



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

FÚLVIA SOARES CAMPOS DE SOUSA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS, ASSOCIADOS
À *Manilkara salzmannii*, PLANTA DE RESTINGA, COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.**

Salvador - BA
2013

FÚLVIA SOARES CAMPOS DE SOUSA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS, ASSOCIADOS
À *Manilkara salzmannii*, PLANTA DE RESTINGA, COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.**

Dissertação Apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Samira Abdallah Hanna.

Co-orientador: Prof.Dr. Milton Ricardo A. Roque

**Salvador - BA
2013**

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar este trabalho, recordo o começo de medos, angústia e vontade de desistir, sendo que no meu íntimo não podia fazer isso, pois tinha um compromisso com Deus e não seria fácil desistir. Ele sabiamente me mostrou como é importante a convivência com as pessoas. Percebi que podia aproveitar tudo com a convivência: risadas, conversas bobas, conversas sérias e vi que todos contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e acadêmico. Fui contemplada com a convivência com acadêmicos, pessoas normais enfim, pude perceber que todos nós temos limitações e o aprendizado vem da busca. Então, muito obrigada: Deus por me fazer enxergar as “pessoas” e respeitá-las como são.

Minha Família: Samuel meu marido, amigo e companheiro pela dedicação em todos os momentos: alegres, tristes, tensos, calmos, enfim obrigada pelo seu amor

Aos meus filhos Samuel Filho, Aila e Sofia por me compreenderem e estarem ao meu lado me apoiando. AMO VOCÊS!

Ao meu neto Samir pelo carinho e confiança que deposita em mim. Você é muito especial.

A minha mãe por ser uma guerreira e nunca se intimidar com os obstáculos.

Orientadores: Professora Samira Hanna por me acolher e me apoiar durante todo esse período e Professor Milton Roque pelos ensinamentos e incentivo.

Colegas: Jamile, Luisa, Aldi, Luís Lazaro, Kennya, Hendor, Marcus, Roberta, Sueli, Carine sempre prontos no atendimento.

Priscilla por fazer companhia no laboratório e compartilhar dos resultados positivos ou negativos.

Brena por sentar comigo e me ajudar desde o início do mestrado até a finalização.

Técnicos: Neila, Clara e Washington pela experiência prática passada e pelos favores obtidos em preparação de meios de cultura, visualizações aos microscópios, apoio moral e companheirismos.

Anaide, por me ajudar muitas vezes no meu local de trabalho grampeando provas.

Edmundo (Ed) e Ivana pela ajuda e cooperação em lavar e autoclavar os materiais e meios de cultura.

Secretárias: Jéssica, Vanessa e Mariana por estarem sempre bem humoradas e solícitas.

Professores: Departamento de Biointeração pela compreensão e cooperação.

Profa. Lília que segurou muitas barras e me incentivou a não desistir.

Professor Roberto Meyer coordenador do projeto da FAPEX que concordou em flexibilizar meu horário de trabalho para que eu pudesse desenvolver meu trabalho de mestrado.

Professora Maria Clara pelo apoio e carinho.

Professora Josilene por sempre ouvir os desabafos.

Professor Thiago por estar sempre disponível em ajudar.

Professor Luis Pacheco pela atenção em tirar as dúvidas.

Colaboradores: Profa. Maria Lenize pela disponibilidade e atenção na identificação das espécies botânicas.

Prof. Luiz Bezerra, pela colaboração na identificação dos fungos.

Jorge da UNIDUNAS por disponibilizar o acesso ao local da coleta.

Ana Moreno e Léo por cederem o rota evaporador.

Patrícia de Cruz das Almas por sequenciar minhas amostras.

Tadeu e Bruno por visualizarem que poderia fazer outros testes com o fungo em estudo.

Fernando, aluno de monitoria que ajudou na parte prática do trabalho.

Bom, eu agradeço a todos que diretamente e ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o desfecho muito proveitoso deste aprendizado.

Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.

Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do vôo. Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode levá-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre têm um dono. Deixaram de serem pássaros. Porque a essência dos pássaros é o vôo.

Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são pássaros em vôo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o vôo, isso elas não podem fazer, porque o vôo já nasce dentro dos pássaros. O vôo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado.

(Rubem Alves)

FÚLVIA SOARES CAMPOS DE SOUSA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS, ASSOCIADOS
À *Manilkara salzmannii*, PLANTA DE RESTINGA, COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.**

Dissertação apresentada em 31 de julho de 2013, como requisito para obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia, do Programa de Mestrado em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 31/08/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Samira Abdallah Hanna

**Departamento de Ciências de Biointeração
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA**

Prof^a. Dr^a. Elinalva Maciel Paulo

Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS

Prof^a. Dr^a. Tânia Fraga Barros

**Departamento de Análises Clínicas
Escola de Farmácia - UFBA**

CAMPOS DE SOUSA, FÚLVIA SOARES. Bioprospecção de fungos endofíticos, associados à *Manilkara salzmannii*, planta de Restinga, com atividade antimicrobiana. 60 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2013.

RESUMO

O bioma restinga pode ser caracterizado por áreas arenosas, de alta salinidade e com uma vegetação típica, com plantas adaptadas e de ocorrência descontínua no litoral brasileiro, sendo inclusive a transição para a mata atlântica. A maçaranduba, *Manilkara salzmannii*, uma sapotácea muito comum em áreas de transição e em vários biomas, inclusive na floresta amazônica atingindo mais de 20 metros de altura e usada como madeira para reflorestamento e na fabricação de móveis, mas várias espécies de plantas do gênero *Manilkara* sp tem características herbáceas como na restinga, sendo retorcida e com folhas duras e alternadas, A ocorrência de plantas da família Sapotaceae na restinga, pode representar um modelo para estudos desde em eco-fisiologia até de biodiversidade. Os micro-organismos endofíticos vivem no interior das plantas e desempenham importantes papéis ecológicos, podendo ser benéficos às plantas, como produtores de fito-hormônios e agentes de controle biológico e até prejudiciais, como os fitopatógenos, Recentemente, tem-se estudado fungos endofíticos principalmente para fins de bioprospecção e neste trabalho foram isolados e caracterizados endofíticos de *Manilkara salzmannii* quanto á atividade antimicrobiana. Um isolado, MK001, apresentou atividade antimicrobiana, onde, diferentes frações do mesmo extrato, inibiram fungos (*Candida albicans* ATCC18804) e bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium* sp. VD57). Este isolado foi caracterizado como do gênero *Lophiostoma* sp., Ordem Pleosporales, e com características que podem indicar uma nova espécie.

Palavras chaves: fungo endofítico, *Manilkara salzmannii*; atividade antimicrobiana; *Lophiostoma* sp.

CAMPOS DE SOUSA, FÚLVIA SOARES. Bioprospecting endophytic fungi associated with *Manilkara salzmannii*, plant of the Restinga, with antimicrobial activity. 60 pp. ill. 2013. Master Dissertation. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador 2013.

ABSTRACT

The biome sandbank, can be characterized by sandy areas, high salinity and with a typical vegetation with plants adapted and with a discontinuous occurrence of the Brazilian coast, and even the transition to rainforest. The maçaranduba, *Manilkara salzmannii*, represents a sapotacea very common in transitions areas and can be found in various biomes, including the Amazon rainforest reaching over 20 feet tall and used as wood for reforestation and the manufacture of furniture, but several species of plants from this genus *Manilkara* sp has herbaceous characteristics, mainly in the sandbank, being twisted and stiff and alternate leaves, the occurrence of plants from the Sapotaceae family in sandbank, may represent as a model for studies on eco-physiology and biodiversity. Endophytic microorganisms living inside the plants and play important ecological roles, may be beneficial to plants as producers of phyto-hormones and biological control agents and even harmful, such as pathogens, has been recently studied, mainly endophytic fungi for bioprospecting purposes and in this work were isolated and characterized endophytic from *Manilkara salzmannii* with the goal to selected fungi with an antimicrobial activity. One isolate, MK001, shows antimicrobial activity, where different fractions from the same extract was able to inhibit the growth fungi *Candida albicans* and bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Corynebacterium* sp.). This isolate was characterized as genus *Lophiostoma* sp., Order Pleosporales, and can be a new species.

Keywords: endophytic fungi; *Manilkara salzmannii*; antimicrobial activity; *Lophiostoma* sp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Quantidades utilizadas dos solventes para obtenção do extrato fúngico	20
Tabela 02. Grau de identidade do fragmento ITS do isolado MK001	34

LISTAS DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 01 - F-M. salzmannii (E. B. Almeida Jr. & D. P. W. Medeiros 747, IPA)	13
Figura 02 – Vista área do Parque das Dunas	16
Figura 03 – Coleta das folhas	17
Figura 04 – Técnica de desinfestação e incubação	18
Figura 05 – Agitador Orbital e isolados	19
Figura 06 - Extração Líquido - Líquido	20
Figura 07 - Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	21
Figura 08 - Revelação da Cromatografia	22
Figura 09 - Montagem para realização da Bioautografia	23
Figura 10 - Fungos morfotipos isolados da <i>Manilkara salzmannii</i>	29
Figura 11 - Placas de bioautografia dos extratos fúngicos (MK001), representando a zona de inibição de crescimento, das linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923(A); <i>Corynebacterium</i> sp. VD57 (B) e <i>Candida albicans</i> ATCC18804(C)	32
Figura 12 - Análise filogenética do isolado fúngico MK001 e isolados com correspondência do banco de dados a partir da sequência do gene ITS. O taxon é representado pela espécie seguida da sigla do isolado.	35
Figura 13 - Análise filogenética do isolado MK001 representado a distância para o fragmento de TEF	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO

2.2 MICRO-ORGANISMOS

2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

2.4 GÊNERO *LOPHIOSTOMA*

2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR ENDOFITICOS

2.6 RESTINGA

2.7 SAPOTACEAE

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

3.3 ÁREA E MATERIAL DE COLETA

3.4 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

3.5 PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS

3.6 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS

3.7 BIOENSAIOS: BIOAUTOGRAFIA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

4.5.1 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

4.5.2 BIOAUTOGRAFIA

4.6 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO ISOLADO FÚNGICO COM ATIVIDADE MICROBIANA

4.6.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

4.6.1.1 TÉCNICA DO MICROCULTIVO

4.6.2.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS

4.6.2 SEQUENCIAMENTO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

5.2 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS

5.3 BIOENSAIOS COM BIOAUTOGRAFIA

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS

5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

- 5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR
6. **CONCLUSÕES**
 7. **CONSIDERAÇÕES FINAIS**
 8. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 a 550.000 (SIMÕES et al., 1999), consistindo em importante potencial de desenvolvimento sócio-econômico para o país, como fonte de corantes, óleos vegetais, gorduras, fitoterápicos, antioxidantes e óleos essenciais para o setor produtivo. Industrialmente os óleos essenciais e/ou produtos derivados são empregados como matérias-primas para as indústrias de higiene e limpeza, alimentos e bebidas, farmacêutica e cosmética, além de apresentarem atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, entre outros (ABIHPEC, 2002).

Com o desenvolvimento da Biotecnologia, a alta taxa da biodiversidade presente nos ecossistemas brasileiros, tornou-se alvo de interesse do governo, das empresas e da comunidade científica. Assim, é imprescindível o conhecimento sobre a diversidade microbiana e de suas funções exercidas (ROQUE, 2005).

As interações dos micro-organismos endofíticos e as plantas, ainda não são bem compreendidas, mais podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas, estes fungos e bactérias produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como a diminuição da herbivoria, ataque dos insetos, aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros agentes, como os fitopatógenos (AZEVEDO, 1998).

Entre grupos de micro-organismos, especialmente bactérias e fungos, encontram-se espécies que colonizam o interior das plantas, denominados como endofíticos que, segundo Cardoso (1992), vivem no interior ou na superfície interna de tecidos saudáveis da planta, incluindo raízes e, sem causar efeito deletério, compartilham do ciclo de vida vegetal.

Os fungos formam um complexo grupo de organismos, presentes nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos, e são distintos produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais denominados compostos bioativos (BÉRDY, 2005).

Entretanto, várias espécies são patogênicas e produzem toxinas que auxiliam na infecção e colonização de seus hospedeiros. Já a contaminação por fungos em alimentos pós-colheita, pode trazer riscos à saúde humana e animal, devido à produção de micotoxinas (BENNETT e KLICH, 2003). Os fungos também são fonte de metabólitos secundários utilizados como fármacos, ou como precursores para síntese ou semi-síntese de medicamentos diversos, como antibióticos, antifúngicos, antitumorais, imunossupressores e antidiabéticos (LARSEN et al., 2005; MISIEK e HOFFMEISTER, 2007).

