



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS**

**FUNGOS ENDOFITÍCOS DE *Hancornia speciosa* Gomes: IDENTIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**RECIFE (PE) - BRASIL  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Hancornia speciosa* Gomes: IDENTIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Pernambuco  
como requisito para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Biológicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Marilene da Silva Cavalcanti

**RECIFE (PE) - BRASIL  
2013**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Chagas, Mardonny Bruno de Oliveira**

**Fungos endofíticos de *Hancornia speciosa* Gomes: identificação e atividade antimicrobiana/ Mardonny Bruno de Oliveira Chagas– Recife: O Autor, 2013.**

**86 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima**

**Coorientadora: Marilene da Silva Cavalcanti**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Fungos 2. *Hancornia Speciosa* 3. Plantas medicinais I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orientadora) II. Cavalcanti, Marilene da Silva (coorientadora) III. Título**

**579.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 153**

**MARDONNY BRUNO DE OLIVEIRA CHAGAS**

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Hancornia speciosa* Gomes: IDENTIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Bianka Santana dos Santos  
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**DEDICATÓRIA**

*À Marli, Mirella e Izabela.*

“O que fizemos apenas por nós mesmos morre  
conosco. O que fizemos pelos outros e pelo  
mundo permanece e é imortal”.

Albert Pike

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** e a **Nossa Senhora** pela dádiva da vida, pelas pessoas que colocou em meu caminho, pela possibilidade de realizar este trabalho, e por me auxiliar nos momentos de dificuldade e aflição.

À **minha família**, em especial a minha mãe **Marli** e minha irmã **Mirella**, por todo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha noiva **Izabela** pelo companherismo, apoio constante e incentivo nessa jornada.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima**, pela oportunidade, ensinamentos, pela disponibilidade em todas as situações e por suas preciosas sugestões. Meu muito obrigado pelo apoio na concretização deste trabalho.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Marilene da Silva Cavalcanti**, pela oportunidade, acolhimento, sábios conselhos e contribuição na realização deste estudo. Meu muito obrigado por toda dedicação.

Às Profas. **Tereza Correia** por sua gentil disponibilidade em várias ocasiões; **Janete Magali**, pelo acolhimento sem restrições no Depto. de Antibióticos; **Débora Massa** e **M<sup>a</sup>. José Fernandes**, representando a Micoteca-URM, pela colaboração na identificação dos fungos isolados.

Aos meus amigos, **Irailton Prazeres** pela força, disponibilidade e valiosas sugestões na realização deste trabalho; **Ana Paula Sant'Anna** por toda ajuda e generosidade; **David Leal** pelo incentivo e pelas alegrias compartilhadas.

Aos **meus colegas** de laboratório, que diretamente e indiretamente me ajudaram a vencer mais este objetivo em minha vida.

À **Propesq**, através do **Programa Reuni** pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento desse projeto.

À **Universidade Federal de Pernambuco** pela oportunidade oferecida.

## RESUMO

Entre os micro-organismos endofíticos, os fungos têm despertado o interesse da comunidade científica especialmente por seu potencial na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras. *Hancornia speciosa* Gomes, conhecida como mangabeira, é uma espécie frutífera da família Apocynaceae bastante utilizada na medicina popular para diversos fins. Este trabalho teve como objetivo contribuir no conhecimento da micobiota endofítica associada a *H. speciosa* e avaliar o potencial antimicrobiano destes micro-organismos. Os fungos endofíticos foram isolados da casca do caule de *H. speciosa* em diferentes períodos do ano. Foram isolados 116 fungos endofíticos pertencentes a 14 espécies, sendo *Phoma cava* a espécie mais frequente (13,8%), seguida de *Colletotrichum gloeosporioides* (12,1%) e *Lasiodiplodia theobromae* (11,2%). Todos os isolados foram submetidos ao ensaio antimicrobiano em meio sólido com bloco de ágar. Os micro-organismos teste utilizados foram *Staphylococcus aureus* - UFPEDA - 02, *Bacillus subtilis* - UFPEDA - 86, *Escherichia coli* - UFPEDA - 224, *Klebsiella pneumoniae* - UFPEDA - 396, *Pseudomonas aeruginosa* - UFPEDA - 416, *Proteus mirabilis* - UFPEDA - 767, *Candida albicans* URM - 5825, *Candida krusei* UFPEDA - 1002, *Candida tropicalis* URM - 5871 e *Malassezia furfur* URM - 4220. No total, 39 dos 116 fungos endofíticos apresentaram atividade antimicrobiana frente a, no mínimo, um micro-organismo teste com as médias dos halos de inibição variando de 11 a 39 mm de diâmetro. Após a triagem antimicrobiana, os isolados *Aspergillus flavus* (FHS012), *A. flavus* (FHS018), *Aspergillus niger* (FHS058), *A. niger* (FHS059), *A. niger* (FHS061), *Fusarium solani* (FHS105), *F. solani* (FHS106), *Lasiodiplodia theobromae* (FHS070), *L. theobromae* (FHS074) e *Penicillium fellutanum* (FHS089) apresentaram os melhores resultados entre todos e seguiram para o cultivo em meio semi-sólido de arroz e milho por 21 dias. Após este período, foram obtidos os extratos metanólicos brutos dos fungos endofíticos e determinadas as concentrações mínimas inibitória (CMI) e bactericida/fungicida (CMB/CMF) através do método de microdiluição em caldo. As CMI's variaram entre 19 e 2.500 µg/mL<sup>-1</sup> e as CMB's / CMF's entre 312 e >5.000 µg/mL<sup>-1</sup>. Esses resultados demonstram o grande potencial antimicrobiano dos fungos endofíticos desta planta medicinal. Em pesquisas futuras poderão ser identificados compostos bioativos, provavelmente derivados da complexa interação endofítico/hospedeiro, como sua utilização no desenvolvimento de novas drogas.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana; Fungos endofíticos; *Hancornia speciosa*.

## ABSTRACT

Among the microorganisms endophytic, fungi have attracted the interest of the scientific community especially for its potential in the production of metabolites of economic interest, including those related to the host plants. *Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is a fruitful species of the family Apocynaceae typical widely used in folk medicine for various purposes. This work aimed to contribute to the knowledge of the microbial endophytic mycobiota associated with *H. speciosa* and evaluate the antimicrobial potential of these microorganisms. The endophytic fungi were isolated from the stem bark of *H. speciosa* in different periods of the year. Were obtained 116 isolates of endophytic fungi belonging to the 14 species, being *Phoma cava* the most frequent species (13.8%) followed by *Colletotrichum gloeosporioides* (12.1%) and *Lasiodiplodia theobromae* (11.2%). All isolates were subjected to antimicrobial assay in solid medium with agar block. The test microorganisms used were *Staphylococcus aureus* - UFPEDA - 02, *Bacillus subtilis* - UFPEDA - 86, *Escherichia coli* - UFPEDA - 224, *Klebsiella pneumoniae* - UFPEDA - 396, *Pseudomonas aeruginosa* - UFPEDA - 416, *Proteus mirabilis* - UFPEDA - 767, *Candida albicans* URM - 5825, *Candida krusei* UFPEDA - 1002, *Candida tropicalis* URM - 5871 and *Malassezia furfur* URM - 4220. In total, 39 of the 116 endophytic fungi showed antimicrobial activity against at least one test microorganism with the average of inhibition halos varying from 11 to 39 mm in diameter. After screening antimicrobial isolates *Aspergillus flavus* (FHS012), *A. flavus* (FHS018), *Aspergillus niger* (FHS058), *A. niger* (FHS059), *A. niger* (FHS061), *Fusarium solani* (FHS105), *F. solani* (FHS106), *Lasiodiplodia theobromae* (FHS070), *L. theobromae* (FHS074) and *Penicillium fellutanum* (FHS089) showed the best results among all and followed for cultivation in semi-solid rice and corn medium for 21 days. After this period, we obtained the crude methanol extracts of endophytic fungi and determined the minimum inhibitory concentrations and bactericidal/fungicidal through the broth microdilution method. The MICs ranged from 19 to 2500  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  and the CMBs / CMFs between 312 and  $>5000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ . These results demonstrate the great antimicrobial potential of endophytic fungi of medicinal plant, in future research may be identified bioactive compounds, probably derived from the complex interaction endophytic/host, such as its use in developing new drugs.

**Keywords:** Antimicrobial activity; Endophytic fungi; *Hancornia speciosa*.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 01. Hipótese do equilíbrio antagônico -----                                                                                                          | 17 |
| 02. Paclitaxol, substância anticâncer isolada da conífera <i>Taxus brevifolia</i> e por seu hospedeiro endofítico <i>Taxonomyces andreanae</i> ----- | 19 |
| 03. Criptocandina, substância antifúngica isolada do extrato de <i>Cryptosporiopsis quercina</i> -----                                               | 20 |
| 04. Criptocina, substância antifúngica isolada de <i>Cryptosporiopsis quercina</i> -----                                                             | 21 |
| 05. Ácido coletótrico, substância antimicrobiana isolada de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> -----                                              | 21 |
| 06. Griseofulvina, substância antifúngica isolada de <i>Xylaria</i> sp. -----                                                                        | 22 |
| 07. Brefeldin A, substância antimicrobiana isolada de <i>Cladosporium</i> sp. -----                                                                  | 22 |
| 08. Estrutura do éster acetato de isoamila -----                                                                                                     | 23 |
| 09. Estrutura dos ácidos citônico A (A) e B (B), inibidores de protease, obtidos do fungo endofítico <i>Cytonaema</i> sp.-----                       | 24 |
| 10. Citochalasina E, substância anticâncer produzida pelo endofítico <i>Rhinocladiella</i> sp., isolado da planta <i>T. wilfordii</i> -----          | 25 |
| 11. Hierarquia taxonômica de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes -----                                                                                   | 29 |
| 12. <i>Hancornia speciosa</i> Gomes -----                                                                                                            | 30 |
| 13. Fruto de <i>H. speciosa</i> -----                                                                                                                | 31 |

### Primeiro Capítulo

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 01. Fluxograma do processo de isolamento, purificação e identificação dos fungos endofíticos ----- | 75 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

### Primeiro Capítulo

**Tabela 01.** Frequência absoluta e frequência relativa de fungos endofíticos de *H. speciosa* por período do ano----- 72

**Tabela 02.** *Screening* de atividade antimicrobiana de fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa* ----- 73

**Tabela 03.** Concentração mínima inibitória e bactericida/fungicida dos extratos metanólicos brutos de fungos endofíticos de *H. speciosa* ----- 74

## SUMÁRIO

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                              | <b>11</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                   | <b>13</b> |
| 2.1 Micro-organismos endofíticos.....                                                   | 14        |
| 2.2 Fungos endofíticos.....                                                             | 15        |
| 2.3 Interação dos fungos endofíticos com as plantas .....                               | 16        |
| 2.4 Importância dos fungos endofíticos.....                                             | 17        |
| 2.4.1 Promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal por<br>fungos endofíticos ..... | 17        |
| 2.4.2 Produtos naturais produzidos por fungos endofíticos.....                          | 18        |
| 2.4.2.1 Antibióticos produzidos por fungos endofíticos.....                             | 20        |
| 2.4.2.2 Inibição de agentes virais por fungos endofíticos.....                          | 23        |
| 2.4.2.3 Antitumorais produzidos por fungos endofíticos .....                            | 24        |
| 2.4.3 Outros compostos produzidos por fungos endofíticos.....                           | 25        |
| 2.4.4 Fungos endofíticos no controle de pragas e patógenos.....                         | 26        |
| 2.5 Infecções causadas por micro-organismos patogênicos .....                           | 26        |
| 2.6 <i>Hancornia speciosa</i> Gomes .....                                               | 29        |
| 2.6.1 Descrição botânica.....                                                           | 30        |
| 2.6.2 Aspectos gerais .....                                                             | 32        |
| 2.6.3 Compostos isolados e atividades biológicas .....                                  | 33        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                                               | <b>35</b> |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Objetivo geral.....                                                                                                   | 36 |
| 3.2 Objetivos específicos .....                                                                                           | 36 |
| 4. REFERÊNCIAS .....                                                                                                      | 37 |
| 5. PRIMEIRO CAPÍTULO .....                                                                                                | 53 |
| 5.1 Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da<br>casca do caule de <i>Hancornia speciosa</i> Gomes ..... | 54 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                                       | 76 |
| 6.1 Conclusões .....                                                                                                      | 77 |
| 7. ANEXOS .....                                                                                                           | 78 |



Evolutivamente, as plantas vêm desenvolvendo complexos mecanismos adaptativos, incluindo a capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos (Neto *et al.* 2002). Os micro-organismos que, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar dano aparente ao seu hospedeiro são denominados endofíticos (Azevedo *et al.*, 2000). Nas últimas duas décadas, os micro-organismos endofíticos, especialmente os fungos ocuparam uma posição de destaque na produção de metabólitos bioativos (Araújo *et al.*, 2010). Estes organismos representam uma importante fonte genética para a biotecnologia, tendo estimulado o interesse da comunidade científica devido à produção de metabólitos secundários com aplicações, principalmente, na indústria alimentícia e farmacêutica (Strobel & Daisy, 2003). Os fungos endofíticos são fontes de novos antibióticos, imunossupressores e substâncias anticâncer (Ferrara, 2006).

