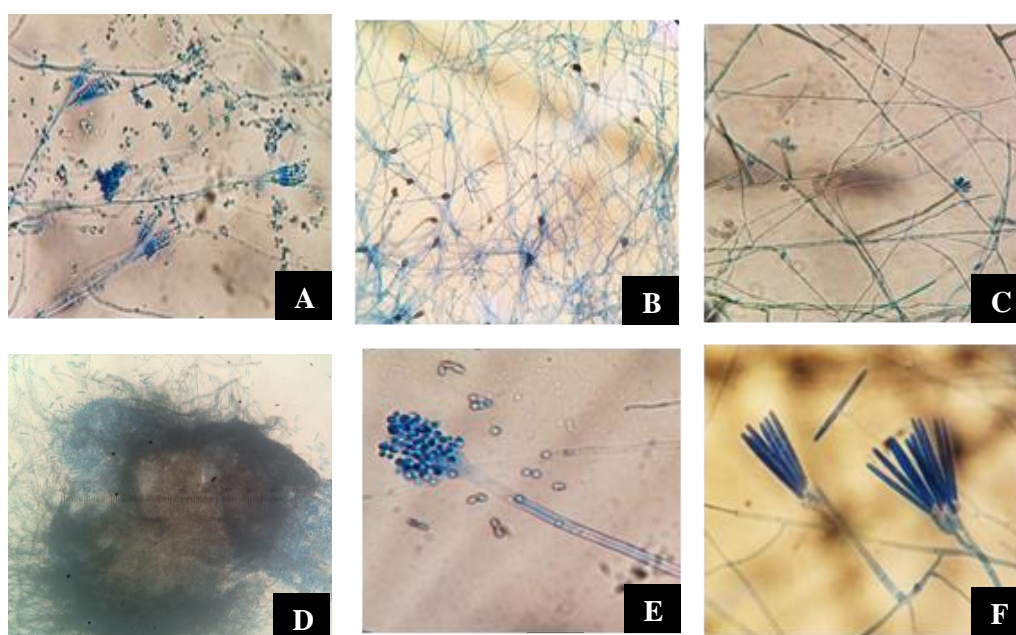


Figura 8. Micromorfologia de fungos endofíticos de *H. sucuba*. (A) *Penicillium* sp.; (B) *Colletotrichum* sp.; (C) *Cladosporium* sp.; (D) *Phoma* sp.; (E) *Aspergillus* sp.; (F) *Cylindrocladium* sp.

Fonte: Arquivo pessoal.

A análise de diversidade foi calculada pelos índices de Shannon, Simpson e Evennes. Estes índices revelam a Riqueza, Equitabilidade e Diversidade das espécies na comunidade, e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Índice de diversidade de fungos endofíticos de *H. sucuba*.

Espécie	Índices		
	Shannon-H	Simpson- D	Evennes -e ^{H/S}
<i>H. sucuba</i>	3,87	0,916	0,345

Considerando os índices calculados neste estudo os valores encontrados revelam que existe riqueza na comunidade endofítica de *Himatanthus sucuuba*, estes também demonstram alta equitabilidade e baixa dominância, significando uma alta diversidade na comunidade de fungos endofíticos de *H. sucuuba* (GOMES; FERREIRA, 2004; MOREIRA, 2013). Poucos trabalhos com isolamento de endofíticos aplicam índices de diversidade, no entanto Zhang et al. (2014) comparando a composição de espécies dos fungos endofíticos de *Brassica napus* (colza) obteve índice de diversidade de Shannon de 2,27 e Simpson 0,959 e classifica como alta diversidade, desta forma, pode se dizer que os resultados encontrados em *H. sucuuba* são superiores aos encontrados pelo referido autor.

5.2 Atividade antibacteriana de Fungos endofíticos de *Himathantus sucuuba*

O bioensaio para atividade antibacteriana foi realizado com extratos metabólitos produzidos por 235 fungos endofíticos representantes de cada táxon obtido, inclusive com indivíduos não identificados. Destes, 50 (21,27%) apresentaram atividade antibacteriana. Na Figura 9 pode-se observar os halos produzidos pelos metabólitos fúngicos contra *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, entretanto, demonstrou baixa eficácia contra *Klebsiella pneumoniae*.