Os fungos endofíticos podem apresentar mecanismos fisiológicos e genéticos, importantes para a interação com a planta e também como potencial para a produção de metabólitos ativos, podendo apresentar novas descobertas, com aplicação industrial, na medicina e na agropecuária. Em comparação com as plantas, os fungos apresentam crescimento mais rápido em menor tempo e espaço. Além disso, as condições de cultivo (tempo, pH, nutrientes, temperatura e aeração) podem ser controladas a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos (PEARCE, 1997).

A bioprospecção consiste na exploração e investigação de plantas, animais e micro-organismos a fim de identificar genes, proteínas e compostos ativos com atividade específica, para serem utilizados como produtos ou bioprocessos em diferentes áreas da indústria farmacêutica, alimentícia, agropecuária, entre outras. A bioprospecção também pode ser definida como o estudo da diversidade biológica com fins econômicos e sociais (STROBEL e DAISY, 2003; TRIGUEIRO, 2002).

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo o estudo da atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos do fungo endofítico do gênero *Lophiostoma* (espécie nova), isolado da *Manilkara salzmannii* uma planta, coletada em uma região de restinga e de Proteção Ambiental no município de Salvador.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIODIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO

Segundo Barbieri (2010), diversidade biológica, ou biodiversidade, é representada por todas as espécies de seres vivos existentes no planeta incluindo a variedade genética dentro das populações e entre a variedade de espécies da flora, da fauna, de fungos macroscópicos e de micro-organismos, a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas e a variedade de comunidades, habitats e ecossistemas. A importância da biodiversidade está na relação direta da influência que exerce no Planeta, como: regular o clima; proteger e manter os solos; fazer a fotossíntese, disponibilizando o oxigênio necessário à respiração e a matéria básica para os alimentos, roupas e medicamentos. O grande valor da biodiversidade justifica investimentos visando sua conservação, sobretudo em razão do seu potencial para a biotecnologia, especialmente na engenharia genética, e para a geração de novos alimentos e produtos industriais. Portanto, a biodiversidade também traz benefícios econômicos, o que representa mais um incentivo para sua preservação.

A utilização de espécies endêmicas em pesquisas de melhoramento genético tem alcançado êxito graças ao desenvolvimento da biotecnologia, os resultados são, principalmente, a obtenção de plantas e variedades resistentes a pragas, doenças e condições adversas do meio ambiente. Além disso, muitas plantas possuem princípios ativos que podem ser utilizados na elaboração de medicamentos, (BÉRDY, 2005).

As florestas tropicais e os recifes de corais abrigam grande variedade de plantas e animais: são os ecossistemas com maior número de espécies do Planeta, com alto grau de riqueza (BILLS, 2002).

Embora apenas cerca de 10% da biodiversidade mundial tenha sido estudada, 140 mil metabólitos intermediários, oriundos, sobretudo de plantas superiores e de micro-organismos, foram isolados e caracterizados, mas ainda não foram avaliados biologicamente (CALIXTO, 2003). No Brasil a biodiversidade é considerada como

fonte de substâncias biologicamente ativas e com seu enorme potencial de novos fármacos (BARREIRO, BOLZANI, 2009).

Segundo Calixto (2003) e Weber (2007), o interesse pela biodiversidade para a produção de medicamentos aumentou sensivelmente com a conclusão do genoma humano, visto que cerca de 500 para mais de 6 mil o número de possíveis alvos terapêuticos, com isso a terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, extraídos de plantas superiores, das toxinas de animais e micro-organismos.

Devido à busca aos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos ou de plantas, os cientistas puderam compreender fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular e à fisiologia, permitindo que enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas fossem identificados, isolados e clonados. Isso possibilitou à indústria farmacêutica desenhar drogas dotadas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias de maior complexidade (DEMAIN, 1999).

2.2. MICRO-ORGANISMOS

Segundo Tortora et al. (2006), os micro-organismos são minúsculos seres, individualmente muito pequenos para serem vistos a olho nu, englobam bactérias, fungos, protozoários, algas microscópicas e vírus. Os micro-organismos são cruciais para o bem estar da espécie humana, pela manutenção do equilíbrio entre organismos vivos, dos ciclos biogeoquímicos e dos compostos químicos no ambiente, além do que, possuem aplicações biotecnológicas.

É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e na agricultura são derivadas de descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de micro-organismos. Ao longo do tempo, o homem conseguiu cultivar os micro-organismos em laboratório, bem como isolar e identificar quimicamente os produtos naturais microbianos, aplicando-os em diversas áreas,

principalmente na medicina, como medicamentos e na área de alimentos. (KREUZER e MASSEY, 2002).

A ampliação dos conhecimentos sobre a capacidade biosintética dos micro-organismos permitiu o desenvolvimento da biotecnologia e da expansão na aplicação de produtos. Estas perspectivas associadas aos produtos de alto valor agregado e de interesse industrial tem conduzido nos últimos anos a investigação e desenvolvimento de modelos que constituem as bases das novas tecnologias para processos unitários de origem microbiana (ROBERT et al.,1991; CAMPOS – TAKAKI, 2005).

2.2.1 FUNGOS

Os fungos são micro-organismos eucarióticos, aclorofilados, produtores de esporos, com nutrição por absorção, capazes de se reproduzirem tanto sexuada quanto assexuadamente, cujas células estão envolvidas por parede celular, rica em quitina e também com galactose e manana, sua membrana celular é rica em ergosterol. Alguns fungos podem ser unicelulares, como as leveduras, e outros multicelulares, como os fungos filamentosos. Nestes últimos, a hifa constitui o micélio do fungo, que cresce alongando-se por crescimento apical denominadas de pseudo-hifas (ALEXOPOULOS, 1996; KIRK, 2001).

2.4. GÊNERO *Lophiostoma*

A ordem Pleosporales é um enorme grupo de ascomicetos que incluem 19 famílias, 179 gêneros e mais de 1.400 espécies (KIRK et al. 2001). Os fungos Pleosporales estão presentes em folhas mortas, caules herbáceos e outras estruturas da planta. Alguns gêneros, como *Pyrenophora* e *Cochliobolus*, são conhecidos como importantes fitopatógenos que causam manchas foliares e doenças do grupo das ferrugens (LUTTRELL, 1973).

A família de Lophiostomataceae (Ordem Pleosporales) compreende 15 gêneros, cerca de 200 espécies (KIRK et al., 2001). O gênero *Lophiostoma* foi estabelecido por Cesati e De Notaris (1863) e revisado por Chesters e Bell (1970), Holm e Holm (1988), Barr (1990), e Yuan e Zhao (1994) e várias espécies foram adicionadas ao

gênero (HYDE e APTROOT 1998; BARR e MATHIASSEN 1998; HYDE et al., 2000). Holm e Holm (1988) consideraram *Platystomum* como sinônimo de *Lophiostoma*, e seu conceito de gênero tem sido seguido por alguns autores posteriores, como por exemplo Yuan e Zhao (1994), Checa (1997) e Kirk et al., (2001).

2.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS

Apesar dos endofíticos terem sido mencionados pela primeira vez em meados do século XX, mas no fim da década de 70, que os endofíticos começaram a adquirir importância científica, quando foi verificado que eles apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (AZEVEDO et al., 2002).

Os endofíticos foram inicialmente considerados como quaisquer micro-organismos que, em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais aéreos sem causar danos aparentes à planta hospedeira (CARROLL, 1986; PETRINI et al., 1991).

Os endófitos podem colonizar os tecidos vegetais ocupando espaços intercelulares, o interior de tecidos vasculares, ou mesmo intracelularmente. Segundo ARAÚJO et al. (2002), os mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes, estruturas florais tais como pólen, ovários, anteras e estames podem ser colonizados. Entretanto, fungos e bactérias parecem apresentar diferentes preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam. Fisher et al. (1992), isolaram bactérias e fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme, córtex do caule e folha) de plantas de milho saudáveis, e verificaram que as partes das plantas mais próximas do solo eram mais colonizadas por bactérias do que a parte superior. Já os fungos endofíticos parecem colonizar preferencialmente as partes aéreas da planta hospedeira e os espaços intercelulares (AZEVEDO, 2001).

Os fungos endofíticos vêm sendo estudados principalmente em plantas de regiões temperadas, e apenas a partir da última década em plantas das regiões tropicais (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006). Todas as espécies vegetais estudadas até o

momento apresentaram micro-organismos endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003; FIRAKOVÁ et al., 2007).

A comunidade endofítica desempenha estes efeitos favoráveis na planta porque é capaz de produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, antibióticos e diferentes metabólitos, os quais favorecem adaptação da planta perante várias condições. A síntese destas substâncias é induzida por condições de estresse da planta hospedeira como falta de água, presença de substâncias tóxicas, ataque de patógenos e ou insetos que afetam a interação da planta com o meio ambiente (NASCIMENTO 2006)

De acordo com as estimativas feitas por Hawksworth (2001), existe cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, dos quais apenas 5% estão descritos. Por outro lado, estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem na terra, cada uma hospede no interior de seus tecidos um ou mais fungos endofíticos, podendo chegar a estimativa de um milhão de espécies, considerando-se apenas os endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003). Consequentemente são grandes as chances de se encontrar novos micro-organismos endofíticos dentre os milhares de plantas nos diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos, constituindo-se numa fonte rica, de diversidade genética e, possivelmente, de novos produtos naturais (STROBEL e DAISY, 2003). Neste contexto, as florestas tropicais são consideradas ecossistemas com grande diversidade biológica quando comparadas às florestas temperadas (BILLS, 2002).

Essa diversidade implica em um contexto evolucionário, sobrevive o organismo capaz de estar em constante inovação química (BILLS, 2002). A competição constante, os recursos limitados e a pressão seletiva alta. Isto faz com que a probabilidade das florestas tropicais serem fontes de novas estruturas moleculares e combinações biologicamente ativas seja alvo de novas pesquisas em Bioprospecção (BILLS, 2002). O mesmo autor mostra que endofíticos de ambientes tropicais, fornecem um maior número de produtos naturais quando comparados com endofíticos de regiões temperadas, além disso, notou que é significativamente alto o número de endofíticos isolados em ambientes tropicais produzindo um grande número de metabólitos secundários ativos, se comparado com os fungos de

florestas temperadas. Esta observação sugere a importância do ambiente em que a planta hospedeira está inserida sobre o metabolismo dos endofíticos.

Existe uma troca de metabólitos secundários entre plantas e fungos, onde, algumas plantas que produzem produtos naturais fornecem metabólitos para os fungos endofíticos e vice-versa. O paclitaxol é um diterpenóide que apresenta atividade citotóxica e é utilizado na clínica como agente anticâncer. O paclitaxol foi originalmente encontrado em espécies vegetais do gênero *Taxus* (STIERLE et al., 1993). Mas, em 1993, outro paclitaxol, produzido pelo fungo *Taxonomyces andreanae*, foi isolado, caracterizado, a partir de endofíticos de *Taxus brevifolia*. Tan e Zou, (2001) definiram que alguns endofíticos produzem substâncias químicas de origem vegetal, e que esses produtos seriam originalmente característicos da planta hospedeira. Segundo estes autores, os produtos poderiam estar relacionados a uma recombinação genética do endofítico com a planta hospedeira que ocorre durante a evolução dos mesmos corroborando pelo fungo endofítico. Deste modo, caso o endofítico tenha habilidade de produzir, assim como a planta hospedeira, o mesmo metabólito bioativo, isto leva a necessidade de coletar plantas endêmicas, de crescimento reduzido e em ameaça de extinção, mas também preservar a biodiversidade. Além disso, é reconhecido que um produto de uma fonte microbiana pode ser mais fácil e econômico para produzir, reduzindo eficazmente seu custo no mercado (STIERLE et al., 1993). Dessa forma, mais informações sobre a biologia de uma determinada espécie de planta e dos micro-organismos endofíticos seriam essencialmente úteis para a busca por produtos bioativos. De acordo com a literatura, o papel dos endofíticos na natureza não está claro, mas sua relação com hospedeiros de várias espécies de plantas é bem conhecida (STROBEL e DAISY, 2003).

Vários isolados de fungos endofíticos, pertencentes à mesma espécie são obtidos da mesma planta e apenas um dos isolados têm a capacidade de produzir uma substância biologicamente ativa *in vitro* (LI et al., 1996). Além disso, existe uma grande incerteza em relação ao que os endofíticos produzem *in vitro* e o que podem produzir na natureza.

A produção de certas substâncias bioativas pelo endofítico pode facilitar a competição em seu nicho biológico dentro da planta podendo oferecer também

proteção para a planta contra micro-organismos patogênicos prejudiciais e invasores. Entretanto, esta afirmação só pode ser considerada verdadeira se o produto bioativo do endofítico for produzido somente por este e não pelo hospedeiro (LI et al., 1996).