As infecções (bacterianas e fúngicas) estão entre as principais causas de morte no mundo (OMS, 2008). Alguns micro-organismos patogênicos desenvolveram resistência às drogas já existentes, além disso, o desenvolvimento de novas doenças e o fluxo contínuo de viajantes (von Nussbaum *et al.*, 2006) contribuem ainda mais para o agravamento desta situação. Diante do exposto, verifica-se a necessidade da descoberta de novas drogas que sejam mais efetivas e menos tóxicas, por isso, a triagem de micro-organismos e plantas produtores de metabólitos bioativos, provavelmente, oriundos de suas interações representa uma nova alternativa no combate às infecções.

*Hancornia speciosa* Gomes, conhecida popularmente como mangabeira, ocorre espontaneamente em várias regiões do país, principalmente nas baixadas litorâneas do Nordeste, onde é mais abundante (Aguiar-Filho *et al.*, 1998), pertence a família Apocynaceae e à ordem *Gentianales* (Cronquist, 1988). Na medicina popular *H. speciosa* é utilizada no tratamento de tuberculose, úlceras, diabetes e verrugas, as cascas do caule são utilizadas em afecções dos pulmões e fígado, câimbras e luxações (Almeida *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2004; Silva-Júnior, 2005). Estudos realizados com extratos de *H. speciosa* apresentaram atividades antibacteriana, antiinflamatória, anti-hipertensiva, anti - *Helicobacter pylori*, além de atuarem como vasodilatadores e redutores de peso (Serra *et al.*, 2005; Endringer *et al.*, 2006; Vratimos *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2008; Thomazi, 2010). Estas propriedades fundamentam a investigação dos fungos endofíticos associados a *H. speciosa* e sua relação com a atividade antimicrobiana desta planta medicinal.



## 2.1 Micro-organismos endofíticos

Uma grande variedade de micro-organismos pode viver associada aos vegetais, tanto em sua superfície, epifíticos, como em seu interior, endofíticos. No sentido literal, a palavra “endofítico” (do grego *endon*, no interior de; *phyton*, planta) significa “dentro da planta”. Muitas definições têm-se aplicado ao termo “micro-organismo endofítico” ou simplesmente endófito. Carroll (1986); Petrini (1991) e Cabral *et al.* (1993) denominaram como aqueles organismos, em sua maioria bactérias e fungos, que passam todo ou uma fase do seu ciclo de vida colonizando tecidos vegetais aéreos sem causar sintomas aparentes de doença a planta hospedeira.

Outra definição, apresentada por Hallmann *et al.* (1997), sugere endófitos como micro-organismos que podem ser isolados de tecidos vegetais, após desinfecção externa e que não causam, aparentemente, danos as plantas. Azevedo e Araújo (2007) definiram endófitos como sendo todo micro-organismo, cultivável ou não, que coloniza o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis. Mais tarde, Mendes e Azevedo (2007) ampliaram a definição anterior considerando, adicionalmente, a divisão de micro-organismos endofíticos em dois tipos, sendo: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta.

Para penetrar no vegetal hospedeiro os endofíticos podem viver como epifíticos por certo tempo, bem como, um micro-organismo endofítico pode tornar-se patogênico em um vegetal em certas condições de estresse (Araújo *et al.*, 2010). Dessa maneira, a diferenciação dos termos tem função meramente didática, entre eles existe um gradiente que é intrínseco à Biologia de forma geral (Azevedo *et al.*, 2002).

Os endofíticos estão presentes em todas as espécies vegetais analisadas até o momento (Araújo *et al.*, 2010). Em geral, dezenas a centenas de endofíticos podem ser isolados de uma única planta e, a partir deste único hospedeiro, pelo menos uma espécie se mostra específica, confirmando a importância dos endofíticos como componente da diversidade microbiana (Tan & Zou, 2001; Strobel & Daisy, 2003).

A presença de micro-organismos endofíticos pode ser observada em todos os tecidos e órgãos vegetais incluindo, entre outros, raízes, caules, folhas, flores e frutos (Kobayashi & Palumbo, 2000; Mcinroy & Kloepper, 1995; Melnick *et al.*, 2008; Piccolo *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2007). Alguns são mais frequentes em determinado tipo de vegetal, designados dominantes, em contraposição há outros mais raros, chamados de secundários (Pileggi, 2006). Eles podem penetrar e colonizar os vegetais

hospedeiros, principalmente, pelos estômatos, ferimentos e raízes, porém, podem também estar presentes em sementes de diversas espécies vegetais (Araújo *et al.*, 2010).

A maioria dos estudos com endofíticos tem sido realizada em plantas de clima temperado, entretanto, recentemente, plantas de clima tropical têm sido pesquisadas quanto à presença, quantidade e qualidade de endofíticos encontrados (Azevedo & Araújo, 2007).

## 2.2 Fungos endofíticos

Petrini (1991) definiu os fungos endofíticos como micro-organismos que colonizam os tecidos sadios de partes aéreas das plantas em algum período do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Segundo Bacon e White Jr. (2000), os fungos que colonizam os tecidos internos das plantas, sem causar algum dano imediato ao seu hospedeiro são considerados endofíticos.

Na literatura, os fungos endofíticos são divididos em dois grupos ecológicos: *balansiaceous* e *não-balansiaceous*. O primeiro grupo é composto por fungos Ascomicetos pertencentes aos gêneros *Epichloe* e *Balansia* (anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*) (Schulz & Boyle, 2005). Segundo Petrini (1996), são proximamente relacionados e apresentam necessidades ecológicas e adaptações distintas de todos os outros fungos endofíticos. Além disso, desenvolvem sistêmica e intercelulamente e são transmitidos verticalmente através de sementes (Schulz & Boyle, 2005).

Em contraste, endófitos *não-balansiaceous* são diversos, tanto filogeneticamente quanto em relação à sua estratégia de vida. São transmitidos horizontalmente, tendo sido isolados na maioria das plantas (Arnold *et al.*, 2003). A colonização pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (Schulz & Boyle, 2005).

As espécies isoladas com maior frequência pertencem ao filo Ascomycota, incluindo os anamorfos (Hyphomycetes e Coelomycetes) (Schulz & Boyle, 2005). Espécies de Basidiomycota e Zigomycota também são isoladas como endofíticos, porém, representam um número menor (Schulz & Boyle, 2005). Na vegetação brasileira, os gêneros *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomelera*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* e *Xylaria* são os mais frequentes (Peixoto-Neto *et al.*, 2002).

Existem cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos, dos quais apenas 5% estão descritos (Hawksworth, 2001). Em contrapartida, estima-se que das 300 mil espécies de plantas que existem no planeta, cada uma abrigue no interior de seus tecidos um ou

mais fungos endofíticos, podendo-se talvez chegar a um milhão de espécies de fungos, considerando somente os endofíticos (Strobel & Daisy, 2003). Dessa forma, são grandes as chances de se encontrar novos fungos endofíticos dentre os milhares de plantas nos diferentes ecossistemas, constituindo-se numa fonte promissora de diversidade genética, como também, de novos produtos naturais (Strobel & Daisy, 2003).

### **2.3 Interação dos fungos endofíticos com as plantas**

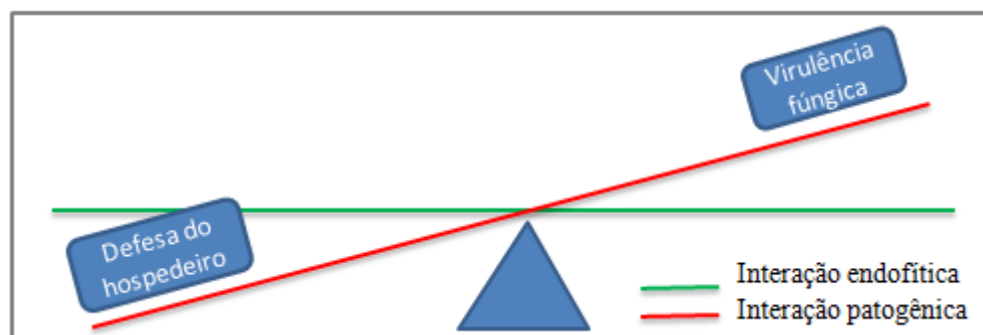
As associações de fungos endofíticos com seus hospedeiros são extremamente complexas e o entendimento ainda é prematuro. Além disso, essas relações são intrínsecas a determinadas espécies de plantas e/ou endofíticos (Araújo *et al.*, 2010).

Sabe-se que, em geral, essa íntima associação envolve vários processos, que por sua vez, podem ser influenciados pelo genótipo, estágio de crescimento, condições fisiológicas e tipo de tecido vegetal, além de condições ambientais e práticas agrícolas (Compant *et al.*, 2010; Firáková *et al.*, 2007; Forchetti *et al.*, 2007; Hardoim *et al.*, 2008; Sieber, 2007). Neste contexto, têm sido estudadas duas hipóteses principais acerca da interação endofíticos/hospedeiros: a da simbiose mutualística e a do equilíbrio antagônico (Faeth, 2002; Selosse *et al.*, 2004; Rudgers *et al.*, 2004; Saikkonen *et al.*, 2004; Müller & Krauss, 2005; Schulz & Boyle, 2005; Kogel & Franken, 2006; Maheshwari, 2006).

A primeira hipótese sugere que os endofíticos co-evoluíram com seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, onde os endofíticos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira, da mesma maneira, a planta também é beneficiada com essa interação. Dentre os benefícios destacam-se uma maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores abióticos ou bióticos como temperatura, umidade, luz, contaminantes, etc (Saikkonen *et al.*, 1998). Este tipo de interação também possibilita, em alguns casos, resistência frente à patógenos (Hallmann *et al.*, 1997; M'Piga *et al.*, 1997; Ryu *et al.*, 2006; Senthilkumar *et al.*, 2007), aumento do crescimento vegetal (Hallmann *et al.*, 1997; Bent & Chanway, 1998; Tsavkelova *et al.*, 2007), estímulo e indução do processo de germinação de sementes (Freyermuth *et al.*, 1996; Holland, 1997).