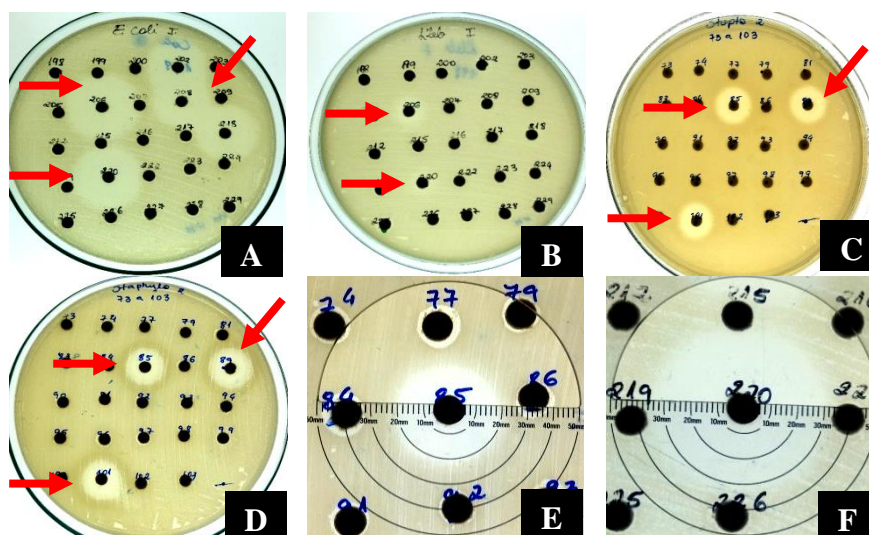


Figura 9. Atividade antibacteriana dos extratos metabólitos de fungos endofíticos de *H. sucuuba* frente às bactérias testadas. (A) Halos de inibição para *E. coli*; (B) Poucos halos de inibição para *K. pneumoniae*; (C) Halos de inibição para *S. pneumoniae*; (D) Halos de inibição para *S. aureus*; (E, F) medição de halos em mm com uso de régua para antibiograma.

Na Tabela 5 estão apresentados os fungos endofíticos com atividade antibacteriana frente aos microrganismos *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* e *S. aureus*.

Tabela 5. Extratos metabólicos de fungos endofíticos de *H. succuba* com atividade antibacteriana.

Registro	Gênero	Bactéria analisadas			
		EC	KP	SP	SA
Halo (mm)					
2.3438	M.E.	-	-	12	-
2.3585	M.E.	-	-	10	-
2.4205	M.E.	10	-	-	-
2.2371	M.E.	-	-	10	-
2.3615	M.E.	30	-	30	20
2.3551	M.E.	10	-	-	-
2.2188	M.E.	29	-	28	20
2.3654	M.E.	30	-	24	16
2.3588	M.E.	-	-	11	-
2.2840	M.E.	23	10	17	21
2.3673	M.E.	15	-	13	-
2.3415	M.E.	-	-	-	10
2.2946	M.E.	-	-	11	10
2.2844	M.E.	-	-	10	-
2.3414	M.E.	30	-	26	20
2.2402	M.E.	28	-	21	18
2.2992	M.E.	19	-	17	13
2.2873	M.E.	36	-	30	28
2.3027	M.E.	30	-	20	20
2.3596	M.E.	10	-	13	10
2.2910	M.E.	30	-	22	20
2.2320	M.E.	30	-	12	22
2.3603	<i>Xylaria</i> sp.	20	-	18	10
2.2913	<i>Xylaria</i> sp.	-	-	11	-
2.3586	<i>Xylaria</i> sp.	12	-	10	-
2.3518	<i>Xylaria</i> sp.	28	-	20	20
2.3572	<i>Xylaria</i> sp.	10	-	10	-
2.3664	<i>Xylaria</i> sp.	37	12	30	22
2.3579	<i>Xylaria</i> sp.	21	-	15	-
2.3662	<i>Xylaria</i> sp.	27	-	22	20
2.2991	<i>Xylaria</i> sp.	10	-	-	-
2.2948	<i>Xylaria</i> sp.	19	-	18	13
2.2822	<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	10	-
2.3727	<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	12	-
2.3659	<i>Colletotrichum</i> sp.	30	10	30	24
2.3649	<i>Colletotrichum</i> sp.	24	-	20	18
2.3538	<i>Colletotrichum</i> sp.	23	-	19	20
2.3447	<i>Colletotrichum</i> sp.	11	-	18	16
2.3641	<i>Colletotrichum</i> sp.	10	-	-	-
2.2944	<i>Colletotrichum</i> sp.	31	-	30	23
2.3400	<i>Colletotrichum</i> sp.	30	-	26	19
2.2951	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	10	-
2.2846	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	10	-
2.3008	<i>Phomopsis</i> sp.	-	10	-	-
2.3584	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	10	-
2.2322	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	18	18
2.2972	<i>Phomopsis</i> sp.	21	-	22	20
2.2379	<i>Fusarium</i> sp.	30	10	30	26
2.2000	<i>Paecilomyces</i> sp.	21	0	17	12
2.3602	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	15	-	18	10
Controle	Cloranfenicol	26	13	18	19
Total geral		36	4	44	30

M.E.= Micélio estéril

EC=*Escherichia coli*; KP=*Klebsiella pneumoniae*; SP=*Streptococcus pneumoniae*; AS=*Staphylococcus aureus*
Cloranfenicol = 30mg.