Aparentemente, essas informações facilitarão o estudo da função do endofítico e o seu papel na planta, mas poucas informações existem referentes à bioquímica e fisiologia das interações do endofítico com a planta hospedeira. Fatores que alteram a biologia do hospedeiro como, por exemplo, a estação do ano, idade, ambiente e local podem influenciar na fisiologia do endofítico, bem como nas espécies de endofíticos presentes (STROBEL e DAISY, 2003). Uma definição do papel destes organismos na natureza fornecerá as melhores informações para um alvo particular com grande potencial para a bioprospecção (STROBEL e DAISY, 2003).

Vários metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos são potentes micotoxinas, produzidas durante a contaminação de alimentos sendo capazes de causar danos a humanos e animais, por meio de intoxicações agudas ou de efeito acumulativo, induzindo a distúrbios fisiológicos, como o câncer (BENNETT e KLICH, 2003). Fungos patogênicos a plantas, como *Alternaria alternata* e *Bipolaris* sp, produzem fitotoxinas que destroem os tecidos de suas hospedeiras (THOMMA, 2003). Apesar de sua habilidade de produzir toxinas, os fungos também são responsáveis pela produção de diversas substâncias empregadas diretamente para o tratamento de enfermidades, ou utilizadas como base para a síntese de fármacos (MISIEK e HOFFMEISTER, 2007; WEBER et al., 2007).

Os antibióticos produzidos por micro-organismos são definidos como produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular, ativos em baixas concentrações contra outros micro-organismos (DEMAIN, 1999). Os fungos endofíticos, frequentemente, são fontes desses antibióticos. Produtos naturais de fungos endofíticos inibem ou matam uma variedade de agentes causadores de doenças, incluindo fitopatógenos, bem como, bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam a população humana, os animais e as plantas (DEMAIN, 1999).

A região do semi-árido baiano apresenta alta diversidade biológica, ainda pouco explorada possuindo características para apresentar organismos resistentes a

condições extremas e, em conseqüência, enzimas de enorme potencial para aplicação em processos industriais (SENA et al., 2006). Tal fato também é importante para a restinga do Estado. A adaptação destes micro-organismos às condições ambientais extremas está ligada às estratégias bioquímicas. Seus componentes moleculares possuem propriedades que os tornam especialmente adequados para utilização em processos industriais, tornando atraente e promissora a bioprospecção (SANTOS et.al., 2011).

Segundo Santos et al. (2011) diversos trabalhos científicos têm demonstrado o potencial que os fungos endofíticos possuem por promoverem crescimento e ou controlarem patogenias em plantas. Caso essa potencialidade fosse verdadeiramente aplicada em sistemas agrícolas, esses micro-organismos seriam alternativas viáveis e baseadas em princípios ecológicos em substituição aos inseticidas e defensivos agrícolas.

As primeiras publicações com endofíticos demonstraram que a presença desses micro-organismos resultava na diminuição dos danos causados por fitófagos (OKI et al., 2009). Azevedo (1998) já relatava que os endofíticos podem ser potenciais promotores de crescimento de plantas ou agentes de controle biológico de patogenias; podem apresentar outros efeitos de importância em práticas agrícolas; podendo aumentar a tolerância de plantas à seca. Devido ao alto grau de deficiência de nutrientes da areia, as plantas são provavelmente altamente dependentes das bactérias e fungos para seu crescimento e sucesso ecológico. A adaptação de organismos às condições ambientais desfavoráveis leva a alteração de desenvolver componentes celulares de estratégias bioquímicas para a sobrevivência (GERDAY et al.,2000).

Mycelia sterilia ocorre com frequência em regiões tropicais (LODGE et al., 1996; BROWN, 1998; PHOTITA et al., 2001) provavelmente pelo fato de algumas espécies de fungos não se adaptarem as condições dos meios artificiais e só esporularem quando estão em associação com o hospedeiro.

2.5. COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR ENDOFITICOS

As plantas, micro-organismos e, em menor escala, animais apresentam um arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo encontram-se substâncias cuja produção e acúmulo estão restritos a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (WINK, 1990). A todo esse conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (SIMÕES et al., 2007). Os metabólitos secundários despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas produzidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas pela imensa atividade farmacológica desses compostos. Exemplo disso é a hipericina isolada de flores de *Hypericum perforatum* L, conhecida popularmente como erva de São João, é uma diantrona que provoca fotossensibilidade em animais albinos. Existem diversos métodos para a análise e identificação de metabólitos secundários produzidos por plantas e fungos. A análise de misturas complexas é usualmente feita, inicialmente por cromatografia em camada delgada (CCD), por comparação com os valores de fator de retenção (Rf) de substâncias conhecidas em diferentes sistemas eluentes e pela sua reatividade frente a diferentes produtos cromogênicos (VAN BEEK e VAN GESSEL, 1988). A CCD ainda permanece como um dos métodos preferidos para análise qualitativa de compostos conhecidos, pois não requer equipamentos sofisticados ou uma preparação laboriosa de amostra.

A bioautografia é uma técnica utilizada para a detecção de substâncias antimicrobianas sobre um micro-organismo específico inoculado em um recipiente específico com meio de cultura adequado, distribuído sobre uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD) após eluição da mistura a ser avaliada (BETINA, 1973; DIDRY et al., 1990; LUND; LYON, 1975; SAXENA et al., 1995).

Após o período de incubação, verifica-se a formação de um halo de inibição no composto com atividade antimicrobiana presente na amostra. Usando-se um revelador, podem-se visualizar com maior acuidade as áreas de atividade (HOSTETTMANN, 2003). Esse método vem sendo utilizado para a localização de compostos com propriedades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes a partir de matrizes vegetais e microbianas que após procedimento de purificação, identificação e ensaios complementares vem a contribuir para a descoberta de interessantes compostos para o desenvolvimento de medicamentos de uso clínicos (PIETERS; VLIETINCK, 2005).

2.6. RESTINGA

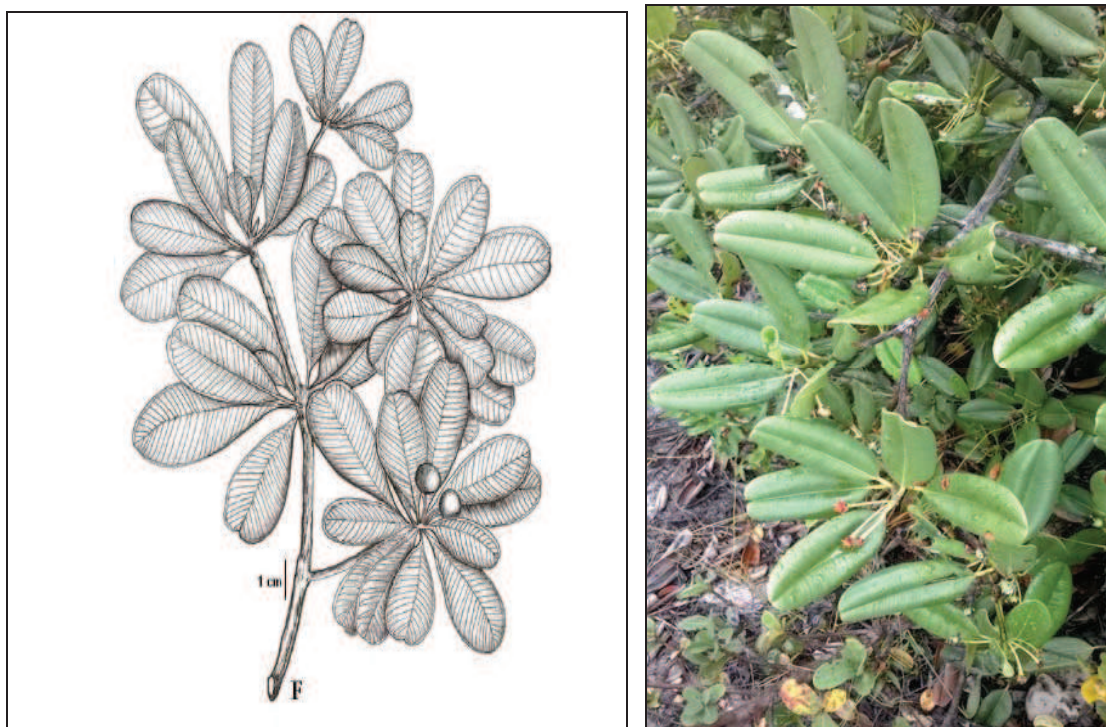
Nas regiões da costa brasileira, há a ocorrência de planícies formadas por sedimentos terciários e quaternários que foram predominantemente depositados em ambientes marinhos, continentais que são denominados de restinga (SILVA, 1999). De uma forma geral, a restinga é caracterizada por ser uma planície baixa com suaves ondulações e declives em direção ao mar. Além disso, o termo restinga possui um significado geomorfológico, dando conotação a qualquer depósito arenoso ao longo da costa (SUGUIO e MARTIN, 1987).

A vegetação das planícies costeiras brasileiras é bastante heterogênea, o Brasil possui litoral amplo, com áreas comuns de sedimentação quaternária que formam as restingas (SUGUIO e TESSLER, 1984). As restingas apesar de apresentarem uma série de aparências diferentes, mesmo separadas de modo físico, podem apresentar semelhanças (ARAÚJO e HENRIQUES, 1984). As restingas se destacam pelas grandes áreas que ocupam e pela formação de um ecossistema que possui íntima relação com o mar. As planícies arenosas constituem o substrato para várias comunidades vegetais que estão associadas à geomorfologia e apresentam adaptação às condições físicas e ambientais (CORDEIRO, 2005).

2.7. FAMÍLIA SAPOTACEAE

A família Sapotaceae compreende aproximadamente 1000 espécies de hábitos arbóreo e arbustivo, incluídas em cerca de 53 gêneros (SWENSON; ANDERBERG, 2005). Apresentam ampla distribuição nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (SOUZA; LORENZI, 2005). Algumas espécies de sapotáceas destacam-se por fornecer produtos economicamente importantes, como o látex destinado à fabricação da borracha e da goma de mascar, a madeira de excelente qualidade e durabilidade para fabricação de móveis e na construção civil e frutos comestíveis a depender da região (PENNINGTON, 1990; LORENZI, 2002).

Figura 01 - F- *Manilkara salzmannii* (E. B. ALMEIDA JR. e D. P. W. MEDEIROS 747, IPA) e Fonte autora



No Brasil as sapotáceas são representadas por aproximadamente 245 espécies distribuídas em 11 gêneros sendo os de maior interesse *Pouteria* Aubl. *Chrysophyllum* L. e *Manilkara* Adan. (MONTEIRO et al., 2007). No Nordeste, o gênero *Manilkara* apresenta 12 espécies, distribuídas nas áreas litorâneas, áreas de floresta

Atlântica, Restinga, Caatinga, Cerrado e em áreas com influência do bioma Amazônico (ALMEIDA JR., 2010).

A diminuição das populações vegetais tem gerado uma alteração ambiental que vem contribuindo para a perda da biodiversidade da família Sapotaceae, particularmente o gênero *Manilkara*, devido à exploração quanto ao uso da madeira, do látex e até pelo reduzido número de indivíduos na população (ALMEIDA JR., 2010).

O gênero *Manilkara* compreende o quarto maior gênero da família Sapotaceae e está representado no Brasil por, aproximadamente, 19 espécies distribuídas em diferentes tipos vegetais, com maior representatividade em áreas de Floresta Atlântica e Restinga (ANDRADE-LIMA, 1960). Em Alagoas destacam-se as espécies *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam (ALMEIDA JR., 2010; MEDEIROS et al., 2010) e *Manilkara rufula* (Miq.) H.J. Lam (ALMEIDA JR., 2010) com ocorrências nos litorais Norte e Sul do Estado.

A espécie *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam, conhecida como maçaranduba, caracteriza-se por apresentar porte arbóreo, geralmente de 10 a 25 m de altura, latescente, copa arredondada, tronco ereto e cilíndrico, casca grossa e fissurada longitudinalmente, 40 a 70 cm de diâmetro. Trata-se de uma planta perenifólia, heliófita e seletiva higrófila (ANDRADE-LIMA, 1960; PENNINGTON, 1990; LORENZI, 2002). Seus frutos são baga globosa e glabra, com 1 a 3 cm de diâmetro e cuja cor varia do verde ao marrom, sendo avermelhada quando maduro. Apresenta de uma a duas sementes pretas, brilhantes, e imersas numa polpa adocicada, branca e comestível (LORENZI, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de compostos bioativos de fungos endofíticos isolados de folhas e caule assintomáticas de *Manilkara salzmannii* (A.DC.) H.J.Lam da família Sapotaceae, coletada no litoral da Bahia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar fungos endofíticos provenientes de folhas e caule de uma planta, coletada da região de restinga no litoral de Salvador-Ba;
- b) Extrair biomoléculas provenientes do metabolismo dos fungos endofíticos isolados;
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana destas biomoléculas em *Staphilococcus aureus*; *Candida albicans*; *Corinebacterium pseudotuberculosis* ; *Pseudomonas aeruginosa*; *Serracia marcences*; *Echerichia coli*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Visando a prospecção de fungos e seus metabólitos secundários, este estudo foi realizado com o isolamento de endofíticos da planta *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam da família Sapotaceae, cuja ocorrência é comum na região litorânea de Salvador.