Sabe-se que numa relação sintomática metabólitos de defesa são produzidos pela planta hospedeira em resposta aos metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos (Agrios, 1997). Segundo Peters *et al.* (1998), após análises *in vitro* foi verificado que tanto o endofítico como a planta hospedeira produziam e secretavam metabólitos tóxicos para

ambos, resultado não esperado em uma relação assintomática. Neste contexto, Schulz e Boyle (2005) concluíram que a colonização assintomática é consequente da interação antagonista balanceada entre a planta hospedeira e o fungo. Caso este equilíbrio seja afetado, tanto por uma diminuição na defesa da planta, através da síntese de metabólitos tóxicos, como por um aumento da virulência fúngica (Figura 01), há o desenvolvimento de doença (Schulz *et al.*, 2002).



**Figura 01.** Hipótese do equilíbrio antagonístico. Adaptado de Schulz *et al.*, 2002.

A hipótese do equilíbrio antagonístico não exclui a possibilidade do endofítico exercer uma função benéfica para seu hospedeiro. Nesta interação, os fungos endofíticos influenciam na produção ou inibição de metabólitos com função de defesa, conferindo aos vegetais vantagens como resistência ao ataque de insetos, produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos (Azevedo *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2003; Mucciarelli *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2004; Bandara *et al.*, 2006).

A complexidade dessas interações tem direcionado estudos com endofíticos não só para os focos tradicionais, como promoção de crescimento vegetal e controle biológico de pragas, como, principalmente na obtenção de produtos de interesse biotecnológico (Araújo *et al.*, 2010).

## 2.4 Importância dos fungos endofíticos

### 2.4.1 Promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal por fungos endofíticos

Os fungos endofíticos podem afetar favoravelmente o crescimento e o desenvolvimento das plantas hospedeiras. Os endofíticos podem produzir certos compostos que facilitam a entrada e utilização de nutrientes que existam no meio. Outra forma de favorecimento do crescimento e desenvolvimento dos hospedeiros é através da

síntese de reguladores vegetais como as giberilinas, auxinas, citoquininas e o etileno (Araújo *et al.*, 2010).

No trabalho de Varma *et al.*, (1999), os autores estudaram um endofítico de raiz, o *Piriformospora indica*, e descreveram a capacidade deste em promover o crescimento vegetal de *Zea mays*, *Nicotiana tabaccum* e *Petroselinum crispum* L., uma vez que a inoculação do fungo nessas plantas, favoreceu o aumento de biomassa e, consequentemente, o crescimento vegetal.

*Neotyphodium* sp., fungo endofítico isolado de *Festuca aerundinacea* beneficia seu hospedeiro aumentando a tolerância à seca (White Jr. *et al.*, 2002), no crescimento radicular, na produção de sementes, na germinação, na obtenção de fósforo e na resistência a nematóides e insetos (Panaccione *et al.*, 2001).

Arnold e colaboradores (2003) estudaram a resposta de plantas de cacauero axênicas inoculadas com endofíticos do próprio hospedeiro e com o patógeno *Phytophthora* sp. e observaram que as plantas inoculadas com os endofíticos apresentaram menos necrose e mortalidade das folhas, quando comparadas aos controles, inoculados apenas com o patógeno.

Várias espécies de fungos como, por exemplo, *C. gloeosporioides* e *Fusarium oxysporium* que são geralmente tratadas como fitopatogências possuem isolados endofíticos de raízes de plantas como a soja e citros que produzem auxinas (Araújo *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 Produtos naturais produzidos por fungos endofíticos**

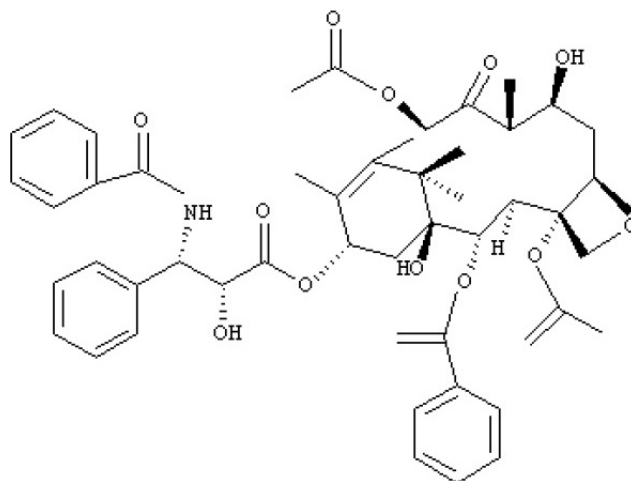
Os compostos conhecidos como produtos naturais são metabólitos secundários derivados naturalmente de micro-organismos, plantas e animais, sendo as plantas a principal fonte desses compostos (Strobel & Daisy, 2003). Por conta da sua diversidade e complexidade estrutural, os produtos naturais são de grande importância na farmacologia e biotecnologia, podendo também ser utilizados como modelo para síntese e semi-síntese de moléculas bioativas de amplo espectro e baixa toxicidade (Demain, 2006; Gullo *et al.*, 2006).

Os micro-organismos endofíticos, em especial os fungos, constituem uma fonte potencial de produtos naturais inédita e pouco explorada. Uma das propriedades mais importantes destes micro-organismos está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas. Centenas de compostos naturais produzidos por endofíticos, como alcalóides, terpenóides, flavonóides e

esteróides, foram relatados (Guo *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2009). Recentes estudos têm mostrado interesse em fungos endofíticos com capacidade de inibir ou matar uma ampla variedade de agentes patogênicos, incluindo micro-organismos fitopatógenos (Strobel, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Gunatilaka, 2006) como fungos, bactérias (Harrison *et al.*, 1991; Horn *et al.*, 1995; Strobel *et al.*, 1999; Brady & Clardy, 2000; Li *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2000), protozoários (Demain, 1999) e vírus (Guo *et al.*, 2000). Outros metabólitos sintetizados por estes micro-organismos demonstraram atividade antitumoral (Wagenaar *et al.*, 2000), hiperglicêmica, imunossupressiva (Stierle *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1999) e antioxidante (Harper *et al.*, 2003).

Alguns endofíticos produzem substâncias químicas de origem vegetal e esses produtos seriam originalmente característicos de seu hospedeiro (Tan & Zou, 2001). Tais substâncias poderiam estar relacionadas a uma recombinação genética do endofítico com a planta hospedeira que ocorre durante a evolução dos mesmos.

O paclitaxol (Figura 02) é um diterpenóide que apresenta atividade citotóxica e é utilizado na clínica como agente anticâncer. Esta substância foi originalmente encontrada em espécies vegetais do gênero *Taxus*. *Taxomyces andreanea*, fungo isolado de *Taxus brevifolia*, assim como seu hospedeiro, é capaz de sintetizar o paclitaxol, provavelmente, como forma de proteção do vegetal contra fungos fitopatogênicos (Stierle *et al.*, 1993).



**Figura 02.** Paclitaxol, substância anticâncer isolada da conífera *Taxus brevifolia* e por seu hospedeiro endofítico *Taxomyces andreanae* (Strobel & Daisy, 2003).

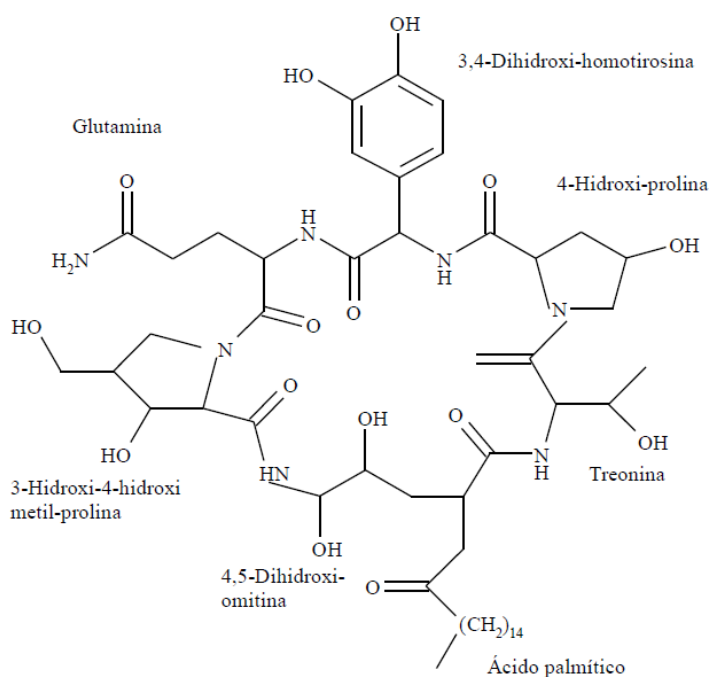
Dessa forma, caso o endofítico tenha habilidade de sintetizar, assim como seu hospedeiro, o mesmo metabólito bioativo, haveria uma redução na coleta de plantas raras, de crescimento reduzido e/ou ameaçadas de extinção, como também, preservaria a biodiversidade. Além disso, é reconhecido que uma fonte microbiana de um produto

valorizado pode ser mais fácil e econômico para produzir, reduzindo eficazmente seu custo no mercado (Stierle *et al.*, 1993).

#### 2.4.2.1 Antibióticos produzidos por fungos endofíticos

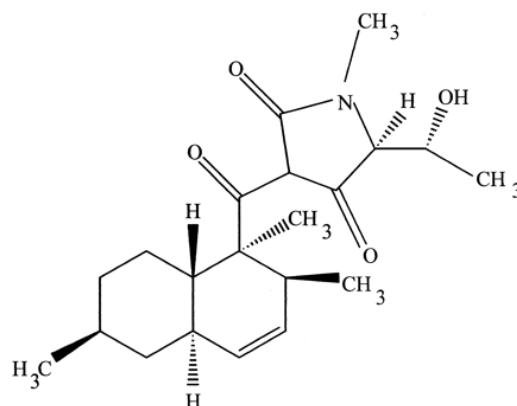
Antibióticos produzidos por micro-organismos são definidos como produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular, ativos em baixas concentrações contra outros micro-organismos (Demain, 1999).

Estudos realizados com o extrato do fungo *Cryptosporiopsis quercina* isolado da planta *Tripterigeum wilfordii*, planta medicinal pertencente à família Celastraceae nativa da Eurásia, demonstraram atividade antifúngica do extrato contra alguns patógenos humanos, tais como, *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. Além de agir também contra fungos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (Strobel *et al.*, 1999). A partir do estudo químico deste extrato, a substância criptocandina foi isolada (Figura 3).



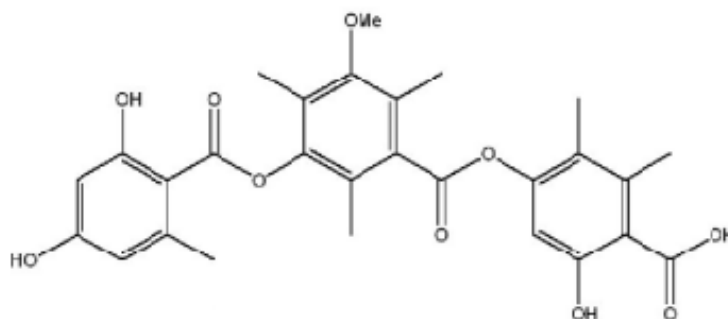
**Figura 03.** Criptocandina, substância antifúngica isolada do extrato de *Cryptosporiopsis quercina* (Strobel *et al.*, 1999).

Outro composto, a criptocina (Figura 04), também obtido de *C. quercina*, é um ácido tetrâmico que apresenta uma potente atividade antifúngica frente *Pyricularia oryzae*, bem como, a uma série de outros fungos fitopatogênicos causadores de doenças em plantas em todo o mundo (Li *et al.*, 2000).