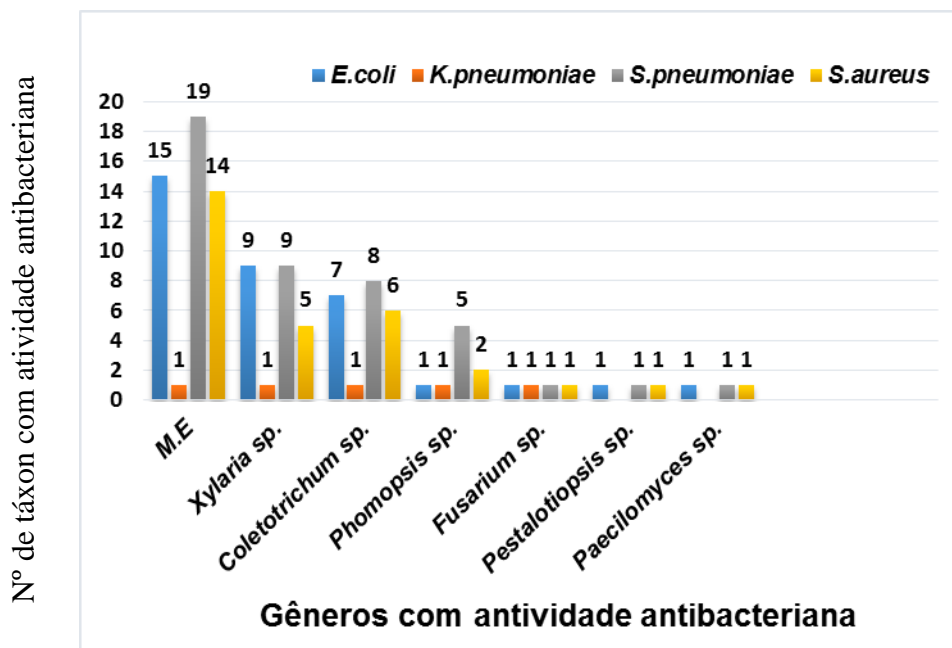


Figura 10. Gêneros de fungos endofíticos de *H. sucuuba* com atividade antibacteriana. M.E. = Micélio estéril

Dentre os fungos endofíticos identificados de *H. Sucuuba*, *Xylaria* sp. foi o que mais apresentou atividade antibacteriana, desta forma, se existe atividade é devido a produção de substâncias químicas. Embora o objetivo deste trabalho não tenha sido isolamento, o referido gênero é citado por diversos autores que relatam diversas substâncias importantes, inclusive com atividade antibacteriana como visto no presente trabalho. Entre os compostos isolados estão griseofulvina e declorogriseofulvina com atividade antibacteriana e antifúngica (PARK et al., 2005), o ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico, citocalasina D, 7-declorogriseofulvina, citocalasina B e griseofulvina com atividade antifúngica contra os fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (CAFEU et al., 2005). Um sesquiterpenóide isolado de *Xylaria* sp. foi capaz de inibir a enzima integrase do vírus HIV-1 (SINGH et al., 1999). Logo, este fungo pode ser um importante meio para o desenvolvimento de agentes anti-HIV. O gênero também produz declorogriseofulvina e griseofulvina com ampla atividade antifúngica contra brusone, ferrugem da bainha do arroz, ferrugem da folha de trigo, *Botritis cinerea* e oídio da cevada (JOONG-HYEOP, 2005) e a

enzima fitase que catalisa a liberação do fosfato, sendo bastante utilizada no melhoramento da qualidade nutricional de ração animal (CUNHA et al., 2015).

O gênero *Colletotrichum* sp., inibiu o crescimento de todas as bactérias analisadas, principalmente *S. pneumoniae* e *E. coli*. Este gênero é produtor de diversas substâncias. Carvalho e colaboradores (2016), por exemplo, identificaram em *Colletotrichum gloeosporioides* as substâncias estigmasterol, sitosterol, esqualeno, ergosterol e peróxido de ergosterol estes compostos fitoesteróis, principalmente sitosterol, reduzem colesterol no sangue, e também podem ser utilizados para tratar doenças cardiovasculares, câncer e processos inflamatórios (WOYENGO et al., 2009; MARANGONI; POLLI, 2010). Outros trabalhos também demonstram o potencial de atividade deste gênero. *Colletotrichum gloeosporioides* produz o metabólito ácido-coleótrico que promove atividade contra *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas* sp., atividade anticâncer (GASONG et al., 2015) e contra *Staphylococcus aureus* (HONG LU et al., 2000; ZOU et al., 2000;) desta forma, *Staphylococcus aureus* também foi sensível aos extratos de *Colletotrichum* isolados de *H. succuba*.

Os extratos fúngicos produzidos por *Phomopsis* sp proporcionaram atividade inibitória principalmente frente *S. pneumoniae*. De acordo com Corrado e Rodrigues (2004) *Phomopsis* sp. possui atividade inibitória frente a bactérias, leveduras e fungos filamentosos. O fungo ainda é produtor de ácido mevánico, com atividade anti-inflamatória, Phomol com atividade citotóxica, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória (WEBER et al., 2004), e também produz o ácido 3-hidroxi-propiônico com atividade nematicida contra *Meloidogyne inconita* e *Caenorhabditis elegans* (SCWARZ et al., 2004). Além da atividade inibitória frente a *S. pneumoniae* e do potencial relatado em diversas pesquisas o extrato fúngico nº 2.3008 produzido por *Phomopsis* sp de *H. succuba* apresentou atividade específica contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae* observada como a mais resistente a todos os extratos, podendo ser um

diferencial para isolamento de novos compostos e estudos frente a esta e outras bactérias gram negativas.