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprospecção (LAMAB) do Departamento de Biointeração, no Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

4.1. ÁREA E MATERIAL DE COLETA

O material biológico coletado, com o objetivo de realizar o isolamento dos fungos endofíticos, foi obtido a partir das folhas e caules de *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam, coletadas entre os meses de janeiro, março e maio de 2012, da planta em crescimento na área de restinga do Parque das Dunas (UNIDUNAS), área de preservação ambiental, localizada ao norte do município de Salvador na Praia do Flamengo, e parte do bioma da Mata Atlântica.

Figura 02 – Vista área do Parque das Dunas



Figura 03 – Coleta das folhas



O material foi separado, acondicionado em sacos de papel, para serem levados ao Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia - LAMAB para o isolamento dos fungos endofíticos, e outra amostra, preparada a exsicata que foi utilizada para a identificação da espécie, posteriormente catalogada e depositada no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB), do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

4.2. ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

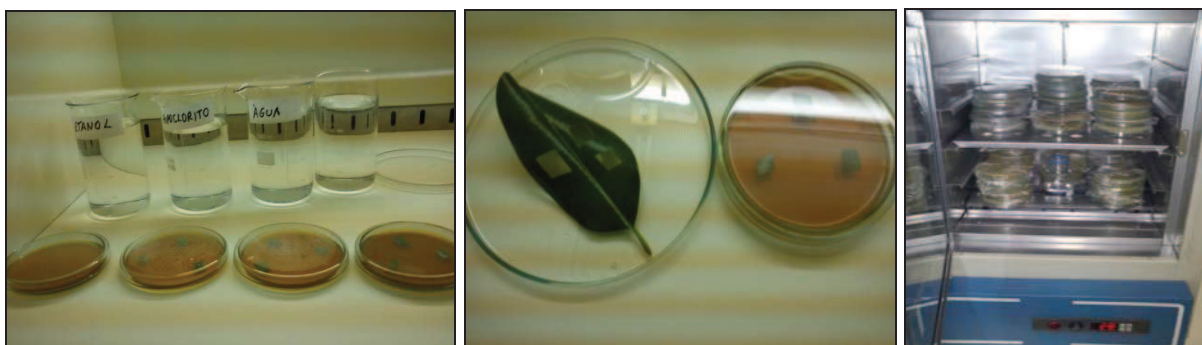
A metodologia de isolamento dos fungos endofíticos foi a recomendada em Melo e Azevedo (1998). As folhas e caules (tecidos vegetais saudáveis) coletadas e separadas previamente no campo, sem qualquer tipo de tratamento prévio ou ação sobre a microbiota residente, foram acondicionadas em sacos de papel previamente identificados.

No laboratório, as folhas e caules foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos sólidos, e desinfetados por meio de banhos sucessivos em álcool 70% (3

minutos), solução de hipoclorito de sódio 3% (4 minutos), álcool 70% (30 segundos) e finalmente lavados três vezes em água destilada esterilizada, para a retirada do excesso de álcool. Os controles foram efetuados com a inoculação da última água de lavagem em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose e Agar Batata Dextrose, com 0,1 mL e espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalsky, incubadas por 48 horas à 28°C.

Após o processo de desinfestação, os fragmentos das folhas foram recortados em pedaços de 4,0 x 0,5 cm e transferidos para placas de Petri (três fragmentos por placa) contendo meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose e Agar Batata Dextrose, em triplicata, e incubadas a 28°C por até 20 dias. A avaliação foi realizada a partir do terceiro dia, em intervalos de 2 a 5 dias. Com a observação de crescimento, foi realizada a repicagem para novas placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura, com a finalidade de se obter cultura pura, e também para a realização de observações macroscópicas, de coloração e características de crescimento para auxiliar na identificação das espécies.

Figura 04 – Técnica de desinfestação e incubação



Foi iniciada a triagem para extração e bioautografia (itens 4.7 e 4.8) com 6 isolados, devido a similaridade nas características morfológicas dos demais isolados, o que possibilitou a seleção de um isolado **MK001** o qual foi testado para todos os agentes microbianos.

PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS

Os isolados obtidos foram preservados pelo método Castellani (1967), onde colônias puras do fungo foram colocadas em um frasco contendo água destilada esterilizada, sendo posteriormente selados e armazenados em temperatura a 4°C.

4.4. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS

Para a extração de metabólitos, os isolados fúngicos foram inoculados individualmente em frascos de 1000 mL contendo Caldo Sabouraud, incubadas em agitador orbital a 28°C, 120 rpm por até 72 horas. Após o crescimento do fungo, o caldo e a cultura fúngica foram submetidos ao sistema de filtração, com filtro de 125 mm (Whatman 42). Os filtrados foram submetidos ao processo de extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas com os solventes acetato de etila, hexano e metanol na seguinte proporção (v.50:25:25), onde ocorreu a formação de duas camadas: a fase orgânica foi retirada e concentrada em um rotaevaporador a 45°C sob pressão reduzida. Os extratos obtidos (bruto) foram armazenados em criotubos a 4°C. Foram realizados testes, para a criação de um perfil de extração dos metabólitos (Tabela 01).

Figura 05 – Agitador Orbital e isolados



Tabela 01 - Quantidades utilizadas dos solventes para obtenção do extrato fúngico

	Extrato do fungo MK001	Solventes			
		Acetato de etila	Hexano	Metanol	Clorofórmio
	200mL	50mL	-	-	-
	175mL	50mL	50mL	0,25mL	-
	200mL	75mL	50mL	0,25mL	-
Proporção	100mL	50mL	45mL	0,5mL	25mL
	100mL	50mL	0,25mL	0,5mL	20mL
	200mL	100mL	50mL	0,5mL	45mL
	100mL	50mL	25mL	25mL	-

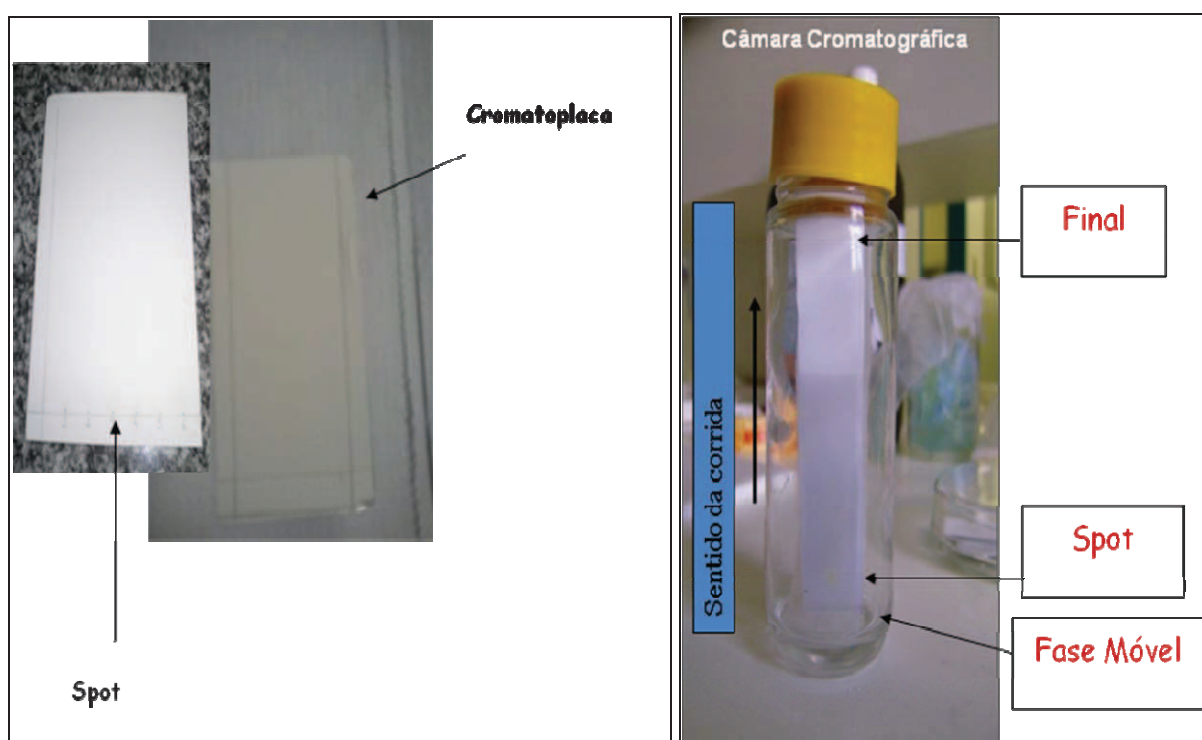
Figura 06- Extração Líquido Líquido



AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foi realizada a cromatografia de camada delgada (CCD) para avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana, dos compostos presentes nos extratos brutos, sendo utilizado cromatoplasmas preparativa de alumínio (TLC 1,5 x 8,0cm, sílica Gel 60 F254-366, 0,25mm de espessura – Merck). As cromatoplasmas foram esterilizadas em autoclave e secas durante o período de 48 horas em estufa a 37°C.

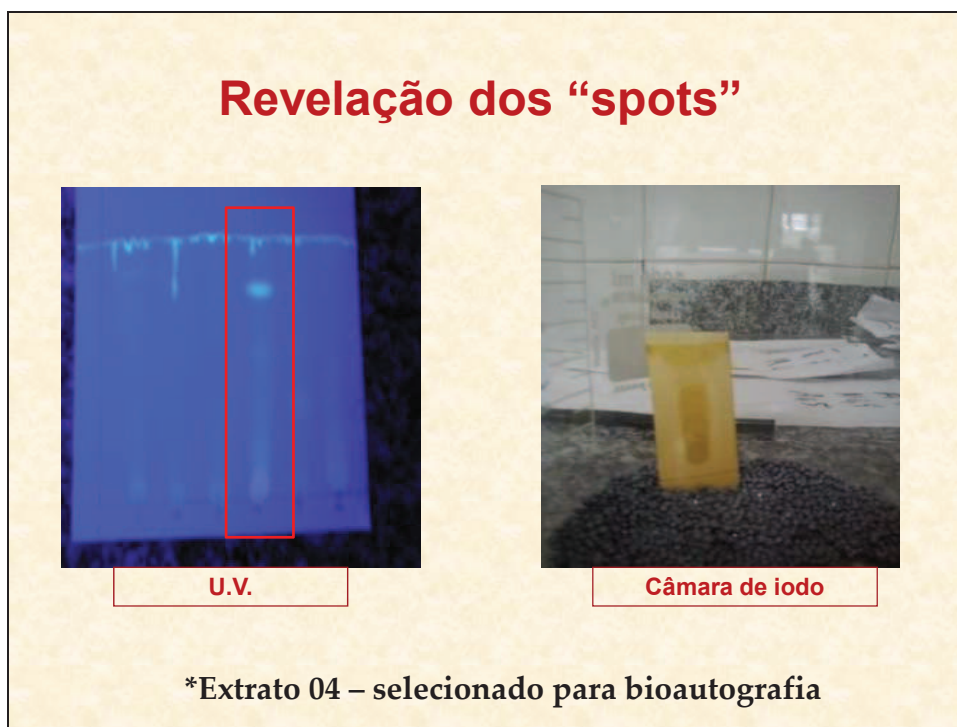
Figura 07- Cromatografia de Camada Delgada (CCD)



Para a montagem do teste de bioautografia, foi realizada em câmara de fluxo laminar, a aplicação dos extratos, nas cromatoplasmas, em um volume final de 10µL de cada extrato (fase estacionária) e uma distância de 1 cm entre os extratos. A eluição foi realizada com o uso dos sistemas de solventes (fase móvel), sendo acetato de etila/água/metanol na seguinte proporção 10/0,5/0,5 (mL). Após a eluição, as cromatoplasmas foram reveladas sob luz ultravioleta para visualização dos compostos presentes e, em câmara de iodo ressublimado para análise qualitativa. As bandas visualizadas foram demarcadas com lápis nº 02 e as placas, utilizadas posteriormente para os testes da bioautografia. A distância de migração das bandas

constituintes dos extratos foi analisada pelo cálculo do índice de retenção (Rf), dividindo a distância do centro das bandas relativa a linha de partida, pela distância total da corrida dos eluentes.