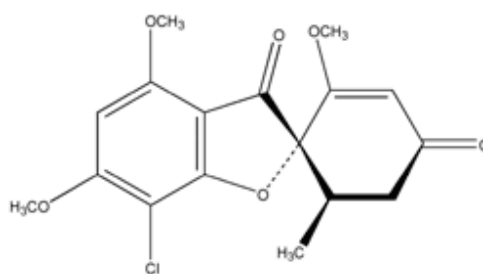
**Figura 04.** Criptocina, substância antifúngica isolada de *Cryptosporiopsis quercina* (Li et al., 2000).

O ácido coletótrico (Figura 05), um metabólito do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da *Artemisia mongólica*, planta nativa da China, apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e contra o fungo patogênico *Helminthosporium sativum* (Zou et al., 2000). Lu e colaboradores (2000), identificaram ainda três novos metabólitos do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. isolado de *Artemisia annua* com propriedades antimicrobianas.



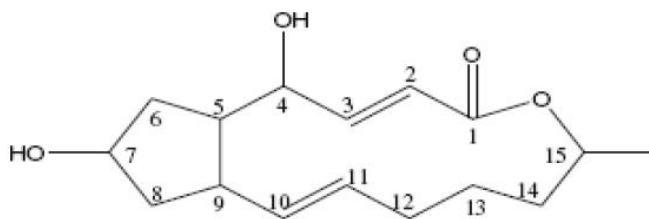
**Figura 05.** Ácido coletótrico, substância antimicrobiana isolada de *Colletotrichum gloeosporioides* (Zou et al., 2000).

A griseofulvina (Figura 06), substância antifúngica utilizada no tratamento de infecções causadas por dermatófitos de várias espécies como, *Microsporum* sp., *Epidermophyton* sp. e *Trichophyton* sp. é um metabólito isolado de alguns fungos endofíticos, entre eles, o fungo *Xylaria* sp. isolado da planta *Palicourea marcgravii* (Cafêu et al., 2005). Atualmente a griseofulvina vem sendo comercializada em medicamentos como o Fulcin® (Zeneca) e o Sporostatin® (Shering Plough) no combate a micoses superficiais.



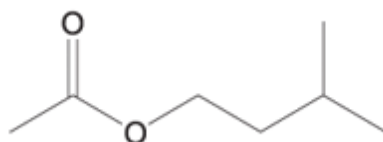
**Figura 06.** Griseofulvina, substância antifúngica isolada de *Xylaria* sp. (Cafêu *et al.*, 2005).

Fungos endofíticos de *Quercus variabilis*, planta medicinal nativa da China utilizada no tratamento de infecções na garganta mostraram-se ativos, inibindo o crescimento de fungos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*) e bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) patogênicos ao homem. Dos isolados de *Q. variabilis*, o fungo que se mostrou mais ativo foi *Cladosporium* sp. que produz uma substância química identificada como brefeldin A (Figura 07) (Wang *et al.*, 2006).



**Figura 07.** Brefeldin A, substância antimicrobiana isolada de *Cladosporium* sp. (Wang *et al.*, 2006).

Em estudos realizados com endofíticos do caule da planta *Cinnamomum zeylanicum*, o fungo *Muscodora albus* apresentou atividade antimicrobiana contra uma variedade de micro-organismos por meio da produção de uma mistura de metabólitos voláteis (Strobel *et al.*, 2001). A produção de metabólitos voláteis por fungos endofíticos confere a estes micro-organismos uma nova aplicação. Os metabólitos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A classe de metabólitos que apresentou maior inibição dos micro-organismos alvo foram os ésteres, sendo o acetato de isoamila (Figura 08) o mais ativo (Strobel *et al.*, 2001).



**Figura 08.** Estrutura do éster acetato de isoamila (Nascimento Jr. *et al.*, 2008).

Worapong e colaboradores (2002), verificaram, com o mesmo objetivo anterior, que o endofítico *Gliocladium* sp. produziu compostos voláteis com atividade antimicrobiana. Esta atividade biológica verificada foi inédita para este fungo.

Plantas tóxicas da Amazônia como, *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*, também tiveram seus fungos endofíticos isolados, dos quais 19 apresentaram atividade antimicrobiana (Souza *et al.*, 2004).

Substâncias anti-*Helicobacter pylori* foram extraídas de fungos endofíticos da planta medicinal *Cynodon dactylon* (Li *et al.*, 2005).

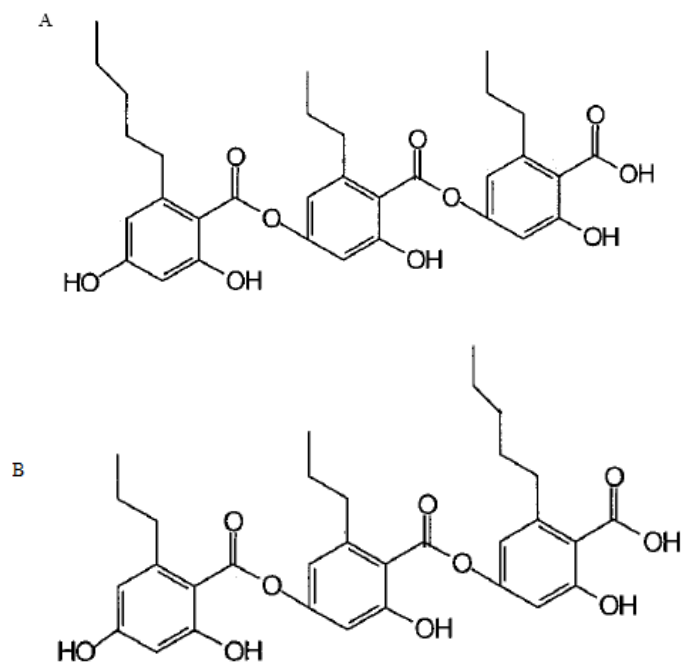
Resultados obtidos por Sette e colaboradores (2006) demonstraram que fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus*, *Bionectria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Talaromyces* e *Trichoderma* isolados das plantas *Coffea arabica* e *C. robusta* mostraram-se ativos contra pelo menos uma das sete bactérias testadas: *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e mais quatro cepas diferentes de *E. coli*.

O extrato do fungo endofítico *Alternaria* sp. isolado da planta *Trixis vauthieri* apresentou inibição de 99% frente ao patógeno causador da doença de Chagas, o *Trypanosoma* (Cota *et al.*, 2006).

#### 2.4.2.2 Inibição de agentes virais por fungos endofíticos

Outra aplicação dos produtos naturais produzidos por fungos endofíticos é a inibição de agentes virais. Dois novos inibidores de uma protease de citomegalovírus foram isolados do fungo endofítico *Cytonaema* sp. isolado de plantas do gênero *Quercus* sp. As estruturas do ácido citônico A e B (Figura 09) foram elucidadas por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear - RMN (Guo *et al.*, 2000).

O potencial para a descoberta de endofíticos com atividade antiviral ainda é incipiente. De fato alguns metabólitos encontrados são promissores, mas a principal limitação para a descoberta de moléculas antivirais está provavelmente relacionada à ausência de um sistema efetivo de triagem antiviral (Guo *et al.*, 2000).



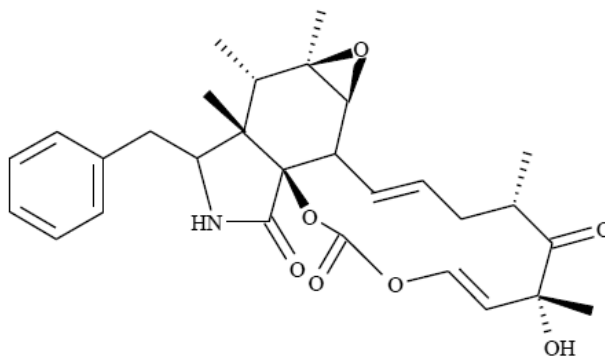
**Figura 09.** Estrutura dos ácidos citônicos A (A) e B (B), inibidores de protease, obtidos do fungo endofítico *Cytonaema* sp. (Guo *et al.*, 2000).

#### 2.4.2.3 Antitumorais produzidos por fungos endofíticos

Stierle e colaboradores (1993), citados anteriormente, mostraram que o fungo *T. andreanea* encontrado na planta *T. brevifolia* produz um diterpeno conhecido como taxol que também é produzido pelo vegetal. O taxol é um potente antitumoral utilizado no combate ao câncer, principalmente, de mama e ovário.

O endofítico *Pestalotiopsis microspora* isolado da planta *Taxus wallaquiana*, assim como seu hospedeiro, também produz taxol (Strobel *et al.*, 1996). Outro composto, a leucinostatina A é um antifúngico e antitumoral produzido pelo fungo endofítico *Phoma cava* isolado da planta *Taxus baccata* (Strobel *et al.*, 1997).

O extrato do fungo endofítico *Rhinochadiella* sp., isolado da planta *Tripterygium wilfordii*, exibiu potente atividade contra três linhagens de células tumorais humanas: A2780s (câncer de ovário), SW-620 (câncer de cólon) e HCT-116 (câncer de cólon) (Wagenaar *et al.*, 2000). A partir do extrato desse fungo endofítico, foram isoladas quatro substâncias, três novas citochalasininas, e a citochalasinina E (Figura 10). Ao serem testadas contra as três linhagens de células tumorais, a citochalasinina E foi a que apresentou a maior atividade citotóxica (15-100 vezes) em relação às demais (Wagenaar *et al.*, 2000).



**Figura 10.** Citochalasina E, substância anticâncer produzida pelo endofítico *Rhinochlamydia* sp., isolado da planta *T. wilfordii* (Wagenaar *et al.*, 2000).

Wiyakrutta e colaboradores (2004) realizaram um estudo com endofíticos de várias plantas medicinais coletadas na Tailândia. Dos 582 isolados obtidos, 360 foram testados contra duas linhagens de células tumorais humanas: KB (câncer de boca) e BC-1 (câncer de mama). Dos 360 isolados, 60 (17%) e 48 (13%) apresentaram inibição das células KB e BC-1.

Uma substância citotóxica, contra células de tumor epidermóide de nasofaringe, e antifúngica, contra *C. albicans*, foi extraída do fungo *Neoplaconema napellum*, endofítico de *Hopea hainanensis*, por Wang *et al.*, (2006).

#### 2.4.3 Outros compostos produzidos por fungos endofíticos

Os fungos endofíticos constituem uma fonte excepcionalmente rica de produtos de interesse biotecnológico. Entre eles estão enzimas como as amilases, proteases, quitinases, queratinases, celulasas, lipases e muitas outras que podem ser utilizadas para diferentes finalidades industriais (Araújo *et al.*, 2010).

O endofítico *Microdochium bolleyi* produz uma substância algicida. Outros endofíticos, do gênero *Geotrichum* produzem nematocidas (Araújo *et al.*, 2010).

Vários aromas e sabores de valor industrial (alimentos e cosméticos) já foram descritos como sendo produzidos por endofíticos (Araújo *et al.*, 2010). O endofítico *Gliocladium roseum* isolado da planta *Eucryphia cordifolia*, na Patagônia, produz compostos incluindo hidrocarbonetos e ácidos graxos que podem ser utilizados na produção de bicompostíveis (Strobel *et al.*, 2008).

#### 2.4.4 Fungos endofíticos no controle de pragas e patógenos

O controle biológico de doenças e pragas de culturas, através de fungos endofíticos, pode ser realizado de forma indireta ou direta. Quando o endofítico não atua diretamente sobre o patógeno, mas, induz uma resposta na planta que leva a uma resistência sistêmica nos referimos ao controle indireto (Araújo *et al.*, 2010).