Fusarium sp. teve 1 indivíduo ativo para todas as bactérias testadas, no entanto, a literatura traz estudos onde *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* isolados de Ginseng mostraram relevante atividade antimicrobiana (PARK et al., 2015). Bhalkar e colaboradores (2016) isolaram de *Fusarium* o alcalóide citotóxico Camptotecina eficaz como inibidor da enzima topoisomerase I do vírus HIV, apesar de *Fusarium* sp. de *H. succuba* não ter sido tão efetivo como antibacteriano, ainda assim, pode ser investigado para outras aplicações biotecnológicas.

Paecilomyces sp. e *Pestalotiopsis* sp. também tiveram apenas 1 indivíduo ativo para *E. coli*, *S. pneumoniae* e *S. aureus*. Não foram encontrados relatos de atividade antibacteriana de endofítico *Paecilomyces*, porém, os estudos de Li et al (2001) com *Pestalotiopsis microspora* apresentou o metabolito ácido ambuico com atividade antifúngica. A mesma espécie isolada de *Terminalia morobensis* produziu a isopestacina com atividade antimicrobiana e antioxidante (HARPER et al., 2003). Estirpes de *Pestalotiopsis* foram isolados a partir da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss (espinheira santa) sendo bem sucedidas na inibição de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) (FIGUEIREDO et al., 2007) tais resultados são similares ao observado neste estudo.

Apesar de não se conhecer as moléculas químicas dos endofíticos de *H. succuba* responsáveis pela atividade antibacteriana os resultados encontrados revelam expectativa de aplicação farmacológica de amplo espectro, ou seja, eficazes contra bactérias gram positivas e gram negativas.

Diversos endofíticos com atividade antifúngica e antibacteriana foram encontrados por Bae et al (2011), Ding et al (2012) e Moreira (2013), assim, a comunidade endofítica de *H.*

sucuuba pode ser alvo de novos estudos, visando a identificação de novas moléculas, principalmente antibacterianas, o que tem se tornado uma necessidade recorrente.

De modo geral, as bactérias mais sensíveis neste estudo foram *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*, enquanto *K. pneumoniae* se mostrou a mais resistente como pode ser observado no controle cloranfenicol (Tabela 5). Foram considerados inibitórios os halos a partir de 10 mm. No entanto, houve halo de inibição de até 36 mm.

A identificação total dos endofíticos de *H. sucuuba* e isolamento das substâncias químicas são necessárias para elucidação completa da comunidade endofítica de *H. sucuuba*.

Diante dos relatos positivos sobre as substâncias isoladas e da atividade antibacteriana apresentada pelos fungos endofíticos isolados de *H. sucuuba*, há forte indícios que esta comunidade fúngica possui substâncias promissoras que merecem investigações posteriores, para isolamento das mesmas e confirmação da atividade observada frente a estas e outras bactérias e também outros microrganismos patogênicos.

6. CONCLUSÕES

Existe diversidade endofítica em caules e folhas de *H. succuba*, deste modo, a espécie compõe um importante hospedeiro de fungos endofíticos a ser estudado, inclusive de outros órgãos como raízes e frutos.

Os extratos fúngicos de diferentes endófitos de *H. succuba* apresentaram atividade antibacteriana, inibindo tanto o crescimento de bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, podendo ser fonte de antibióticos de amplo espectro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-TARAZI, M. F. et al. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.

AIRES, W.C. Estudo Fitoquímico de Fungo Endofítico *Associado à sucuba na busca de substâncias com atividades biológicas úteis*. **XXIV Seminário de Iniciação Científica da UFPA**, 2013.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.

ALMEIDA, A.M.S. **Características Biológicas e Antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos Genes de Virulência**. 2013. 30 f. Dissertação (Escola de Veterinária e Zootecnia), Universidade Federal de Goiás - GO.

ARAÚJO, J. M. F. et al. Isolamento e Identificação de Fungos Filamentosos Endofíticos de *Piper marginatum* JACQ. **61ª Reunião Anual da SBPC**. Amazônia: Ciência e Cultura, UFAM, Manaus, AM, 2009.

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

ARGENTA, S.C. et al. Plantas Medicinais: cultura popular versus ciência. **Revista Eletrônica Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.

ASSUNÇÃO, M.M.C. **Fungos endofíticos isolados de folhas de bananeira (*Musa spp.*) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura**. 2010. 173. Tese (Micologia Aplicada) Universidade Federal de Pernambuco-PE.

AZAMBUJA, D. Contribuição ao conhecimento das Apocynaceae encontradas no Brasil. **Arquivos do Serviço Florestal**, v. único, p. 9, 1947.

AZEVEDO, J. L. et al. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 57-91, 1999.

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

AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

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

BAE, J. et al. Effect of wash treatments on reducing human norovirus on iceberg lettuce and perilla leaf. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 11, p. 1908-1911, 2011.

BAPTISTA, M.G.F.M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. 41 f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Lisboa

BARRETO, A.S. et al. C. Ácido 15-desmetil isoplumierídeo, um novo iridóide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus sucuuba*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1133-1135, 2007.

BARNETT, H.L; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd edition, Burgess Publishing, v. 64, n. 4, p. 930-932, 1972.

BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 132-9, 2011.