Figura 08 - Revelação da Cromatografia



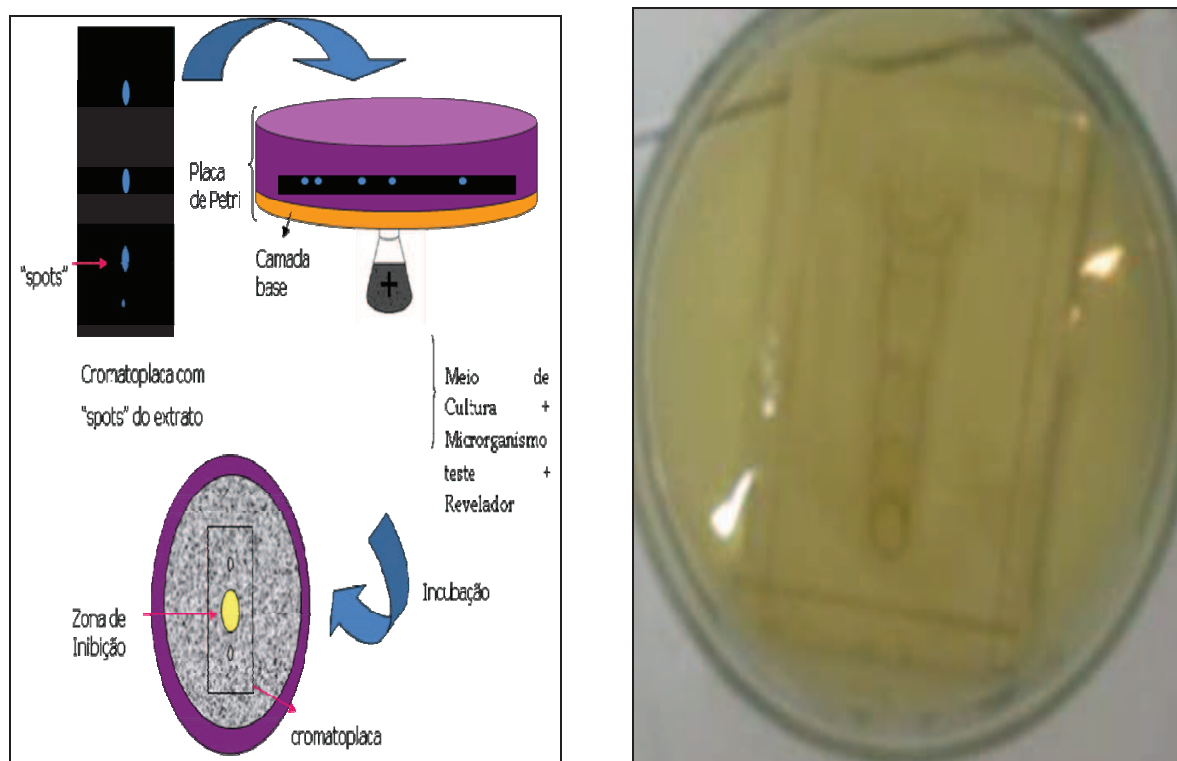
4.5.2. BIOAUTOGRAFIA

Para o preparo do inóculo microbiano foram utilizados linhagens ATCC de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10708, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium* sp. VD57 (isolado de caprino), *Candida albicans* ATCC18804, *Sphingobium xenophagum* 530 (isolado ambiental), *Serratia marcescens* (isolado ambiental). As bactérias foram ativadas em caldo de infusão cérebro e coração (BHI), incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação foram realizadas diluições para a concentração de $1,5 \times 10^8$ compatível com a escala 0,5 de McFarland.

Para o inóculo, preparado com a linhagem de *Candida albicans*, foi utilizado o meio seletivo caldo Sabouraud, incubado a 28°C por 24 horas. Com a mesma concentração do inóculo anterior ($1,5 \times 10^8/0,5$ de McFarland).

As placas cromatográficas obtidas na etapa de cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos fúngicos **MK001** foram alocadas em uma base Ágar-ágar em placa de Petri (90 x 10 mm). Em seguida foi vertido o meio específico para cada linhagem testada, em cima da cromatoplaça, e deixado em repouso por 3 horas. Após esse período, as culturas bacterianas e fúngicas foram inoculadas no sistema cromatoplaças/meio de cultura e incubadas em estufa de crescimento.

Figura 09- Montagem para realização da Bioautografia



4.6. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DO ISOLADO FÚNGICO COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.6.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

O fungo isolado foi inoculado em placa de petri contendo Agar Sabouraud Dextrose e incubado durante 10 dias. Em uma lâmina de microscopia, foi adicionada uma gota de lactofenol e em seguida fragmentos de micélio, obtidos pela raspagem da superfície da cultura com agulha de platina. Em seguida uma lamínula foi colocada sobre o material e levado ao microscópio óptico, onde o material foi analisado segundo padrões morfológicos para identificação do isolado.

No intuito de induzir a esporulação e em seguida observar microscopicamente como descrito anteriormente, foram utilizados diversos meios de cultura, como batata-dextrose ágar (BDA), rodela de cenoura auto clavada, Ágar Sabouraud, Ágar Malte, Meio mineral J.E.(MM)(JONES e EDINGTON,1968), acrescido do extrato da folha, Ágar Aveia, Meio extrato de tomate, Ágar dextose e farinha de milho.

4.6.1.1. TÉCNICA DO MICROCULTIVO

Para cada colônia de fungo isolada, duas placas de microcultivos foram preparadas, variando-se os meios, conforme descrição a seguir. Foi colocado sobre uma lâmina esterilizada sobre um pequeno bastão de vidro recurvado, contida em uma placa de Petri estéril, forrada com papel de filtro, um fragmento em cubo de Agar Sabouraud Dextrose e também um em Agar Batata Dextrose. O fungo foi inoculado nos quatro lados do cubo de ágar nos diferentes meios e a lâmina foi recoberta com uma lamínula esterilizada. O papel de filtro foi umidificado com 0,5mL de água destilada estéril, fazendo uma câmara úmida no fundo da placa, evitando-se a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. A placa foi tampada e incubada em BOD à 28°C por 7 a 10 dias, até a observação do desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação. Após, a lamínula foi retirada, com auxílio de uma pinça, cuidadosamente. Sobre uma lâmina foi pingado uma gota de corante azul de lactofenol-algodão (“Cotton Blue”) e montada sobre a lamínula do microcultivo. O cubo de ágar foi desprezado e, em seu lugar, pingou-se outra gota de corante azul e uma lamínula foi colocada, para visualizar esporos e hifas também aderidos à lâmina.

4.6.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS

4.6.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA

A metodologia utilizada foi a de Doyle e Doyle modificada (1987). Cerca de 50mg de micélio foi macerado em almofariz, com nitrogênio líquido e transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Após, foi adicionado 650 µl do tampão de extração* (com Mercaptoetanol e Proteinase K) e homogeneizado bem a mistura em vórtex. Os tubos foram colocados em banho-maria à 55°C por 1 hora, sendo, a seguir adicionado 650µL da mistura clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1, 4°C) e agitado gentilmente até a formação de um emulsionado. A seguir, os microtubos foram centrifugados por 5 min a 12000 rpm e a fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo. Foi adicionado 200µL do tampão de extração (sem Mercaptoetanol e Proteinase K) adicionado de 650µL de clorofórmio: álcool-isoamílico (24:1, 4°C). O tubo de microcentrífuga foi agitado e centrifugado por 5 min a 12000 rpm. Novamente, foi coletada a fase aquosa superior e transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Estes passos foram repetidos novamente e depois à fase aquosa superior foi adicionado um volume igual de isopropanol a -20°C. As amostras foram incubadas a -20°C por 15 a 20 min. Após, foram centrifugadas por 5 min a 12000 rpm e o sobrenadante desprezado. Os “pellets” foram lavados com 1,0mL de etanol 70% por duas vezes e centrifugados por 3 min a 12000 rpm. Em seguida foram secos à temperatura ambiente e o material ressuspendido em tampão TE 50µL (contendo 1,5 µL RNase 10 µg.mL⁻¹). As amostras foram colocadas em estufa a 37 °C em tempos variados e após, conservadas em freezer a -70°C.

4.6.2.2. SEQUENCIAMENTO

O DNA genômico do isolado **MK001** foi submetido à amplificação de fragmentos por PCR de duas regiões, a do gene ITS (“Internal Transcribed Spacer”) e do gene

TEF1- α ("translation elongation fator"1 alfa da RNA polimerase). Os primers utilizados foram respectivamente ITS1(5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') combinado com ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') descrito por White (1990) e EF1-728F (5'- CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG - 3') descrito por Carbone e Kohn (1999) combinado com EF2T (5'- GGARGTACCAGTSATCATGTT - 3') descrito por O'Donnell E Cigelnik (1997). As reações da PCR foram preparadas em um volume total de 25 μ L composta por: 5 μ L de tampão 5x , 2,0 μ L de dNTPs, 2,0 μ L de MgCl₂, 0,75 μ L de cada primer, 0,4 μ L de Taq DNA polimerase, 2,0 μ L de DNA e 12,1 μ L de água MilliQ autoclavada. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (peqSTAR 96 universal gradiente) programado para um ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 15 ciclos de 94°C por 2 min, 65°C por 30 s, 72°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento.

O sequenciamento das amostras ocorreu de acordo com o método de Sanger et al., (1977) e as reações foram preparadas em um volume final de 10 μ L, composto por, 4,1 μ L de água ultrapura, 2,0 μ l do tampão de seqüenciamento 5X (Applied biosystems), 0,4 μ L de primer (10 pM/ μ L), 2,5 μ L de DNA da amostra e 1,0 μ L de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems). O DNA foi ressuspendido em 10 μ L de formamida e aquecido a 93 °C por 3 minutos, resfriado rapidamente em freezer -20°C. Posteriormente, as mostras foram submetidas à reação em seqüenciador do tipo ABI prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem). A condição de injeção das amostras foi de 2 Kv por 30 segundos. A condição de eletroforese foi de 12 Kv por 120 min.

A verificação da qualidade das sequências geradas e a edição de acordo com o eletroforetograma gerado foi realizada com o software Sequencher 5.0. Estas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos com o banco de dados Biolo MICn Net Software (Fungal Barcoding: <http://www.fungalbarcoding.org/BioloMICSSequences.aspx?file=all>).

A edição e montagem dos contigs foram realizadas com o programa Sequencher 5.0 (HALL, 1999). Para realizar a identificação molecular, o programa BLAST

(ALTSCHUL et al., 1997) foi usado para comparar as sequências obtidas com aquelas encontradas nos bancos de dados públicos.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

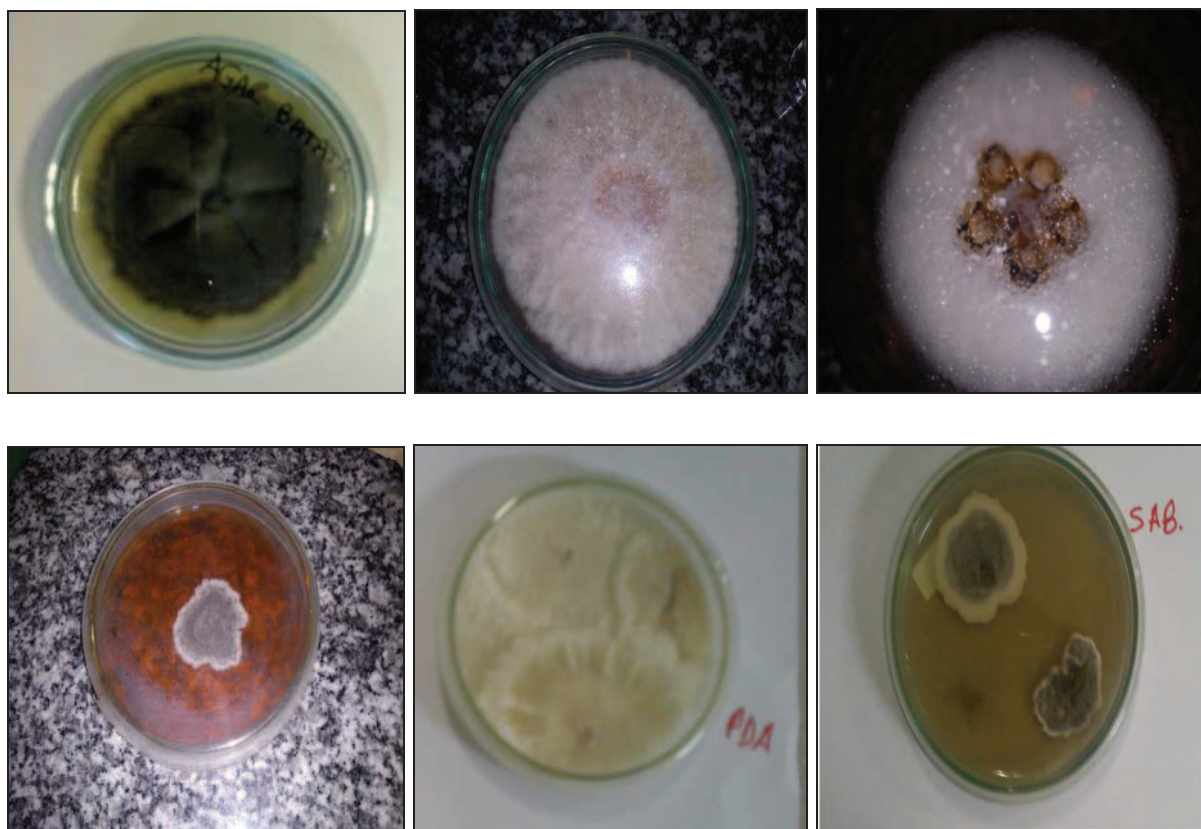
5.1. ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