A indução da resistência sistêmica associa-se, provavelmente, a alterações bioquímicas e estruturais no vegetal hospedeiro. Estas alterações podem afetar adversamente no estabelecimento ao desenvolvimento do patógeno (Duijff *et al.*, 1997; M'piga *et al.*, 1997; Sharma & Nowak, 1998).

Koga e colaboradores (1997) verificaram a redução no ataque de insetos, na presença de fungos endofíticos, devido à produção de compostos que reduziam a atratividade da planta.

Vários fungos endofíticos produzem alcalóides, em associação com o hospedeiro, que apresentam atividade inseticida e nematicida, protegendo-a destas pragas (Dahlman *et al.*, 1991), ou seja, atuam de forma direta.

O extrato do fungo endofítico *Muscador vitigenus*, isolado da planta *Paullinia paullinioides* forneceu um novo diterpeno, o ácido nodulispórico que apresentou potente propriedade inseticida contra larvas de moscas (Daisy *et al.*, 2002).

Fungos endofíticos obtidos de plantações comerciais da Guatemala foram avaliados, observando-se que plântulas de banana que haviam sido inoculadas com esses fungos tiveram uma redução direta em populações de nematóides (zum Felde, 2006). Em alguns casos o endofítico atua sobre outro fungo aumentando ou reduzindo a capacidade de infecção deste sobre insetos (Araújo *et al.*, 2010).

#### 2.5 Infecções causadas por micro-organismos patogênicos

O sucesso dos primeiros antibióticos na cura de doenças até então consideradas letais acarretou uma intensa busca por novas drogas. De fato, as décadas de 40, 50 e 60 do século passado foram marcadas pela imensa quantidade de antibióticos produzidos e rapidamente incorporados às práticas clínicas (Butler & Buss, 2006). No entanto, nas décadas posteriores houve um aumento significativo das infecções causadas por micro-organismos. De acordo com Luzhetskyy e colaboradores (2007), as doenças infecciosas estão em segundo lugar como causa de morte em todo mundo. Infecções bacterianas

causam 17 milhões de mortes globais, sendo as crianças e os idosos os mais atingidos (Butler & Buss, 2006).

O aumento do número de infecções bacterianas e fúngicas se devem a vários fatores como, por exemplo, a resistência dos micro-organismos às drogas, muitas vezes devido ao uso extensivo ou inapropriado; más condições de higiene; fluxo contínuo de viajantes; aumento de pacientes imunocomprometidos com doenças como a AIDS, doença aguda do sistema respiratório e doenças autoimunes; demora no diagnóstico das infecções (von Nussbaum *et al.*, 2006); tratamentos prolongados como a hemodiálise e procedimentos invasivos (uso de cateteres) são fatores intrínsecos para o surgimento de resistência dos micro-organismos (Butler & Buss, 2006).

Aproveitando este contexto, é possível citar alguns micro-organismos causadores de infecções em humanos. Neste trabalho serão abordadas seis bactérias de importância clínica, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além de quatro leveduras oportunistas de maior importância médica *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Malassezia furfur*.

***Bacillus subtilis*** - são bacilos Gram-positivos de solo, não colonizador de tecidos, naturalmente transformável (capacidade de capturar DNA exógeno), formadores de esporos e não patogênicos, porém, considerados modelo de estudo de bactérias Gram positivas (Paccez, 2007) como, por exemplo, o *Bacillus cereus* considerado similar ao *B. subtilis* (Souza, *et al.*, 2004) e produtor de duas toxinas: emética e diarréica (Forsythe, 2002).

***Escherichia coli*** - classificam-se como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, comumente denominados de entéricos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. O nome se refere o fato da bactéria ser encontrada no trato intestinal de humanos e outros animais (Tortora *et al.*, 2005). Todas as linhagens patogênicas possuem fímbrias especializadas que permitem a ligação da bactéria às células do epitélio intestinal. Três síndromes clínicas resultam da infecção causada por *E. coli* patogênica: infecções do trato urinário, septicemias seguidas de meningites e gastroenterites (Trabulsi & Ordonez, 2004). Essa bactéria é o principal coliforme fecal encontrado em águas contaminadas, sendo responsável por 75% dos casos de pielonefrite (Santiago *et al.*, 2005).

***Klebsiella pneumoniae*** - é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, está presente em indivíduos saudáveis,

colonizando principalmente o trato intestinal e nasofaringe (Podschun & Ullmann, 1998). No entanto, pode atuar como patógeno de grande importância nas infecções hospitalares em todo o mundo (Sader *et al.*, 2002). *K. pneumoniae* pode causar infecções comunitárias, como pneumonia ou infecção do trato urinário (Podschun & Ullmann, 1998).

***Proteus mirabilis*** - classifica-se como um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae. Está presente na flora normal em indivíduos saudáveis, porém, atua como patógeno, principalmente, em infecções do trato urinário (produtor de urease) (Laurençot & Walker, 2006).

***Pseudomonas aeruginosa*** - é um bacilo Gram-negativo, não fermentador e taxonomicamente encontra-se na família Pseudomonadaceae. É um dos micro-organismos mais ubiqüitários, pois é encontrado no solo, água, vegetais, animais e nos mais diversos ambientes hospitalares (Franco & Landgraf, 2003). No Brasil, de acordo com um estudo sobre resistência aos antimicrobianos, *P.aeruginosa* foi a causa mais frequente de infecções do trato respiratório, a segunda causa mais frequente de infecções urinárias e infecções de feridas cirúrgicas e o sexto agente associado a infecções sistêmicas (Sader *et al.*, 2001).

***Staphylococcus aureus*** - ocorrem em grupos que se assemelham a cachos de uva. São Gram-positivos, anaeróbicos facultativos e crescem bem sob alta pressão osmótica e pouca umidade (Tortora *et al.*, 2005). São responsáveis por doenças com baixa morbidade e mortalidade, como por exemplo, foliculite e intoxicação alimentar, mas também por doenças severas e fatais como a endocardite e a síndrome do choque tóxico (Kuehnert *et al.*, 2006). O aumento da resistência deste micro-organismo às drogas e o aparecimento de estafilococos meticilina-resistente, tem se tornado um grave problema nos centros de saúde. Apesar de não ser causa de doenças negligenciadas, doenças causadas por *S. aureus* são graves e afetam toda população mundial (Campos, 2009).

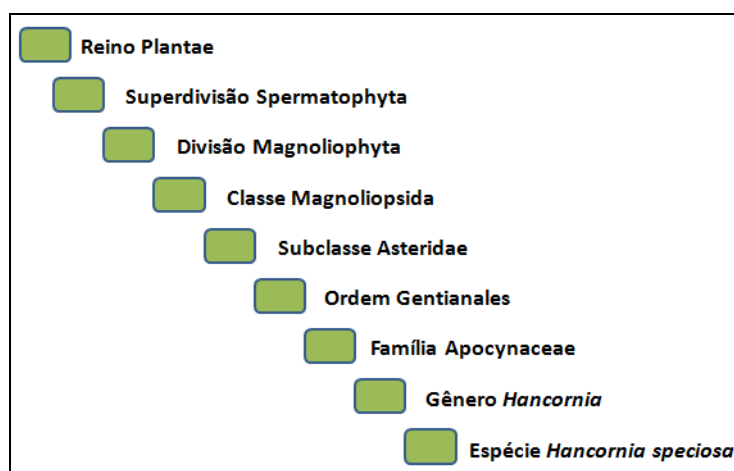
***Candida spp.*** - as leveduras do gênero *Candida* são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, pertencentes à família Saccharomycetaceae. Fazem parte da microbiota normal (Lacaz, 1980), entretanto, em indivíduos imunologicamente comprometidos, tornam-se patógenos oportunistas. As candidoses ou candidíases são as infecções ocasionadas por leveduras do gênero *Candida*. A maioria destas infecções é causada pela levedura *C. albicans*, no entanto, outras leveduras como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* podem causar infecções (Weinberger *et al.*, 2005). *C. krusei*

e *C. glabrata* estão cada vez mais resistentes aos antifúngicos disponíveis no mercado (Bard *et al.*, 2005).

***Malassezia furfur*** - é um micro-organismo leveduriforme, lipofílico, aeróbico ou anaeróbico facultativo, pertencente à família *Cryptococcaceae*. Está presente na microbiota da pele, no entanto, podem passar para o estágio parasitário em indivíduos que sofrem desequilíbrio orgânico provocados por doenças agravadas, fatores carenciais (Oliveira, 1999), gravidez e taxas elevadas de cortisol plasmático (Schlottfeldt *et al.*, 2002). Entre as patologias que estão associadas a infecções por *M. furfur*, podemos citar a pitiríase versicolor, dermatite seborréica, foliculite pitirospórica e infecções sistêmicas (Schlottfeldt *et al.*, 2002).

## 2.6 *Hancornia speciosa* Gomes

*Hancornia speciosa* é uma frutífera pertencente à família Apocynaceae e à ordem *Gentianales* (Cronquist, 1988) (Figura 11). É nativa do Brasil e vegeta espontaneamente nas Regiões Centro-Oeste, Norte, Nordeste e Sudeste, porém, ocorre com maior abundância nas áreas de tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste (Aguiar-Filho *et al.*, 1998). No entanto, apesar de sua ampla distribuição, vem ocorrendo uma séria redução de sua vegetação nativa, principalmente nos tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas nordestinas, devido à implantação de monoculturas como coqueirais e canaviais, pastagens e especulação imobiliária desordenada (Lederman & Bezerra, 2003).



**Figura 11** – Hierarquia taxonômica de *Hancornia speciosa* Gomes - Adaptado de Cronquist (1988).

*H. speciosa* (Figura 12) é popularmente conhecida como mangaba ou mangabeira, palavra de origem indígena (mã'gawa), que significa “coisa boa de comer” (Ferreira, 1973). Também foi mencionada como mongaba, que significa grude ou visgo, em alusão ao látex da planta (Braga, 1960). Os índios tupis a chamavam de tembiú-catu e os guaranis do Paraguai, de manga-icé (Monachino, 1945). Segundo esse mesmo autor, algumas variantes do nome mangaba são usadas no Brasil, como mangaíba, mangareíba, mangava, mangaúva e manguba. Outros sinônimos popularmente empregados, como catu e fruta-de-doente (em Sergipe), tembiú e tembiucatinga foram citados no Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia (Bahia, 1979).



**Figura 12** – *Hancornia speciosa* Gomes (Chagas, 2012)

No gênero *Hancornia*, a espécie mais importante é a *H. speciosa*, descrita por Gomes em 1812 (Lederman *et al.*, 2000), existindo ainda, duas outras espécies: *H. pubescens* A. DC e *H. laxa* A. DC. No caso da *H. speciosa*, são descritas seis variedades: *H. speciosa* variedade *speciosa*, *H. speciosa* variedade *maximilliani* A. DC., *H. speciosa* variedade *lundii* A. DC., *H. speciosa* variedade *cuyabensis* Malme, *H. speciosa* variedade *gardneri* A. DC. Muell. Arg. e a *H. speciosa* variedade *pubescens* (Nees. et Martius) Muell. Arg. (Monachino, 1945; Manica, 2002).

### 2.6.1 Descrição botânica

Exemplares de *H. speciosa*, em geral, podem atingir de 2 a 10 metros de comprimento, possuem porte harmonioso com galhos separados e bem formados, além de uma copa ampla, às vezes mais larga que alta, com galhos pendentes, abundantes e

folhagens reduzidas. Possuem caules do tipo tronco, geralmente tortuosos, córtex levemente suberoso e enrugado. As folhas são opostas, simples, uniformemente espaçadas e coriáceas, lâmina oblonga, elíptico-lanceoladas ou oblongo-lanceoladas nas duas extremidades, às vezes obtuso-subacuminadas no ápice, possuindo de 3,5 a 10,0 centímetros de comprimento e de 1,5 a 5,0 centímetros de largura, sempre glabras nas duas páginas, oliváceo-enegrescentes na face ventral, mais descoradas na dorsal; pecíolo de 9,0 a 12,0 milímetros, axilar, fino, glabro e biglanduloso (Villachica *et al.*, 1996; Lederman *et al.*, 2000).