BANÓSKI, S.A. Ervas Medicinais. **Revista Científica** (Online). 2008. Disponível em <<http://www.atenas.edu.br/faculdade/arquivos/NucleoIniciacaoCiencia/REVISTAS/REVIST2008/3.pdf>>. Acesso em: 22 março de 2016.

BASTOS, D.Z.L. et al. Fungos Associados à Casca do Caule de *Platanus orientalis* L. **Revista Estudos de Biologia**, v. 26, n. 54, p. 37-41, 2004.

BAYMAN, P. et al. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, v. 102, n. 08, p. 944-948, 1998.

BISSON, M.P. **Campanha uso racional de antibióticos e combate à resistência bacteriana**. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2010.186p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.156p.

BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 247-249, 2012.

BHALKAR, B.N.; PATIL, S. M.; GOVINDWAR, S.P. Camptothecine production by mixed fermentation of two endophytic fungi from *Nothapodytes nimmoniana*. **Fungal Biology**, v. 120, n. 6, p. 873-883, 2016.

CAMPOS, D. A.; FARINACCIO, M. A. *Himatanthus* (Apocynaceae): Reconhecimento das espécies, informações fenológicas e distribuição do gênero em Sergipe. **X Congresso De Ecologia do Brasil**, São Lourenço – MG, 2011.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, n. 24, p. 3034-3043, 1978.

CARVALHO, C; M. **Recursos naturais amazônicos com perspectivas de uso biotecnológico sobre o *Mycobacterium tuberculosis***. 2005. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade de São Paulo, Instituto Butantan / Instituto de Pesquisas Tecnológicas-SP.

CARVALHO, J.M. et al. Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). **Acta Amazônica**, v. 46, n. 1, p. 69-72, 2016.

CONRADO, A.J.S. et al. Avaliação do efeito antimicrobiano e antibiofilme do peptídeo sintético kr-mod sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Brasileira de Biodiversidade e Biotecnologia**, 2015. Disponível em <http://gpicursos.com/slab2015/Sistema/trabalho-pdf.php?id=289>. Acesso em 15 de abril de 2016.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 157-160, 2004.

CORREIA, V.C.S. et al. Avaliação da atividade antagonista *in vitro* de fungos endofíticos associados ao camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 4, p. 201-207, 2015.

COSTA-NETO, E. M.; ALVES, R. R. N. Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira. 1ed. Recife: NUPEEA, p.127-140, 2010.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2ed. Bronx, New York: **The New York Botanical Garden**, 1988. 535p.

CRUVINEL, A. R. SILVEIRA, A.R., SOARES, J.S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, v.4, n 4, p. 1-11, 2011.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, 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, 2013.

CUNHA; M.C. MONTEIRO; P.S MENDES, F.Q. Caracterização bioquímica de fitases produzidas por fungos isolados na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**. v.13, p.59-67, 2015.

DAM, J.V. Medicamentos provenientes do reino mineral, vegetal e animal. **Arte Médica Ampliada** v..32 n. 3, 2012.

DEL FIOLE, F.S. et al. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DING, JIHUA et al. RNA-directed DNA methylation is involved in regulating photoperiod-sensitive male sterility in rice. **Molecular plant**, v. 5, n. 6, p. 1210-1216, 2012.

ENDRESS, M.E., BRUYNS, P.V. A Revised classification of the Apocynaceae. **The Botanical Review**, v. 66, p 1-56, 2000.

ENDRESS, M. E.; SCHUMANN, S.L.; MEVE, U. An updated classification for Apocynaceae. **Phytotaxa** n.159, v.3, p. 175–194, 2014.

FAKHRUDIN, N. et al. Identification of plumericin as a potent new inhibitor of the NF- κ B pathway with anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 7, p.1676-1686, 2014.

FELBER, A.C.; PAMPHILE, J. A. Fungos Endofíticos: Potencial como Controladores Biológicos e Estudos em Videiras. **Uningá Review**, v. 14, n. 1, p.13-25. 2013.

FERREIRA, C. et al. Tolerância de *Himatanthus sucuuba* Wood. (Apocynaceae) ao alagamento na Amazônia Central. **Acta Botânica Brasílica**. v. 19, n. 3, p. 425-429, 2005.

FERREIRA, C. S. et al. Adaptive strategies to tolerate prolonged flooding in seedlings of floodplain and upland populations of *Himatanthus sucuuba*, a Central Amazon tree; **Aquatic Botany** v. 90, n. 3, p. 246-252, 2009.

FERNANDES JUNIOR, A. et al. **Antibacterial activity of medicinal plant extracts**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 38, p. 717-19, 2007.

FENSELAU, C; DEMIREV, P.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

FIRMO, W.C.A.; et al. Contexto Histórico, uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais- **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial. P.90-95. 2011.

FIGUEIREDO, E. A. PESSOA et al. *Pseudomonas aeruginosa*: frequency of resistance to multiple drugs and cross-resistance between antimicrobials in Recife-PE. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FREIRE, F.C.O.; VASCONCELOS, F.R.; DE LIMA COUTINHO, I. B. 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.

FREIRE, M., et al. Bioprospecção da Flora Fúngica Endofítica de Restinga para uso no Controle Biológico de Pragas. **Biológicas e Saúde**, v.5, n. 18, 2015.