A busca por novos compostos com atividade antimicrobiana, e principalmente em modelos biológicos pouco estudados significa um desafio. Os biomas são formados por uma diversidade de espécies de plantas, condições edafo-climáticas e alterações com a atividade antrópica. Essas condições que durante milhões de anos modularam as espécies e sua evolução tem ligação direta com a presença e a atividade dos micro-organismos (ARAÚJO e RAHBK, 2006). A interação com organismos, como plantas e animais direciona a fisiologia e a genética destes micro-organismos, direcionando a relações simbióticas, com processos envolvendo a interação intra e extracelular, mas dentro do tecido do hospedeiro, quando existe este tipo de relação, podem-se denominar, no caso de plantas, micro-organismos endofíticos, o que pode ser benéfico ou mesmo deletério, como no caso de fitopatógenos (KNAPP et al, 2012; ORLANDELLI et al., 2012).

O processo de desinfestação utilizado foi eficiente, pois, não foi observado o crescimento de micro-organismos no plaqueamento em meio de cultura, da última água da lavagem.

Após a incubação das amostras das folhas e caules, da planta *Manilkara salzmannii* (A.DC.) H. J. Lam. em meio ágar-Sabouraud, observou-se o crescimento de fungos em todas as placas, tendo o crescimento iniciado principalmente a partir das extremidades de cada fragmento de folha, o que pode representar uma evidência, da relação endofítica. Após o período de incubação, foram observadas colônias fúngicas, sem o crescimento de bactérias, devido principalmente aos repiques sucessivos e sem a utilização de antibióticos.

Figura 10- Fungos morfotipos isolados da *Manilkara salzmannii*



Utilizando a maçaranduba (*Manilkara salzmannii*) como modelo, foi possível isolar fungos com características importantes para a bioprospecção, similar ao realizado por outros autores (ORLANDELLI et al, 2012; BHAGOBATY e JOSHI, 2011), o número baixo de isolados aproximadamente 06 (seis) pode significar para esta planta uma certa dominância da Ordem Pleosporales, e do complexo Lophiostoma/Massarina (ZHANG et al., 2009). O número de isolados de fungos endofíticos obtidos pode variar de acordo com os ecossistemas onde se encontra as plantas hospedeiras, isso quer dizer que as espécies vegetais apresentam adaptações estruturais e fisiológicas, segundo MÜLLER & WAECTHER (2001). Mas, novos trabalhos devem ser realizados visando aprofundar os estudos de predominância de espécies de fungos endofíticos.

Foi observado um número alto de fungos que não esporularam em cultura, o que tem sido mencionado também por outros autores em trabalhos com endofíticos em hospedeiros tropicais (PEREIRA et al., 1993; SURYANARAYANAN et al., 1998;

PHOTITA et al., 2001). Isso talvez aconteça pelo fato de não encontrarem nos meios de cultura artificiais, os mesmos fatores existentes nos seus hospedeiros em condições naturais. Suryanarayanan et al. (1998), Kumaresan & Suryanarayanan (2001) afirmam que a baixa taxa de fungos endofíticos predominam em um único hospedeiro, o que também foi observado nesta pesquisa. Esse predomínio pode ser explicado pelo fato de que alguns fungos endofíticos apresentam uma certa especificidade por tecido e por hospedeiro descritos pelos autores (RODRIGUES, 1991; PHOTITA et al., 2001) (SURYANARAYANAN et al., 1998; SURYANARAYANAN & KUMARESAN, 2000). Photita et al. (2001) verificaram que a especificidade pelos tecidos do hospedeiro poderia ser consequência da preferência da espécie dominante e poderia refletir sua capacidade para utilizar nutrientes existentes no hospedeiro, acrescentam que alguns fatores, como: tipo de cutícula, textura e mudanças na fisiologia e química dos tecidos do hospedeiro podem influenciar a especificidade. Segundo Suryanarayanan & Kumaresan (2000) o hospedeiro é mais determinante para a distribuição dos fungos endofíticos, do que o fator localização geográfica.(SURYANARAYANAN et al.,1998;KUMARESAN & SURYANARAYANAN, 2001), esses autores relatam que fungos endofíticos em vegetação de manguezal em Pichavaram, na Índia, mostraram que, em cada estudo, houve uma diferente espécie dominante, essa descrição corrobora com os achados no trabalho em estudo. Deve haver algum mecanismo que distribui os fungos endofíticos entre os diferentes hospedeiros e essa distribuição poderia ser vista como uma estratégia desenvolvida por esses fungos a fim de reduzir a competição. Essa descrição que ocorreu nas plantas de mangue se assemelham com o que ocorreu no estudo com a planta *Manilkara salzmannii* de restinga.

Dentre os isolados obtidos, foi utilizado um único isolado para as etapas de bioautografia, mas, não foi possível caracterizar em termos de micromorfologia, devido a dificuldade na indução da esporulação. Segundo Souza, (2004), a identificação de micro-organismos isolados de plantas, principalmente os fungos filamentosos, é muito complexa, a taxonomia de fungos é tradicionalmente baseada na comparação da morfologia e desenvolvimento de estruturas de reprodução assexuada e sexuada, principalmente em organismos fastidiosos ou de difícil esporulação.

No presente estudo, os nove meios de culturas utilizados não forneceram informações suficientes para uma identificação até o nível de espécie. Considerando que o crescimento *in vitro* do fungo estudado pode não representar seu comportamento natural, devido à ausência das condições ecológicas quando em associação com a planta hospedeira. Por conta disso, em relação aos diferentes tempos de crescimento, os endofíticos analisados foram classificados nos seguintes grupos: 1- crescimento rápido: atingem o crescimento em três dias; 2- crescimento mediano: atingem o crescimento de quatro a oito dias e 3- crescimento lento: atinge o crescimento em nove dias. Segundo Knapp et al., (2012) os fungos de crescimento lento, denominados fastidiosos são geralmente escuros e possuem hifas melanizadas, septadas e microescleródios, por esta razão são de maior dificuldade para identificação por métodos convencionais. Após a obtenção de fungos endofíticos ser realizada com sucesso, o cultivo e a extração para a identificação através de caracteres morfo-métricos, não foi bem sucedida, principalmente devido a indução da esporulação, onde Zhang et al., (2009) determina que para o complexo de fungos isolados, necessita de luz próximo ao ultravioleta com o comprimento de onda variando entre 320-400 nm. Segundo Fungaro (2001), novos métodos têm sido desenvolvidos, e envolvem desde a triagem dos metabólitos até o estudo da variabilidade do DNA por técnicas de PCR.

5.2. BIOENSAIOS

Diversos fatores podem influenciar na produção de metabólitos ativos contra micro-organismos como, por exemplo, a planta hospedeira, a localização do fungo na planta, o substrato em que o fungo é cultivado, temperatura, pH e aeração (STROBEL e DAISY, 2003;). Para algumas espécies, consideradas fastidiosas, como o complexo filogenético dos gêneros *Lophiostoma*/*Massarina* outras características devem ser abordadas, como a indução por um determinado comprimento de onda de luz ultra violeta, para cultivo e esporulação (ZHANG et al., 2009). Encontrar a condição ideal para crescimento e produção de metabólitos *in vitro* representa um dos desafios nos estudos com fungos endofíticos.

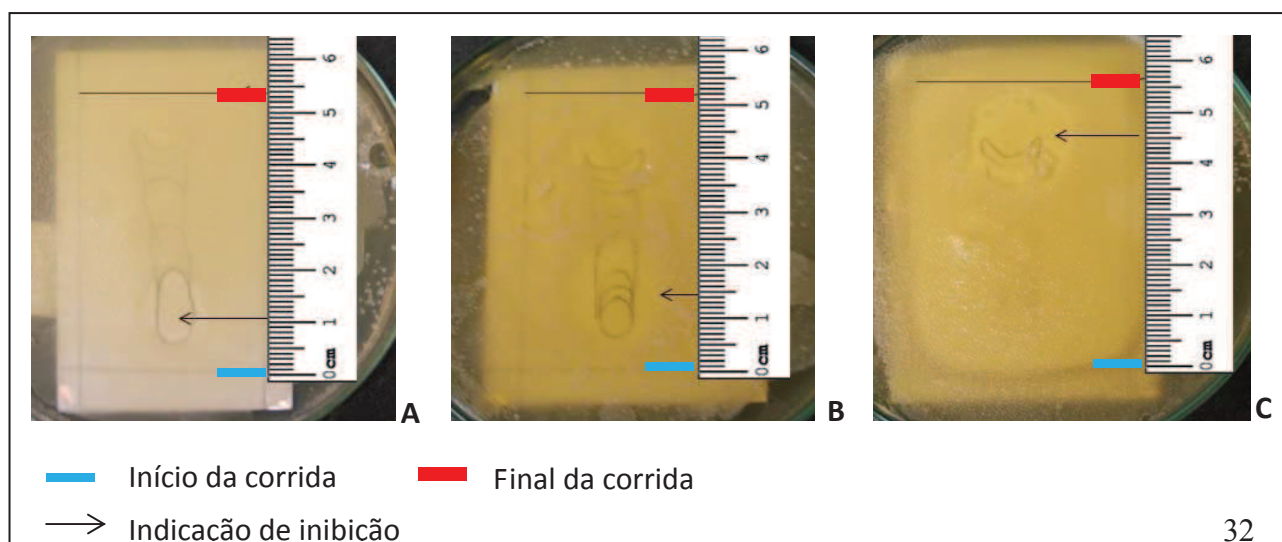
No caso do cultivo em batelada, para a extração de compostos bioativos, foram obtidas duas frações, uma apolar e outra mais polar, onde a polaridade foi

importante para a observação de compostos bioativos, principalmente na porção apolar, conforme sugerido por Schulz et al., (2002). Há um grande interesse pelos estudos de endófitos de plantas medicinais, a fim de se descobrir novos compostos, já que os pressupostos da interação endófito-hospedeiro sugerem que as propriedades terapêuticas podem estar no endófito e não na planta ou, provavelmente, na interação entre ambos (GOMES-FIGUEIREDO, 2006). Fármacos de alto valor agregado podem ser produzidos a partir de micro-organismos endofíticos extraídos de uma pequena porção de tecido vegetal, mantendo assim a produção de compostos com potencial biotecnológico.

O sistema cromatográfico para a separação das biomoléculas utilizado neste experimento empregou, na fase estacionária, placa de sílica em gel que possui estabilidade polar e a fase móvel (partições de solventes) com polaridade crescente. As frações foram visualizadas sob luz UV e também revelados em câmara de iodo ressublimado, posteriormente marcados em função da intensidade (SANTOS et.al., 2011).

O melhor sistema de solvente para a eluição foi hexano: acetato de etila: água (100:17:13 v/v). Foi observado também que após a visualização em lâmpada ultravioleta as frações de solvente de todos os extratos apresentaram melhor eluição e visualização das bandas cromatográficas, conforme observado na Figura 7.

Figura 11 - Placas de bioautografia dos extratos fúngicos (MK001), representando a zona de inibição de crescimento, das linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(A); *Corynebacterium* sp. VD57 (B) e *Candida albicans* ATCC18804(C).



Visto que muitas plantas medicinais estão ameaçadas de extinção devido ao extrativismo predatório, a busca de endófitos com potencial farmacológico adquire também importância ecológica (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Os dados obtidos sobre a inibição do crescimento de micro-organismos não foi direcionado a um grupo de micro-organismo, apesar de diferentes frações do mesmo extrato inibirem fungos (*Candida albicans* ATCC18804) e bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Corynebacterium* spVD57).

Novos esforços devem ser realizados, visando um aumento na concentração do extrato e na resolução da fração com atividade microbiana, através de técnicas como espectroscopia do infravermelho e espectrometria de massas.