A flor da *H. speciosa* é hermafrodita gêmea ou trigêmea no ápice dos râmulos, branca, campanulada e aromática. Possuem o androceu dotado de cinco estames epipétalos, anteras lanceoladas de filetes curtos e deiscência rimosa. O gineceu é composto por um ovário pequeno, unicarpelar, dotado de muitos óvulos, estilete longo com estigma em carretel (Aguiar-Filho *et al.*, 1998).

Conforme citações de Manica (2002), o fruto (Figura 13) é classificado como do tipo baga, possui a forma elipsóide ou arredondada, atingindo até 6,5 centímetros de comprimento, mas com diferentes tamanhos na mesma planta; apresenta a casca ou exocarpo, exibindo uma coloração, que varia de verde-clara a amarelada, com estrias amareladas ou avermelhadas, produzindo um suco viscoso na casca; a polpa é de cor branca e geralmente de gosto acidulada a doce, suave, carnosa e viscosa, de aroma perfumado e muito saborosa. No seu interior possui várias sementes, tendo sido encontradas na quantidade de 2, 19, até 38 sementes em cada fruto, sendo elas de coloração castanho-claro, delgadas, rugosas, com um hilo no centro, de forma discóide ou circular, achatadas ou comprimidas, com 7 a 8 milímetros de diâmetro.



**Figura 13** - Fruto de *H. speciosa* (Chagas, 2012)

As espécies da família Apocynaceae encontram-se bem representadas na vegetação brasileira, sendo encontradas cerca de 850 espécies subordinadas a 90 gêneros representadas por arbustos, subarbustos, árvores ou lianas, geralmente latescentes. Os gêneros mais conhecidos são: *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Plumeria*, *Rauwolfia*, *Tabernaemontana* e *Hancornia* (Souza & Lorenzi, 2008). Apresentam hábitos bem variados, algumas espécies apresentam látex branco e frutos comestíveis.

As plantas desta família apresentam um grande potencial econômico, por exemplo, espécies do gênero *Aspidosperma* são muito utilizadas na indústria de móveis, construção civil e naval (Souza & Lorenzi, 2008; Ribas, 2005). Outras apresentam potencial paisagístico, por conta da beleza de suas flores ou formatos de caules e copas, com destaque para a alamanda (*Allamanda cathartica*), a espiroleira (*Nerium oleander*), o chapéu-de-napoleão (*Thevetia peruviana*), o jasmim-manga (*Plumeria rubra*) e a vinca (*Catharanthus roseus*) (Hopkins, *et al.*, 1999; Souza & Lorenzi, 2008). O látex de *Couma utilis* foi utilizado para a produção de goma de mascar (Falcão *et al.*, 2003).

Estudos realizados com algumas espécies de Apocynaceae revelaram a presença de diversos compostos de grande interesse farmacológico e terapêutico com ação biológica diversa como, antibacteriana, anticancerígena, leishmanicida e inibidores da transcriptase reversa (anti - HIV). Estas atividades estão associadas, principalmente, aos alcalóides esteroidais e indólicos provenientes do metabolismo secundário dos vegetais desta família. Entre as espécies de Apocynaceae mais conhecidas e estudadas que produzem os compostos citados anteriormente podemos destacar: *Catharanthus roseus*, *Tabernaemontana divaricata* e *Rauwolfia serpentina* (Barros, 2008).

Foram extraídas das folhas e talos de *C. roseus* a vincristina e a vinblastina conhecidas como “alcalóides da vinca” utilizados contra o câncer de mama e leucemias (Luz & Ferradá, 2002). Extratos de espécies do gênero *Tabernaemontana* apresentaram atividade anticancerígena em função dos alcalóides voacangina e coronaridina presentes em vegetais deste gênero (Pereira *et al.*, 2004). A ajmalicina, a ajmalina e a reserpina são alcalóides isolados de vegetais do gênero *Rauwolfia* que possuem propriedades hipotensora, vasodilatadora e antiarrítmica (Simões, 2001).

### 2.6.2 Aspectos gerais

Nas regiões onde ocorrem *H. speciosa*, muitas famílias ganham seu sustento, informalmente, com a coleta e comercialização de seus frutos. Alguns cultivos

comerciais estão começando a ser estabelecidos e o potencial econômico da espécie tem sido percebido, despertando o interesse de alguns setores representados, em especial, por alguns órgãos como, por exemplo, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) (Epistein, 2004).

O fruto (mangaba) de *H. speciosa* é frequentemente utilizado na produção de sucos, batidas, coquetéis, doces em geral, na forma de polpa congelada, doce em calda, compota, geléia, refrescos, sorvete, mistura de sorvetes e xarope, quando fermentado, produz vinho, vinagre, álcool e licor (Manica, 2002)

Na medicina popular o suco leitoso e o látex desta espécie são usados no tratamento de tuberculose e úlceras (Nogueira *et al.*, 2004). A folha é utilizada para tratar dismenorréia, diabetes, obesidade e verrugas; as cascas tem ação adstringente e são utilizadas em afecções dos pulmões e fígado, câimbras e luxações (Almeida, *et al.*, 1998; Silva-Júnior, 2005).

Além do aproveitamento do fruto e do uso medicinal, o látex de *H. speciosa* é aproveitado para produção de borracha, embora de qualidade inferior se comparada à da seringueira. Sua madeira, vermelha e rígida no caule da planta é aplicada na construção civil e carpintaria (Manica, 2002).

### 2.6.3 Compostos isolados e atividades biológicas

Segundo a avaliação da composição química de *H. speciosa* por Sampaio e Nogueira (2006) foi evidenciada a presença de vários compostos voláteis nos frutos em diferentes estágios de maturação como, por exemplo, monoterpenos (linalol,  $\alpha$ -terpineol e geraniol), alcoóis, aldeídos, cetonas e ésteres. Estudos químicos realizados com extratos polares de folhas demonstraram a presença de inositol L-(+)-bornesitol e do flavonóide rutina (Endringer *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007). Catequinas monoméricas e oligoméricas (taninos condensados e proantocianidinas) foram detectadas no infuso de cascas (Rodrigues *et al.*, 2006). A análise química do látex evidenciou a caracterização de mistura dos triterpenos  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol (Nogueira *et al.*, 2004).

Os extratos da casca do caule e das folhas de *H. speciosa* mostraram-se ativos em ensaios antibacterianos a doze espécies patogênicas como, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, entre outras (Thomazi, 2010). Moraes e colaboradores (2008) obtiveram resultados positivos utilizando o extrato etanólico da casca contra *Helicobacter pylori*.

Andrades-Miranda *et al.*, (2002) utilizaram com sucesso o extrato etanólico da casca no tratamento de úlceras gástricas em camundongos. Em um trabalho semelhante Moraes *et al.*, (2008) utilizando o mesmo extrato analisou o efeito gastroprotetor evidenciado por alterações do suco gástrico (aumento do pH), estímulo da liberação de muco e cicatrização das úlceras.

O extrato etanólico das folhas também apresentou atividade anti-hipertensiva em ensaio de inibição *in vitro* da enzima conversora da angiotensina (ECA) (Serra *et al.*, 2005). Ferreira e colaboradores (2007) constataram a capacidade vasodilatadora do mesmo extrato em anéis de artérias de rato. O extrato bruto da folhas foi ativo na quimioprevenção e no ensaio de inibição da enzima cicloxigenase-2, que avalia a atividade antiinflamatória (Endringer *et al.*, 2006). A administração do látex de *H. speciosa* em camundongos levou a redução significativa do peso médio corporal quando comparado ao controle (Vratimos *et al.*, 2006).

**3.OBJETIVOS**

---

### 3.1 Objetivo Geral

Contribuir no conhecimento da micobiota endofítica associada à casca do caule de *H. speciosa* e avaliar o potencial antimicrobiano destes micro-organismos.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar os fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa* nos períodos seco e chuvoso;
- Purificar os fungos isolados;
- Identificar as espécies de fungos isolados;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos produzidos por fungos endofíticos de *H. speciosa*;
- Comparar a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa* nos diferentes períodos do ano.

#### ***4. REFERÊNCIAS***

---

- Agrios, G.H. **Plant Pathology**. 4. ed. Academy Press: London, 1997. 635 p.
- Aguiar-Filho, S. P.; Bosco, J.; Araújo, I.A. **A mangabeira (*Hancornia speciosa*): domesticação e técnicas de cultivo**. João Pessoa: Emepa-PB, 1998. 26 p.
- Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1998. v. 1, 464 p.
- Andrades-Miranda, J.; Zanchin, N. I.; Oliveira, L.F.; Langguth, A.R.; Mattevi, M.S. (T2AG3) n telomeric sequence hybridization indicating centric fusion rearrangements in the karyotype of the rodent *oryzomys subflavus*. **Genetica**, v. 114, n. 1, p. 11-16, 2002.
- Araújo, W.L.; Lacava, P.T. ; Marcon, J. ; Lima, A.O.S. ; Sobral, J.K. ; Pizzirani-kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. **Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos**. 2. ed. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2010.167 p.
- Arnold, A. E.; Mejía, L. C.; Kylo, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 26, p. 15649-15654, 2003.
- Azevedo, J.L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- Azevedo, J.L.; Serafine, L.A.; Barros, N.M. Micro-organismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafine, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo J.L. **Bioteecnologia: Avanços na Agricultura e na Indústria**. Caxias do Sul: Ed. Universidade de Caxias do Sul. p. 233-265, 2002.
- Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolatedd from tropical plants. In: Ganguli, B.N.; Deshmukh, S.K., (eds.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press. p. 189-207, 2007.
- Bacon, C.W.; White Jr., J.F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. 487 p.
- Bahia (Estado). Secretaria de Agricultura. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979. p. 679-680.

Bandara, W.M.M.S.; Seneviratne, G.; Kulasooriya, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences** v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.

Bard, M.; Sturm, A.M.; Pierson, C.A.; Brown, S.; Rogers, K.M.; Nabinger, S.; Eckstein, J.; Barbuch, R.; Lees, N.D.; Howell, S.A.; Hazen, K.C. Sterol uptake in *Candida glabrata*: Rescue of sterol auxotrophic strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, p. 285-293, 2005.

Barros, I.M.C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia Speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. Brasília: UnB, 2008. 189 p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Bent, E.; Chanway, C.P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of others rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 980-988, 1998.

Brady, S.F.; Clardy, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1447-1448, 2000.

Braga, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 4. ed. Natal: Ed. Universitária UFRN, 1960. 540 p.

Butler, M.S.; Buss, A. D. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919- 929, 2006.

Cabral, D.; Stone, J.K.; Carroll, G.C. The internal mycobiota of *Juncus* spp: microscopic and cultural observations of infections patterns. **Mycological Research**, v. 97, p. 367-376, 1993.

Cafêu, M.C.; Silva, G.H.; Teles, H.L; Bolzani, V.S.; Araújo, A.R.; Young, M.C.M.; Pfenning, L.H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

Campos, F.F. **Isolamento de identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos associados a *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**. Belo Horizonte: UFMG, 2009. 172 p. Tese (doutorado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

Carroll, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N.J.; Van der Heavel, J. (eds.). **Microbiology of the phylloplane**. London: Cambridge University Press. p. 205-222, 1986.

Compant, S.; Clément, C.; Sessitsch, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

Cota, B. B. *et al.* Estudo da atividade inibitória dos extratos do fungo endofítico *Alternaria* sp. sobre a enzima tripanotiona redutase. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sbq, 2006.