FREIRE, K.T.L.S, et al. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia** v.9, n.2, 2015.

FREITAS, S.; GORENSTEIN, C.; APPOLINARIO, J.C. Instrumentos para a avaliação dos transtornos alimentares. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, n. 3, p. 34-38, 2002.

FORZZA, R C.; LEITMAN, P. coords. Lista de espécies: angiospermas. In: FORZZA, RC. org., *et al.* Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** (Online). v. 1, p. 570-871, 2010.

FOGLIO, M.A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. Construindo a história dos produtos naturais. **Revista Multiciências**. v. 7, p. 1-8, 2006.

FUKAREK, F. DIERSSEN, K.: Einführung in die Pflanzensoziologie. 241 S., 55 Abb., 19 Tab. Akademie Verlag, Berlin, 1990. ISBN 3-05-500823-5. Preis: DM 39, 80. **Feddes Repertorium**, v. 104, n. 1-2, p. 112-112, 1993.

GASONG, B.T.; TJANDRAWINATA, R.R. Production of secondary metabolite E2. 2 from *Phaleria macrocarpa* endophytic fungus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.1-5; 2016.

GOMES, A.S.; FERREIRA, S.P. **Análise de dados ecológicos**. Universidade Federal Fluminense, Departamento de Biologia Marinha, Niterói- RJ. UFF. 2004. 30p.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, J. S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia**, v. 15, n. 1, p. 71-92, 2013.

GRUNDMANN, H. et al. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **The Lancet**, v. 368, n. 9538, p. 874-885, 2006.

GUERRA, M.O.; PETERS, V. M. Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himathanthus sucuuba* stem bark. **Journal of ethnopharmacology**, v. 34, n. 2, p. 195-199, 1991.

HARPER, JAMES K. et al. Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HAWKEY P.M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 1, p.9, 2008.

HAWKEY P.M, JONES A.M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n.1, p.3-10, 2009.

HUSSAIN, H. et al. New Bioactive 2, 3-Epoxy cyclohexenes and Isocoumarins from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus Azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2009, n. 5, p. 749-756, 2009.

HONG LU, et al. New Bioactive Metabolites Produced by *Colletotrichum* sp., an Endophytic Fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, n. 1, p. 67-73, 2000.

HONG, S. B. et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1316-1329, 2005.

ISAKA, M. *et al.* Eremophilane type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. **Journal of Natural Products**, v.73, p.683-687, 2010.

KRUPPA, P.C.; FABRI, E.G; RUSSOMANNO, O.M.R; COUTINHO, L.N. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em sementes de Urucum. Instituto Agronômico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Horticultura. **Biológico**, v.74, n.1, p.55-57, 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. **Micologia médica**. 8ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1991.695p.

LACAZ, C. S.; et al. **Guia para identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico**. São paulo: 1ed. SãoPulo: Ed. Sarvier, 1998. 445p.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. Prefácio: Bertrand Dupont. 9ed. São Paulo, Ed. Sarvier, 2002. 1104p.

LARROSA, C. R.R.; DUARTE, M.R. Contribution to the anatomical study of the stem of *Himatanthus sukuuba* (Spruce ex Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 110-114, 2005a.

LARROSA CRR, DUARTE M. do R. Morfoanatomia de folhas de *Himatanthus sukuuba* (Spruce) Woodson, Apocynaceae. **Acta Farmacêutica Bonaerense** v.24, n.2, p.165, 2005b.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION et al. Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. **Center for Food Safety and Applied Nutrition**, 2012.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M. R.C.; JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.88, n.1, p. 21-25, 2007.

LIMA FILHO, et al. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira** (Online) v. 28, p.6, 2003.

LINHARES, J.F.P.; PINHEIRO, C.U. B. Sustentabilidade socioambiental da extração de janaúba (*Himatanthus Willd. Ex schult.*) no Município de Alcântara, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 4, p. 57-58, 2011.

LISBOA, H.C.F. **Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica**. 2015. 222 f. Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química. São Pulo -SP.

LI, J. Y., et al. Cryptocin, a Potent Tetramic Acid Antimycotic From the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, v. 2, n. 6, p. 767-770, 2000.

LOPES, A.A.; GUIMARÃES, D.O.; PUPO, M.T. Quando os Microrganismos Salvam Vidas. Seres Diminutos a Serviços da Produção de Medicamentos. **Ciência hoje**. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, ed.286, 2011.

MAGALHÃES, W.C.S. et al. Diversidade de fungos endofíticos em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne**, v. 14, n. 3, p. 267-273, 2008.

MAIA, N.C. **Fungal endophytes of *Panicum maximum* and *Pennisetum purpureum*: isolation, identification and antifungal potential**. 2015, 49 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras- MG.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 193-199, 2010.

MARIANO, R. L. R. et al. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no nordeste do Brasil. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. **Revista Agrotrópica**, v. 9, n.3 p. 127-134, 1997.

MARQUES, F. Estruturas promissoras - Base de dados de Compostos Químicos da Biodiversidade Brasileira Ganha Reconhecimento. **Pesquisa Fapesp**, ed. 217, p. 33-35, 2014.