O extrato do fungo endofítico MK001 inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium* sp. VD57 e *Candida albicans* ATCC18804. Pode se observar que para cada linhagem testada, o extrato de MK001 apresentou frações de inibição diferentes, identificado pelo valor do índice de retenção (Rf), onde **A**: *Staphylococcus aureus* (Rf: 0,22); **B**: *Corynebacterium* sp. (Rf: 0,28); **C**: *Candida albicans* (Rf: 0,8) indicam substâncias ou frações com um perfil individual para cada linhagem testada, o que sugere a presença de pelo menos 3 diferentes substâncias com a atividade, o que poderia ser confirmada com técnicas mais refinadas.

Nos extratos do fungo MK001, não encontramos frações com atividade antimicrobiana para as linhagens testadas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosae* e *Serratia marcescens* (isolado ambiental), constatado pela ausência de halos de inibição, isto para a extração com o solvente acetato de etila/ metanol / água, o que pode indicar que as frações com atividade estão na porção apolar.

A identificação dos fungos, realizada após os bioensaios, foi realizada com o isolado MK001 que demonstrou atividade antimicrobiana, mas não foi possível obter estruturas de reprodução para a identificação, não sendo possível caracterizar por meio da micromorfologia. Para realizar a identificação foram utilizadas técnicas de sequenciamento e análise de perfis, com os fragmentos obtidos por PCR.

A evolução das metodologias da biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente tem contribuído para o grande avanço do conhecimento sobre a

diversidade microbiana. Resultados de estudos dependentes e independentes dos isolamentos e cultivos, baseados em amplificação e seqüenciamento de fragmentos de gens demonstram que a diversidade de micro-organismos em amostras ambientais é ampla (HEAD et al., 1998; HUNTER-CEVERA, 1998)

O isolado MK001 apresentou identidade genética de 99,13% com a do gênero *Lophiostoma* sp (ZJ-2008011) na região intergênica, como demonstrado na Tabela 02, assim como as demais sequencias alinhadas também pertencem a espécies próximas e do mesmo gênero. O sequenciamento da outra região (TEF) resultou em baixa identidade genética com espécies do gênero *Lophiostoma*, abaixo de 50%, e identidade maior, mas não significativa, para outros gêneros como *Fusarium*. Devido à divergência de informação taxonômica a partir da análise do sequenciamento, apesar de indicar identidade ao gênero *Lophiostoma*, não foi possível concluir a que espécie este isolado pertence, podendo supor uma nova espécie do gênero.

O gênero encontrado *Lophiostoma* sp pode representar uma espécie nova, evidenciado pelos resultados de sequenciamento e homologia/similaridade da região ITS e TEF, o que corrobora com esta evidência o porcentual de identidade e as árvores filogenéticas. Segundo Steiner e Philippsen (1993), o gene TEF (fator de alongação 1 α), dependendo do número de cópias no genoma, pode diferenciar novas espécies. A região ITS, largamente utilizado, pode gerar dados que são importantes para a definição do gênero, enquanto TEF e também a β -tubulina auxiliam na determinação de uma nova espécie, isto deve ser considerado em conjunto com aspectos morfológicos.

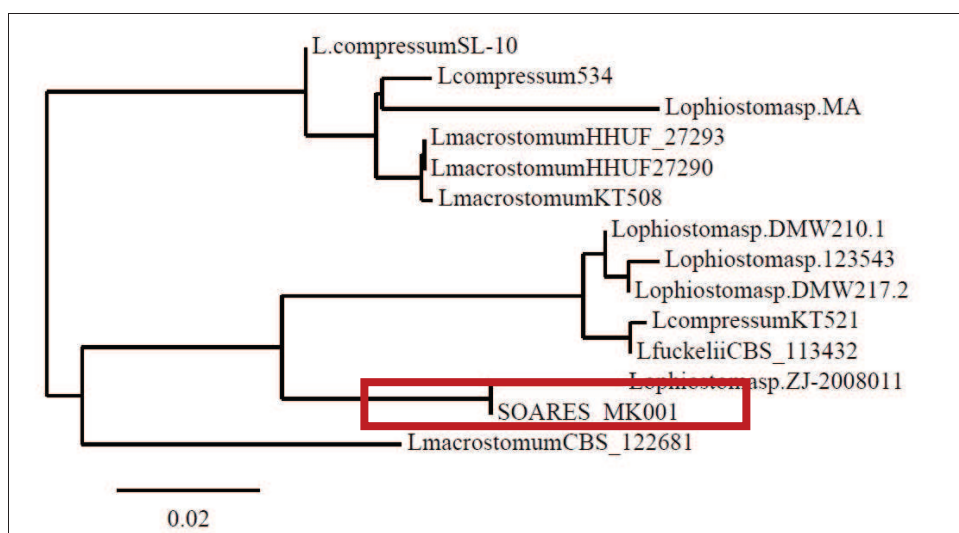
Tabela 02 - Grau de identidade do fragmento ITS do isolado MK001.

Gene	Número de Acesso	Fragmento sequencia do (pb)	Espécie / Correspondência	Identidade
ITS	JF694929.1	459	<i>Lophiostoma</i> sp. ZJ-2008011	99,13%

As sequências de nucleotídeos obtida do isolado MK001 foi submetida ao alinhamento pelo software ClustalW2 (EMBL-EBI) e em seguida utilizadas para construção de árvores filogenéticas correspondentes aos dois fragmentos sequenciados (ITS e TEF). As sequências do GenBank que apresentaram maior correspondência e associadas ao mesmo gênero de identidade (*Lophiostoma*) foram selecionadas para análise filogenética. As árvores filogenéticas, representadas nas Figuras 02 e 03, foram construídas por meio do método de neighbor joining, com base de 1.000 réplicas de “bootstrap”, utilizando o software ClustalW2Phylogeny (EMBL-EBI). Os valores mostrados nas árvores são dados em porcentagem de “bootstrap”.

A representação da relação filogenética, baseada nas sequências de ITS, onde o isolado MK001 apresenta uma maior identidade com o gênero *Lophiostoma* sp, mas não relacionado com uma espécie, podendo ser observada na Figura 3.

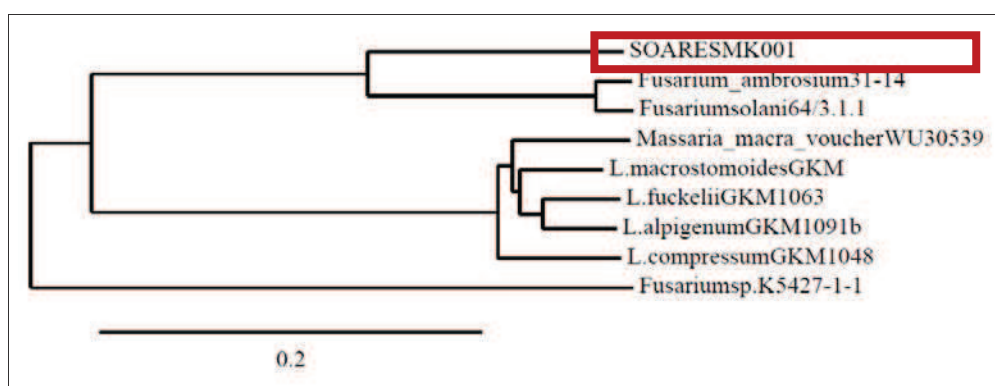
Figura 12 -- Análise filogenética do isolado fúngico MK001 e isolados com correspondência do banco de dados a partir da sequência do gene ITS. O taxon é representado pela espécie seguida da sigla do isolado.



A árvore construída a partir do sequenciamento e análise do fragmento TEF, utilizada principalmente para corroborar as informações obtidas com ITS (WALKER

et al., 2012) e também, podendo ser complementado com fragmentos de gene da β -tubulina, para definir uma nova espécie, está representada na Figura 03. Relatado por outros autores, os dados encontrados neste trabalho, mostram a divergência na Ordem Pleosporales, principalmente no complexo *Lophiostoma* / *Massarina* (ZHANG et al., 2009). Estes dados reforçam a possibilidade do isolado MK001 representar uma nova espécie a ser descrita, onde a caracterização macro-morfológica se faz necessária.

Figura 13 -- Análise filogenética do isolado MK001 representado a distância para o fragmento de TEF.



Para Strobel e Daisy (2003), a diminuição de habitats com características para o endemismo de plantas, como florestas tropicais, restingas e cerrado, pode comprometer a bioprospecção e descoberta de novos compostos, com atividade benéfica para o homem nas áreas de saúde, meio ambiente e indústria.

6. CONCLUSÕES

- Neste estudo, o isolamento de fungos endofíticos da planta maçaranduba (*Manilkara salzmannii*) apresentou um número baixo de espécies.
- A extração de metabólitos do sobrenadante de cultivo em caldo do fungo obteve componentes apolares e polares.
- Frações apolares do extrato fúngico inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium sp.* VC57 e *Candida albicans* ATCC18804.
- Para cada isolado de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Corynebacterium sp.* VC57 e *Candida albicans* ATCC18804 a fração com capacidade de inibição foi diferente, mesmo provenientes do mesmo extrato fúngico, sugerindo diferentes compostos.
- Análises moleculares e filogenéticas indicaram identificação para o gênero *Lophiostoma sp.*
- Faz-se necessário a indução de esporulação e análise macro e micromorfológica das estruturas de reprodução de *Lophiostoma sp.* para descrever a espécie nova.
- O isolamento do fungo *Lophiostoma sp.* da planta *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam. representa o primeiro relato científico deste gênero como endofítico em planta da restinga.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados apresentados demonstraram a relevância em se estudar a diversidade de endofíticos em plantas da Restinga com relação ao potencial biotecnológico e taxonômico, abrindo portas para novos e promissores estudos
- Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram o potencial biotecnológico de fungos endofíticos em produzir substâncias bioativas, com atividade antimicrobiana e antifúngica sobre patógenos humanos.
- Os dados apresentados não estabeleceram a natureza dos compostos responsáveis pela ação antifúngica e antibacteriana, verificando-se a necessidade de caracterização química dos compostos presentes nos respectivos extratos brutos e frações;
- Outros isolados fúngicos obtidos neste trabalho poderão ser testados posteriormente para atividade antimicrobiana
- Ficou constatado o potencial do fungo *Lophiostoma* sp., além da caracterização de uma nova espécie

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, 2002.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W., & BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4 ed. John Wiley and Sons, 1996.

ALMEIDA JR, E. B. **Diversidade de Manilkara Adans. (Sapotaceae)** para o Nordeste do Brasil, 2010.158f. **Tese** (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**.v.25, n17, p.3389-3402,1997.

ANDRADE-LIMA, D. **Estudos fitogeográficos de Pernambuco**. 2 ed. Recife: IPA. p. 305-341, 1960.

ANDRADE, L. R. **Restinga Net**. Disponível em <<http://www.restinga.net>>. Acesso em 05.01.2013.

APTROOT, A. A world revision of *Massarina* (Ascomycota). **Nova Hedwigia**, v. 66 p.89-162, 1998.

ARAUJO, D. S. D. & LACERDA, L. D. **A Natureza das Restingas**. Ciência Hoje, v. 6, n. 33, p. 26 – 32, 1987.

ARAUJO, D.S.D. & HENRIQUES, R.P.B. 1984. Análise florística das restingas do Estado do Rio de Janeiro. *In* Lacerda, L.D. de et al. (orgs.). **Restingas: Origem, Estrutura e Processos**. Niterói, CEUFF. p.159-194.

ARAÚJO, W. L., LIMA, A. O. S., AZEVEDO, J. L., KUKLINSKY, S. LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de micro-organismos endofíticos**. Departamento de Genética. Escola superior de Agricultura “Luis Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

AZEVEDO, J. L. **Microorganismos endofíticos**. IN:MELO, I.S.;AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Editora da Embrapa, 1998. p.117-137.

AZEVEDO, J.L. **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. In: MELO, I.S. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p.445-461.

AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M. Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. Guaíba: **Agropecuária**, 2001. 463 p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. **Microorganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais**. In: AZEVEDO, J.

L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p. 269-294.

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

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants**. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. *Fungi: Multifaceted Microbes*. New Dehli: Anamaya Publication, 2006. p.189-207.

AZEVEDO, J. L. . **Genética de Microrganismos**. 1. ed. Goiânia: Editora Universidade de Goiás, 1998. v. 1. 478p.

ARAÚJO, M.B. & C. RAHBEK. How does climate change affect biodiversity? **Science** v.313,p.1396-1397, 2006.

BARR, M.E. **North American flora, Melanommatales (Loculoascomycetes)**. Series II, parte 13, p.1- 129, 1990.

BARBIERI, E. **A variedade de vida no planeta terra**, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2010.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n. 3, p. 497 -516, 2003.

BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. **Journal of Chromatography A**. v. 78, p. 41-51, 1973,1973.

BARREIRO,J.L.,bolzani,v.s. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Quimica Nova**,v.32, n°3, p.679-688, 2009.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of antibiotics**, v.58, n.1, p.1-26, 2005.

BILLS G, DOMBROWSKI A, PELAEZ F, POLISHOOK J, An Z. **Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi**. In: Watling R, Frankland JC, Ainsworth AM, Isaac S, Robinson CH editor. *Tropical Mycology: Micromycetes*. New York: CABI Publishing, 2002;

BHAGOBATY, R.K, JOSHI,S.R. Metabolite profiling of endophytic fungal isolates of five ethno-pharmacologically important plants of Meghalaya, India. **Journal of Metabolomics and Systems Biology**, v.2, n. 2, p. 20-31, 2011.

BROWN, K. B.; HYDE, K. D. & GUEST, D. I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, n. 1, p. 27-51, 1998.

CALIXTO, J.B. BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE MEDICAMENTOS. **Ciência e Cultura**, v.55, n. 3, São Paulo, 2003.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de ciência do Solo, 1992, 360p.

CARROL, G.C. **The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials**. In: FOKKEMA, N. and VAN DEN HEUVAL (eds.) *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, 392 p, 1986.

CARROLL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1316-S1324, 1995. Supplement 1.

CASTELLANI, A. A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungiof man in sterile distilled water. Further researches. **Jour. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CESATI V, DE NOTARIS G. Schema di classificazione degle sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere *Sphaerianell*l'antico significato attribuitoglide Persono. **Comm Soc crittog Ital** v.1, p.177–420, 1893.

CHECA J. Annotated list of the Lophiostomataceae and Mytilinidiaceae (Dothideales, Ascomycotina) reported from the Iberian Peninsula and Balearic Islands. **Mycotaxon** v.63, p.467–491,1997.

CHESTERS, C.G.C. AND BELL, A. Studies in the *Lophiostomataceae*. **Mycological Paper**, v.120, p. 1-51, 1970.

DEMAIN, A.L. SMALLBUGS,BIG BUSINESS: The Economic Power of the Microbe. **Biotechnology Advances**, v.18, p.499-514, 2000.

DEMAIN, A. **Idiolites from micro-organisms: a brilliant past, a bright future. In 2000 Years of Natural Products Research, Past, Present and Future**. Proceedings of the congress held July 26030, Amsterdam, The Netherlands Edited by Luijendijk, T. 1999.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. New procedure for direct bioautographic TLC assay as applied to a tincture of *Ranunculus bulbosus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n.3, p. 283-290, 1990.

FIRÁKOVÁ S., STURDÍKOVÁ M., MÚCKOVÁ M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganism associated with plants. **Biologia**, v. 62, p. 251-257, 2007.

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

Oxford, v.122, p. 299-305, 1992.

FISHER, P. J.; PETRINI, L. E.; SUTTON, B. C. & PETRINI, O. A study of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Gynoxis oleifolia* Muchler (Compositae) from Ecuador. **Nova Hedwigia**, v. 3-4, n. 60, p. 589-594, 1995.

FLEMING, A. Section four: 30 Oct. 1928. ff. 15-16. Discovery of Penicillin. **The British Library**, 2006.

Fungaro, M.H.P. PCR na Micologia Diagnóstico e Análise de Variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**,v.14, p.1216, 2001.

Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georlette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meuwis M, Feller G. Cold adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trend. Biotechnol.** v.18,p.103-107, 2000.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of *primer* sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p.1323 – 1330, 1995.

GOMES-FIGUEIREDO, J. A. Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp. 2006. 136 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HALL, T.A. BioEdit: a user:friendly biological sequence alignment editor and analysis. Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Research Symp.**v.41,p.95-98,1999

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species stimated revisited, **Mycological Research**, v.105, p.1422-1431, 2001.

HEAD,I. M.;SAUNDERS,J.R.;PICKUP,R.W. Microbial evolution,diversity,and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **Microbial Ecology**, New York, v.35, p.1-21,1998.

HOLM, L. AND HOLM, K. Studies in the Lophiostmataceae with emphasis on the Swedish species. **Symbolae Botanicae Upsalienses**, v.28, p. 1-50, 1988.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. Sao Carlos: Edufscar, 2003.

HUNTER-CEVERA,J.C. The value of microbial diversity. **Current opinion in Microbiology**, London, v.1, p. 278-285,1998.

HYDE, K.D. AND APTROOT, A. Tropical freshwater species of the genera *Massarina* and *Lophiostoma* (ascomycetes). **Nova Hedwigia**, v. 66, p. 489-502, 1998.

- LARSEN, T.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K.; HANSEN, M.; FRISVALD, J. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Report**, 22, p. 675-695, 2005.
- LI, J.Y.; STROBEL, G.A.; SIDHU, R.; HESS, W.M.; FORD, E.J. Endophytic taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. **Microbiology, New York**, v.142, p.2223-2226, 1996.
- LODGE, D. J., FISHER, P. J., SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 5, n. 88, p. 733-738, 1996.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa - Instituto Plantarum, p.512., 2002.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v.2. São Paulo: Nova Odessa - Instituto Plantarum de Estudo da Flora, p.384, 2002.
- LUND, B. M.; LYON, G.D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. Herbicola* on thin-layer chromatograms. **Journal of Chromatography A**. v. 110, n. 1, p. 193-196, 1975.
- Luttrell ES Loculoascomycetes. In: Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS (eds) The fungi, vol IVA. **Academic Press, New York**, pp 135–219, 1973.
- KIRK PM, CANNON PF, DAVID JC, STALPERS JA (eds) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 9th edn. **CAB International**, Wallingford, 2001.
- KNAPP, D.G.; PINTYE, A.; KOVÁCS, G.M. The Dark Side is not fastidious – Dark septate Endophytic Fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. **Plos ONE**, v.7, p. 32570, 2012.
- KREUZER, H. & MASSEY, A. 2002. **Engenharia genética e biotecnologia**. Porto Alegre: Artmed, 2 ed. 434 p.
- Kropf, M. S; Quinet, A; Andreato, R. H. P.. Lista Anotada, Distribuição e Conservação das Espécies de Lauraceae das Restingas Fluminenses, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, n. 57. p. 161 – 180, 2006.
- KUMARESAN, V. & SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, v. 11, n. 105, p.1388-1391, 2001.
- MEDEIROS, D. P. W.; SANTOS-FILHO, F. S.; ALMEIDA JR., E. B.; PIMENTEL, R. M. M.; Carmen Sílvia ZICKEL, C. S. Estrutura do Componente Lenhoso de uma Restinga no Litoral Sul de Alagoas, Nordeste, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física, Recife, PE**, v.3, p. 146-150, 2010.

MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. **Planta Medica**, v.73, n. 2, p.103 -115, 2007.

MONTEIRO, M.H.D.A.; NEVES, L.J.; ANDREATA, R.H.P.. Taxonomia e anatomia das espécies de Pouteria Aublet (Sapotaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Pesquisas, Botânica** v.58,p. 7-118,2007.

Müller, S.C.; Waechter, J.L. Estrutura Sinusial dos componentes herbáceo e arbustivo de uma floresta costeira subtropical. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24,n.4, 395-406, 2001.

NASCIMENTO, A.K.C.L. Desenvolvimento de um vetor bifuncional para bactéria endofítica *Enterobacter agglomerans* e *Escherichia coli*. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, p. 103 –116, 1997.

OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M. S.; CORRÊA JUNIOR, A.; FERNANDES, G. W. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, Sao Leopoldo, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

ORLANDELLI, R.C., ALBERTO, R.N., ALMEIDA, T.T., AZEVEDO, J.L., PAMPHILE, J.A. **In vitro Antibacterial Activity of Crude Extracts Produced by Endophytic Fungi Isolated from Piper hispidum Sw.**, v.2, n.10, p.137-141, 2012.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in applied Microbiology**, v.44, p.1-68, 1997.

PENNINGTON, T. D., **Flora Neotropica – monograph 52 Sapotaceae**, The New York Botanical Garden, p.1-2, 1990.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J.L. & PETRINI, O. Brief Article: Endophytic fungi of *Stylosanthes*: A first report. **Mycologia**, v. 3, n. 85, p. 362-364. 1993.

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

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

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P. & HYDE, K. Endophytic fungi of

wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 12, n. 105, p. 1508-1513, 2001.

PIETERS, L. AND VLIETINCK, A.J. BIOGUIDED isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.57-60, 2005.

RODRIGUES, K. F. Fungos endofíticos em *Euterpe oleracea* Mart., com ênfase em Xylariaceae. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Botânica**, v. 2, n. 7, p. 429- 439, 1991.

RODRIGUES, K. F. & SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research**, v. 6, n. 94, p. 827-830, 1990.

SÁ, C. F. C.; PEREIRA, M. C. A. As Planícies Arenosas Costeiras (“Restinga”) no Brasil: Democratizando uma Base Bibliográfica. **Revista Gerenciamento Costeiro Integrado**, v. n. 1, p. 48 – 49, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, S. N.; BARRETO, M. M.; BARRETO, MERCEDES, A.M.; ROQUE, M. R. A. **Bioprospecção de biomoléculas originadas do metabolismo secundário de rizobactérias isoladas do semi-árido**. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007. v. UNICOS.

SANTOS, S.N, Antifungal activity of bacterial strains from the rizosphere of *Stachytarpheta crassifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.4996-5000, 2011.

SAXENA, G.; FARMER, S.; TOWERS, G. H. N.; HANCOCK, R. E. W. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochemical Analysis**. v. 6, n.3, p. 125-129, 1995.

SCARANO, F.R. 2002. Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic rain forest. **Annals of Botany** 90:517-524.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.T. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **The British Mycological Society**, v.106, p.996-1004, 2002.

SENA FILHO JG, MELO JGS, SARAIVA AM, GONÇALVES AM, PSIOTTANO MNC, XAVIER HS. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Rev Bras Farmacogn.** v.16,p. 506-509, 2006.

SIMÕES, C.M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy research**, v.13, n.4, p.323, 328, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, p.1102,2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 640p. 2005.

STEINER, S.; PHILIPPSEN, P. Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. **Mol Gen Genet**, v. 242, p.263-271,1993.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

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

SUGUIO, K.; TESSLER, M.G. Planícies de cordões litorâneos do Brasil: origem e nomenclatura. *In*: Lacerda, L.D. de et al. (orgs.). **Restingas: origem estrutura e processos**. Niterói, CEUFF.p.15-26, 1984.

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON, E. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 44, p. 1003-1006, 1998.

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V. Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. **Mycological Research**, v. 12, n. 104, p. 1465-1467, 2000.

SWENSON, V.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v.21, n. 2, p. 101-130, 2005.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. **Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites**. **Natural Product Reports**,v. 18, p.448-459, 2001.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n.3, Uberaba. May / June, 2000.

THOMMA, B. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.226-236, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 183-200; 459-460; 590-592.

TRIGUEIRO, M. G. S. **O clone de prometeu: a biotecnologia no Brasil: uma abordagem para a avaliação**. Brasília, DF: Editora da UnB, v. 1. 239p, 2002.

VAN BEEK TA, VAN GESSEL MAJT. **Alkaloids: chemical and biological perspectives**. In: Pelletier SW (Ed.) *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. New York: John Wiley, p. 75, 1988.

WALKER, D. M.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; WHITE JR, J.F. New molecular markers for fungal phylogenetics: Two genes for species-level systematics in the sordariomycetes (Ascomycota). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.64, p.500-512, 2012.

WEBER, R.W.S.; KAPPE, R.; PAULULAT, T.; MOSKER, E.; ANKE, H. Anti *Candida* Metabolites From Endophytic Fungus. **Phytochemistry**, v.68, p.886-892, 2006.

Weber RWS., Kappe R., Paululat T., Mosker E., Anke H. Anti- *Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v.68, p 886-982, 2007.

WINK, M. **Physiology of secondary product formation in plants**. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M.J.C. (ed). *Secondary products from plant tissue culture*, Oxford: Clarendon, 1990.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press: New York, USA: 315–322, 1990.

YUAN, Z.Q. AND ZHAO, Z.Y. Studies on lophiostomataceous fungi from Xinjiang, China. **Sydowia**, v. 46, p. 162-184, 1994.

ZHANG, Y.; WANG, H.K.; FOURNIER, J.; CROUS, P.W.; JEEWON, R.; POINTING, S.B. AND HYDE, H.D. Towards a phylogenetic clarification of *Lophiostoma* /*Massarina* and morphologically similar genera in the pleosporales. **Fungal Diversity** v. 38, p. 225-251.