MARTINS, A.P.M. **Pesquisa de *E. coli* e *S. aureus* em patês não industrializados comercializados no Plano Piloto – DF**. 2007. 28f. Monografia (Especialização em Tecnologia dos Alimentos) -Universidade de Brasília-DF.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P. et al. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. **Biological Control**, v. 94, p. 1-10, 2016.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 3, p. 170-179, 2013.

MIRANDA, A.L.P. et al. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Latex Containing Triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta medica**. v. 66, n. 3, p. 284-286, 2000.

MONTEIRO, J. Espécies laticíferas. Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Espírito Santo, 15p. 2010.

MONTEIRO, M.M. et al. Saber e Uso de Plantas Medicinais em Marudá e na APA Algodão-Maiandeuá. Núcleo de Meio Ambiente UFPA, **ANPPAS**, 2012.

MORAGAS, C.J. **Estudo do gênero *Himatanthus*: anatomia vegetal, fitoquímica, farmacologia e biotransformação**. 2006. 254 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, UFRJ/NPPN), Rio de Janeiro-RJ.

MOREIRA, F.V. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Fungos Endofíticos Associados à Planta Medicinal *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M. King & H. Robinson (Arnica-do-Campo) 2013. Disponível em: <http://site.ufvjm.edu.br/defar/files/2014/07/F.V.M.2013.2.pdf>. Acesso em 16 de fevereiro de 2016.

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

NASCIMENTO, T.L. **Fungos endofíticos de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.: aspectos ecológicos e potencial antimicrobiano.** 2010. 75 f. Dissertação. (Pós-Graduação em Biologia de Fungos), Universidade Federal de Pernambuco. Recife –PE.

NASCIMENTO, I. M. **Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno *Colletotrichum* sp.** 2015. 93 f. Dissertação (Microbiologia agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.” Piracicaba- SP.

NASCIUTTI, P.R. **Desenvolvimento de Novos Fármacos.** 2012. 29p. Revisão de literatura (Ciência Animal) Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás- UFG –Goiânia.

NEVES, P.R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard.** Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238 486-4), v.23, n.2, 2003. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2016.

OLIVEIRA, R. L., **Isolamento e Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum*.** 2010. 67 f. Dissertação (Universidade do Estado do Amazonas, escola superior de ciências da saúde programa de pós-graduação em biotecnologia e recursos naturais da Amazônia), Manaus- AM.

OLIVEIRA, Kamyla Morais de et al. Isolamento e Atividade Antibacteriana de Fungos Endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 19, n. 1, 2015.

PAES, Lucilene da Silva et al. Levantamento da Microbiota Fúngica Endofítica de *Phthirusa Pyrifolia* Kunth com Caracterização Anatômica dos Tecidos Colonizados. **IGAPÓ-Revista de Educação Ciência e Tecnologia do IFAM**, v. 4, n. 1, 2014.

PARK, JOONG-HYEOP et al. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Jounal Microbiol Biotechnol**, v. 15, n. 1, p. 112-117, 2005.

PARK, Young-Hwan et al. Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. **Biological Control**, v. 91, p. 71-81, 2015.

PASSARINI MRZ, SANTOS C, LIMA N, BERLINCK RGS, SETTE LD. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v.195, n. 2, p. 99-111, 2013.

PAZ, M.F.C.J. et al. Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da *Himatanthus sukuuba*: uma questão de saúde pública. **Revista Interdisciplinar**, v. 6, n. 1, p. 52-61, 2013.

- PERDUE, G.P.; BLOMSTER, R.N. Plantas da América do Sul III: Isolamento de fulvoplumierin de *Himatanthus sucuuba*. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (Apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.67, n. 9. p. 1322-3, 1978.
- PEREIRA, R.C. A. Plantas condimentares: cultivo e utilização. Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.
- PIMENTEL, I.C. et al. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Revista Floresta**, v. 36, n. 1, 2006.
- PINHEIRO, S.D. et al. Análise de parâmetros físico-químicos em leite de sucuba (*Himathantus sucuuba*) 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014.
- PHOTITA, W. et al. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1508-1513, 2001.
- POLLI, A. et al. Aspectos da Interação dos Microrganismos Endofíticos com Plantas Hospedeiras e sua Aplicação no Controle Biológico de Pragas na Agricultura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, 2012.
- RAPINI, A.; SILVA, R. F. S.; SAMPAIO, L. N.P. **Plantas Raras do Brasil**, Conservação Internacional (CI-Brasil) Universidade Estadual de Feira de Santana, Belo Horizonte-MG, p. 54. 2009.433p.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Revista Science**, v.289, p. 1920-1921, 2000.
- RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J. M. D.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, 2010.
- RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section Flavi isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approach. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 4, p. 877-892, 2011.
- RYAN, R.M.; DECI, E.L. On happiness and human potentials: A review of research on hedonic and eudaimonic well-being. **Annual review of psychology**, v. 52, n. 1, p. 141-166, 2001.
- SANTOS, A. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, T.T.; VARAVALLLO, M.A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Revista Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.

SANTOS, S. L. et al. A Interação Harmônica entre Fungos e Plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, 2013.

SEGOVIA, J.F.O; ORELLANA, J.P.B. **Sucuúba, usos medicinais, ocorrência e conservação a campo no Amapá**. 16ª Reunião Anual do Instituto Biológico – RAIB, v. 70, 2003.

SERRA, I. M.R.S.; SILVA, G.S. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas no Maranhão. **Summa phytopatológica**, v. 30, n. 4, p. 475-480, 2004.

SILVA J.R.A; et al. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**; v.21, p.702–4,1998.

SILVA, R.L.O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 649- 655, 2006.

SILVA, M.R.O. et al. Viriditoxin, an antibacterial substance produced by mangrove endophytic fungus *Paecilomyces variotii*. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.). Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Section: Antimicrobial natural products. **Biocontrol**, v.02, p. 1406- 1411, 2013.

SILVA, J. R. A.; et al. Contribution to the Study of *Himatanthus sucuuba*: Latex Macromolecule, Microelements and Carbohydrates. **Acta amazônica** v.33, n. 1, p. 105-110, 2003.

SILVA, J.R.A. et al. Quantitative determination by HPLC of iridoids in the bark and latex of *Himatanthus sucuuba*. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 119-122, 2007.

SILVA, S.A.; et a. Análise de parâmetros físico-químicos de chás de casca de sucuúba (*Himathantus sucuuba*) 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014.

SIMONETTI, E. "**Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes***". 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Centro Universitário UNIVATES, Lajeado-RJ.

SINGH, SHEO B. et al. Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrase inhibitor integric acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. **Tetrahedron letters**, v. 40, n. 50, p. 8775-8779, 1999.

SIQUEIRA, V.M. **Fungos endofíticos de folhas e caule de *Lippia sidoides* Cham. e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2008.79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Curso de Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, UFP.Recide- PE.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 173-177, 2010.

SOUZA, A.Q.L. de 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.

SCOLFORO, J. R. et al. **Diversidade, equabilidade e similaridade no domínio da caatinga**. In: MELLO, J. M.; SCOLFORO, J. R.; CARVALHO, L. M. T. (Ed.). Inventário Florestal de Minas Gerais: Floresta Estacional Decidual - Florística, Estrutura, Similaridade, Distribuição Diamétrica e de Altura, Volumetria, Tendências de Crescimento e Manejo Florestal. Lavras: UFLA, p.118-133,2008.

SCHWARZ, MICHAEL et al. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 65, n. 15, p. 2239-2245, 2004.

SHWETA, SINGH et al. Endophyte fungal diversity in *Nothapodytes nimmoniana* along its distributional gradient in the Western Ghats, India: are camptothecine (anticancer alkaloid) producing endophytes restricted to specific clades?. **Current Science**, v. 109, n. 1, p. 127, 2015.

SPINA, A.P. **Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae - Plumerieae)**. Campinas: UNICAMP. 2004. 191 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Departamento de Botânica. Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

SPINA, A. P.; BITTRICH, V.; KINOSHITA, L. S. Tipificações, novos sinônimos e uma nova combinação em *Himatanthus* (Apocynaceae), **Revista Taxon**, v. 62. n. 6 p. 1304–1307, 2013.

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

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58p.

WALTENBERGER, B. et al. Plumeridoid C from the Amazonian traditional medicinal plant *Himatanthus sucuuba*. **Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications**, v. 67, n. 10, p. 409-412, 2011.

WEBER, ROLAND W.S. et al. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? **Mycological research**, v. 108, n. 06, p. 662-671, 2004.

WENZEL, J. B. Isolamento e Atividade Antagônica de Fungos Endofíticos de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

WOOD, C.A; et al. A bioactive spiro-lacton e iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 49.p. 1477–8, 2001.

WOYENGO, T. A.; RAMPRASATH, V. R.; JONES, P. J. H. Anticancer effects of phytosterols. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 7, p. 813-820, 2009.

VÁSQUEZ, SILVIA PATRICIA FLORES; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. do N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta amazônica**, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

VIEIRA, P.D.S. **Fungos endofíticos associados a algodoeiros transgênico e não transgênico**.2010.74. f. Dissertação (Biologia de fungos), Recife -PE.

VIEGAS JR, CLÁUDIO; BOLZANI, VANDERLAN DA SILVA; BARREIRO, ELIEZER J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

YADAV, PUJA; OWITI, NORAH; KIM, NAYUN. The role of topoisomerase I in suppressing genome instability associated with a highly transcribed guanine-rich sequence is not restricted to preventing RNA: DNA hybrid accumulation. **Nucleic acids research**, p. 1152, 2015.

ZANARDI, L. M. et al. Sesquiterpenoides produzidos pelo fungo *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v.35, n. 11, p. 233-2236, 2012.

ZOU, D.et al. Prophage, ϕ PV83-pro, carrying Panton-Valentine leukocidin genes, on the *Staphylococcus aureus* P83 chromosome: comparative analysis of the genome structures of ϕ PV83-pro, ϕ PVL, ϕ 11, and other phages. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 12, p. 2631-2643, 2000.

ZHANG, QINGHUA et al. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. **Biological Control**, v. 72, p. 98-108, 2014.

ZHANG, NAIDAN et al. New cytotoxic compounds of endophytic fungus *Alternaria sp.* isolated from *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. **Revista Fitoterapia**, v. 110, p. 173-180, 2016.