Cronquist, A. The evolution and classification of flowering plants. 2 ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

Dahlman, D.L.; Eichenseer, H.; Siegel, M.R. Chemical perspectives on endophyte grass interactions and their applications to insect herbivore. In: Barbosa, P.; Krischik, V.A.; Jones, C.G. (eds.). **Microbial Mediation of Plant-herbivore Interaction**. New York: Wiley. p. 227-252, 1991.

Daisy, B. H.; Strobel, G. A.; Castillo, U.; Ezra, D.; Sears, J.; Weaver, D. K.; Runyon, J. B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology-Sgm**, v. 148, p. 3737-3741, 2002.

Demain, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.

Demain, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7 p. 486-495, 2006.

Duijiff, B.J.; Gianinazzi-Pearson, V.; Lemanceau, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization in tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v. 135, p. 325-324, 1997.

Endringer, D. C.; Kondratyuk, T.; Braga, F. C.; Pezzuto, J.M. **Phytochemical Study of *Hancornia speciosa* guided by *in vitro* cancer chemiopreventive assays**. In: 47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, 2006, Washington. Abstract book of the 47th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, 2006.

Endringer, D.C.; Soares, C.M.; Pezzuto, J.M.; Braga, F.C. L-(+)-Bornesitol. **Acta Cryst.**, v. 63, n. 2, p. 1067-1068, 2007.

Epistein, L. Mangaba: coisa boa de comer. **Revista Bahia Agrícola**, v. 6, n. 2, p. 19-22, 2004.

Falcão, M.A.; Clement, C.R.; Gomes, J.B.M. Phenology and yield of sorva (*Couma utilis* (Mart.) Muell. Arg.) in Central Amazonia. **Acta Botanica Brasilica**. v. 17, n. 4, p. 541-547, 2003.

Faeth, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, v. 98, n. 1, p. 25-36, 2002.

Ferrara, M. A. Fungos endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. In: **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p. 73-79, 2006.

Ferreira, M.B. Frutos comestíveis do Distrito Federal. III. Pequi, mangaba, marolo e mamãozinho. **Cerrado**, v. 5, n. 20, p. 22-25, 1973.

Ferreira, H.C.; Serra, C.P.; Endringer, D.C.; Lemos, V.S.; Braga, F.C.; Cortes, S.F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7-8, p. 473-478, 2007.

Firáková, S.; Šturdíková, M.; Múčková, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, p. 251-257, 2007.

Forchetti, G.; Masciarelli, O.; Alemano, S.; Alvarez, D.; Abdala G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 76, p. 1145-1152, 2007.

Forsythe, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

Franco, B. D. G.M.; Landgraf, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182p

Freyermuth, S.K.; Long, R.I.G.; Mathur, S. Metabolites aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: Lidstrom M. E.; Tabits, F.R. (eds.). **Microbial growth on C1 compounds**. Dordrecht: Kluwer. p. 277-284, 1996.

Gullo, V.P.; McAlpine, J.; Lam, K.S.; Baker, D.; Petersen, F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33 n. 7, p. 523-531, 2006.

Gunatilaka, A.A.L. Natural Products From Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity and applications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**. v. 69, p. 509-526, 2006.

Guo, B.; Dai, J.; Huang, Y. Leong, C.; Ong, W.; Carte, B.K. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 602-604, 2000.

Guo, B.; Wang, Y.; Sun, X.; Tang, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 36-142, 2008.

Hallmann, J.; Quadt-Halman, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

Hardoim, P.R.; Overbeek, L.S. van; Elsas, J.D. van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 463-471, 2008.

Harper, J.K.; Arif, A.M.; Ford, E.J.; Strobel, G.A.; Porco Jr., J.A.; Tomer, D.P.; Oneill, K.L.; Grant, D.M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities, **Tetrahedron**, v. 59, p. 2471-2476, 2003.

Harrison, L.; Teplov, D.; Rinaldi, M.; Strobel, G.A. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2857-2865, 1991.

Hawksworth, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

Holland, M.A. *Methylobacterium* in plants. **Recent Research Development**, v. 1, p. 207-213, 1997.

Hopkins, M.J.G.; Ribeiro, J.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L.G.; Assuncao, P.A.C.; Pereira, E.C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R.; Procopio, L.C. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. INPA. p. 560-581, 1999.

Horn, W.S.; Simmonds, M.S.J.; Schwartz, R.E.; Blaney, W.M. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 14, p. 3969-3978, 1995.

Kobayashi, D.Y.; Palumbo, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C.W.; White, J.F. (ed.). **Microbial endophytes**, New York: Marcel Dekker. p. 199-236, 2000.

Koga, H.; Hirai, Y.; Kanda, K.; Tsukiboshi, T.; Uematsu, T. Sucessive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 31, p. 109-115, 1997.

Kogel K-H, Franken P, Hückelhoven, R. Endophyte or parasite – what decides? **Curr Opin Plant Biol**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

Kuehnert, M.J., Kruszon-Moran, D.; Hill, H. A.; McQuillan, G.; McAllister, S. K.; Fosheim, G.; McDougal, L. K.; Chaitram, J.; Jensen, B.; Fridkin, S. K.; Killgore, G.; Tenover, F. C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p.172-179, 2006.

Lacaz, C.S.; **Candidíases**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, 1980. 190 p.

Laurençot, P.; Walker, C. A Structured-Population Model of *Proteus mirabilis* swarm-colony development. **Journal of Mathematical Biology**, v. 52, n. 1, p. 93-114, 2006.

Lederman, I.E.; Silva Júnior, J.F.; Bezerra, J.E.F.; Espíndola, A. C. M. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: São Paulo, 2000. 35 p.

Lederman, I. E.; Bezerra, J. E. F. Situação atual e perspectivas da cultura da mangaba no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 2003, Aracajú. **Anais...** Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2003. 1 CD.

Li, J.Y.; Strobel, G.A.; Harper, J.K.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, v. 2, p. 767-770, 2000.

Li, H.Y. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 553-558, 2005.

Lu, H.; Zou, W.X.; Meng, J.C.; Hu, J.; Tan, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67-73, 2000.

Luz, L.A.; Ferrada, T.C. R. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.Vicaria. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s. v. 7, p. 96-99, 2002.

Luzhetskyy, A.; Pelzer, S.; Bechthold, A.; The future of natural products as a source of new antibiotics. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 8, p. 608-613, 2007.

Manica, I. Mangaba. In: \_\_. **Frutas nativas, silvestres e exóticas 2: técnicas de produção e mercado**. Feijoa, figo-da-índia, fruta-pão, jaca, lichia, mangaba. Porto Alegre: Cinco Continentes. p. 459-540, 2002.

M'Piga, P.; Bélanger, R.R.; Paulitz, T.C.; Benhamou, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 301-320, 1997.

Maheshwari, R. What is an endophytic fungus? **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1309, 2006.

Mcinroy, J.A.; Kloepper, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.

Melnick, R.L.; Zidack, N.K.; Bailey, B.A.; Maximova, S.N.; Gultinan, M.; Backman, P.A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, v. 46, p. 46-56, 2008.

Mendes, R.; Azevedo, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Maia, L.C.; Malosso, E.; Yano-melo A.M. (eds.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Ed. Universitária UFPE. p. 129-140, 2007.

Monachino, J. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa**, v. 11, p. 19-48, 1945.

Moraes, T.M.; Rodrigues, C.M.; Kushima, H.; Bauab, T.M.; Villegas, W.; Pellizzon, C. H.; Brito, A.; Hiruma-Lima, C.A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti - *Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 161-168, 2008.

Mucciarelli, M.; Scannerini, S.; Berteà, C.; Maffei, M. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist** v. 158, p. 579-591, 2002.

Müller, C.B.; Krauss, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 450-456, 2005.

Nascimento Jr., B.B.; Rezende; C.M.; Fonseca; M.J.O.; Soares, A.G. Efeito do 1-metilciclopropeno sobre a emissão dos ésteres voláteis de bananas ao longo do amadurecimento, **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1367-1370, 2008.

Neto, P. A. S. P.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

Nogueira, P.C.L.; Andrade, M.S.; Sampaio, T.S.; Ribeiro, A.S.; Moraes, V.R.S.; Machado, S.M.F.; Alves, P.B.; Oliva, G.; Thiemann, O.H. Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae do estado de Sergipe. In: II SEMINARIO DE PESQUISA FAP-SE, 2004, Aracajú. **Anais...Aracajú: FAP-SE**, 2004.

Oliveira, J.C. **Micologia Médica**. Rio de Janeiro: J.C. de Oliveira, 1999. 225 p.

Organização Mundial de Saúde. **Word health statistics 2008**. Geneva: WHO press, 2008. 110 p. Disponível em: <[http://www.who.int/whosis/whostat/EN\\_WHS08\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf)>. Acesso em 15 set., 2011.

Paccez, J. D. **Aplicações de linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos**. São Paulo: USP, 2007. 91 p. Tese (doutorado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Panaccione, D.G.; Johnson, R.D.; Wang, J.; Young, C.A.; Damrongkool, P.; Scott, B.; Schardt, C.L. Elimination of ergovaline from grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences** v. 98 p. 12820-12825, 2001.

Peixoto-Neto, P.A.S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p. 32-37, 2002.

Pereira, C.G.; Marques, M.O.M.; Barreto, A.S.; Siani, A.C.; Fernandes, E.C.; Meireles, M.A.A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO<sub>2</sub>+ ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 30, p. 51-61, 2004.

Peters, S.; Aust, H.J.; Draeger, S.; Schulz, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. **Mycologia** v. 90. p. 360-367, 1998.

Petrini, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S.S. (eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag. p. 179-197, 1991.

Petrini, O. Ecological and physiological aspects of host specific and endophytic fungi. In.: Redlin, S.C.; Caris, L.M. (eds.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St Paul: American Phytopathological Society Press, p. 87-100, 1996.

Piccolo, S.L.; Ferraro, V.; Alfonzo, A.; Settanni, L.; Ercolini, D.; Burruano, S.; Moschetti, G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 161-167, 2010.

Pileggi, S.A.V. **Isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 2006. 125 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

Podschun, R.; Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing, methods and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

Ribas, L.L.F.; Zanette, F.; Kulchetscki, L.; Guerra, M.P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

Rodrigues, C.M.; Brito, A.M.S.; Hiruma-Lima, C.A.; Vilegas, W. **Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gomes. (Apocynaceae)**. Livro de Resumos da 29ª Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006.

Rudgers, J.A.; Koslow, J.M.; Clay, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, v. 7, n. 1, p. 42-51, 2004.

Ryu, C.M.; Kim, J.; Choi, Ki, S.H.; Park, C.S. Improvement of biological control capacity of *Penicillium polymyxa* E681 by seed pelleting of sesame. **Biological Control**, v. 39, p. 282-289, 2006.

Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary of

results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 200, p. 14, 2001.

Sader, H.S.; Jones, R.N.; Andrade-Baiocchi, S.; Biendenbach, D.J. Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p. 273-280, 2002.

Saikkonen, K.; Faeth, S.H.; Helander, M.; Sullivan, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with hosts plants. **Annual Review of Ecology and Sistematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

Saikkonen, K.; Wäli, P.; Helander, M.; Faeth, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

Sampaio, T.S.; Nogueira, P.C.L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 606-610, 2006.

Santiago, M.; Linares, L.; Sanchez, S.; Rodriguez-Sanoja, R. Functional characteristics of the starch-binding domain of *Lactobacillus amylovorus* alpha-amylase. **Biologia**, v. 60, p. 111-114, 2005.

Schlottfeldt, F.S.; Tramontin, S.W.; Nappi, B.P.; Santos, J.I. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*: revisão da literatura sobre as implicações clinicolaboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, p. 199-204, 2002.

Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Aust, H.J.; Römmert, A.K.; Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

Schulz, B.; Boyle, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

Selosse M.-A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n. 7, p. 639-648, 2004.

Senthilkumar, M.; Govindassamy, V.; Anapurna, K. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. **Current Microbiology**, v. 55, p. 25-29, 2007.

Serra, C.P.; Cortes, S.F.; Lombardi, J.A.; Braga de Oliveira, A.; Braga, F.C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 424-432, 2005.

Sette L.D.; Passarini, M.R.Z.; Delarmelina, C.; Salati, F.; Duarte, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 1185-1195, 2006.

Sieber, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 75-89, 2007.

Silva-Junior, M.C. **100 Árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília: R.S.C., 2005. 278 p.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gossmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianopolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC, 2001. p. 87-99.

Sharma, V.K.; Nowak, J. Enhancement of Verticilium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. Strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44. p. 528-536, 1998.

Souza, A.; Souza, A.D. L.; Astolfi-Filho, S.; Belém Pinheiro, M.L.; Sarquis, M.I.M.; Pereira, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas de amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* benth. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

Souza, C.V.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 640 p.

Stierle, A.; Strobel, G.A.; Stierle, D. Taxol and taxen production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

Strobel, G.A.; Yang, X.; Sears, J.; Kramer, R.; Sidhu, R.S.; Hess, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v. 142, p. 435-440, 1996.

Strobel, G. A.; Torczynski, R.; Bollon, A. *Acremonium* sp. a lecinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). **Plant Science**, v. 128, p. 97-108, 1997.

Strobel, G.A.; Ford, E.; Li, J.Y.; Sears, J.; Sidhu, R.S.; Hess, W.M. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 426-433, 1999.

Strobel, G. A.; Dirkse, E.; Sears, J.; Markworth, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Journal of the Society for General Microbiology (SGM)**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

Strobel, G.A.; Daisy, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n. 4, p.491-502, 2003.

Strobel, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.

Strobel, G.A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

Strobel, G.A. *et al.* The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Microbiology**, v. 154. p. 3319-3328, 2008.

Tan, R.X.; Zou, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

Thomas, P.; Kumari, S.; Swarna, G.K.; Prakash, D.P.; Dinesh, M.R. Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1491-1499, 2007.

Thomazi, G.O.C. **Investigação da atividade antibacteriana de espécies de plantas do cerrado contra bactérias responsáveis por infecções do trato urinário.**

Tocantins: UFTO, 2010. 68 p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente, Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2010.

Tortora, G. J.; Funke, B.R.; Case, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

Trabulsi, L. R.; Ordonez, J. G. *Escherichia coli* enteropatogenica. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 277-288.

Tsavkelova, E.A.Q.; Cherdyntseva, T.A.; Botina, S.G.; Netnov, A.I. Bacterial associated with orchid roots and microbial production of auxines. **Microbiological Research**, v. 162, p. 69-76, 2007.

Varma, A.; Verma, S.; Sahay, S. N.; Butehorn, B.; Franken, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

Verma, V.C.; Gond, S.K.; Kumar, A.; Mishra, A.; Kharwar, R N.; Gange, A.C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and antimicrobial activity. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 749-756, 2009.

Villachica, H.; Carvalho, J.E.U.; Müller, C.H.; Diaz S.C.; Almanza, M. Mangaba. In: \_\_. **Frutales y hortalizas promisorios de la amazonia**. Lima: Tratado de Cooperacion Amazonica, 1996. p. 191-194.

von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry-exodus or revival? **Angewandte Chemie**, v. 45, n. 31, p. 5072-5129, 2006.

Vratimos, M.O.; Brandao, P. H. ; Silva, R.M.G. **Investigação do efeito do látex de *Hancornia speciosa* no desenvolvimento, ingestão de água, alimentos e o ganho de peso na nutrição experimental de camundongos**. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador, 2006.

Wang, F.W.; Jiao, R.H.; Cheng, A.B.; Tan, S.H.; Song, Y.C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 79-93, 2006.

Wagenaar, M.; Corwin, J.; Strobel, G.A.; Clardy, J. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungi in the genus *Rhinochadiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.1692-1695, 2000.

Weinberger, M.; Leibovici, L.; Perez, S.; Samra, Z.; Ostfeld, I.; Levi, I.; Bash, E.; Turner, D.; Goldschmied-Reouven, A.; Regev-Yochay, G.; Pitlik, S.D.; Keller, N. Characteristics of candidaemia with *Candida albicans* compared with non-albicans *Candida* species and predictors of mortality. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, p. 146-154, 2005.

White Jr., J.F.; Belanger, F.; Meyer, W.; Sullivan, R.F.; Bischoff, J.F.; Lewis, E.A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes - development of symbiotic interaction with plants. **Symbiosis**, v. 33, p. 201-213, 2002.

Wiyakrutta, S.; Sriubolmas, N.; Panphut, W.; Thongon, N.; Danwisetkanjana, K.; Ruangrunsi, N.; Meevootisom, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

Worapong, J.; Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.F. *Muscodor roseus* anam. sp nov., an endophyte from *Grevillea pteridifolia*. **Mycotaxon**, v. 81, p. 463-475, 2002.

Zhang, B.; Salituro, G.; Szalkowski, D.; Li, Z.; Zhang, Y.; Royo, I.; Vilella, D.; Dez, M.; Pelaez, F.; Ruby, C.; Kendall, R.L.; Mao, X.; Griffin, P.; Calaycay, J.; Zierath, J.R.; Heck, J.V.; Smith, R.G.; Moller, D.E. Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 284, p. 974-981, 1999.

Zou, W.X.; Meng, J.C.; Lu, H.; Chen, G.X.; Shi, G.X.; Zhang, T.Y.; Tan, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.

zum Felde, A.; Pocasangre, L.E.; Cañizares Monteros, C.A.; Sikora, R.A.; Rosales, F.E.; Riveros, A.S. Effects of combined inoculations of endophytic fungi on biocontrol of the burrowing nematode (*Radopholus similis*) in banana. **The International Magazine on Banana and Plantain**, v. 15, n.1-2, p. 12-18, 2006.



**5.1 Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da casca do caule de  
*Hancornia speciosa* Gomes**

Artigo a ser submetido

**Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados da casca do caule de *Hancornia speciosa* Gomes**

Mardonny Bruno de Oliveira Chagas<sup>1</sup>; Irailton Prazeres dos Santos<sup>1</sup>; Janete Magali de Araújo<sup>2</sup>; Marilene da Silva Cavalcanti<sup>1</sup>; Vera Lúcia de Menezes Lima<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Nelson Chaves, S/Nº, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-420, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Nelson Chaves, S/Nº, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-420, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, S/Nº, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-420, Brazil.

\* Author to whom correspondence should be addressed.

Tel: + 55 81-3271 8540;

Fax: + 55 81-3271 8541

e-mail: [vlml@ufpe.br](mailto:vlml@ufpe.br)

**Resumo:** Este estudo consiste na investigação e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos associados à casca do caule de *Hancornia speciosa* Gomes. Foram isolados 14 espécies de endofíticos em diferentes períodos do ano. Após triagem através do método de difusão em meio sólido com bloco de ágar foram selecionados os dez isolados endofíticos mais ativos para obtenção de extratos metanólicos brutos. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente a, no mínimo, um micro-organismo teste. A melhor concentração mínima inibitória (CMI) deste estudo foi de 39  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  obtida com o extrato metanólico do fungo *Aspergillus niger* (FHS058) contra *Staphylococcus aureus*. O valor da menor concentração mínima bactericida (CMB) foi de 312  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  obtida a partir do extrato metanólico do isolado *A. niger* (FHS061) contra *S. aureus*. O extrato de *Fusarium solani* (FHS106) contra *Klebsiella pneumoniae* apresentou CMI de 78  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e CMB 625  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . A melhor atividade contra *Candida albicans* foi observada com o extrato metanólico de *F. solani* (FHS105) com CMI de 312  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e concentração mínima fungicida (CMF) de 1250  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Os resultados indicam que a casca do caule de *H. speciosa* abriga uma diversidade de espécies de fungos endofíticos, muitos dos quais são notáveis alvos de interesse biotecnológico na busca por novas moléculas bioativas importantes na luta contra agentes infecciosos ao homem.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*; Casca do caule; Extrato metanólico; *Fusarium solani*

## Introdução

O desenvolvimento de resistência às drogas por bactérias e fungos patogênicos ao homem contribuem para o ressurgimento de várias infecções ainda mais graves quando em proporção mundial. Além disso, o envelhecimento populacional em países emergentes como o Brasil, o crescente número de pacientes imuno-comprometidos e o fluxo contínuo de viajantes agravam muito esta situação tornando necessária uma busca intensiva por novos e efetivos agentes antimicrobianos.

As plantas podem servir como reservatório de inúmeros micro-organismos conhecidos como endofíticos que colonizam os espaços inter e intracelulares do tecido vegetal sem causar danos aparentes (Azevedo e Araújo 2007). Ademais, representam uma importante fonte genética para a biotecnologia, tendo estimulado o interesse da comunidade científica devido à produção de metabólitos secundários com aplicações, principalmente, na medicina moderna, agricultura e indústria (Yu et al. 2010). Entre os micro-organismos endofíticos, os fungos mantêm uma íntima relação com os vegetais hospedeiros e podem produzir compostos que favorecem o crescimento vegetativo, a competitividade do hospedeiro e proteção contra herbívoros e patógenos (Porras-Alfaro e Bayman, 2011). Por isso, os fungos endofíticos têm se destacado como um excelente alvo de compostos com atividade antimicrobiana (Radić e Štrukelj, 2012).

A busca por novas espécies de fungos endofíticos com potencial antimicrobiano tem sido, principalmente, as plantas utilizadas na medicina tradicional. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), conhecida popularmente como mangabeira, é nativa do Brasil e normalmente encontrada na Floresta Tropical Amazônica, Cerrado e Caatinga (Silva et al. 2011). Atividades biológicas são frequentemente observadas para *H. speciosa* com destaque para o uso das cascas do caule como antimicrobiano (Costa et al. 2008), das folhas como anti-hipertensivo (Serra et al. 2005; Ferreira et al. 2007), antiulceroso, anti-*Helicobacter pylori* (Moraes et al. 2008), bem como, do látex como anti-inflamatório (Marinho et al. 2011). Entretanto, poucos estudos sobre a biota endofítica de *H. speciosa* foram publicados até o momento. Este estudo é a primeira investigação na busca por fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa*, cujo tecido vegetal é utilizado na medicina popular como antimicrobiano.

Neste contexto, o caráter antimicrobiano das cascas do caule de *H. speciosa* fundamenta a investigação do potencial antimicrobiano dos fungos endofíticos deste tecido vegetal contra bactérias e fungos patogênicos ao homem.

## **Materiais e métodos**

### **Área de coleta e amostragem**

A coleta do material botânico foi realizada nos períodos chuvoso (julho) de 2010 e seco (janeiro) de 2011, na região litorânea do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (08°24.334 S, 34°94.384 W). A cada período do ano três amostras de cascas do caule foram coletadas de cinco indivíduos de *H. speciosa*, em pontos diferentes e equidistantes e processadas no mesmo dia da coleta.

### **Isolamento dos fungos endofíticos**

As frações de cascas coletadas foram lavadas com detergente neutro e água destilada estéril e após secagem natural, foram retirados 6 fragmentos que foram desinfetados, a fim de eliminar os micro-organismos epifíticos presentes na superfície das amostras segundo Araújo et al. (2010). Após a desinfestação, os fragmentos foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (50 mg / L<sup>-1</sup>), visando suprimir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 dias. As colônias fúngicas foram isoladas, purificadas e preservadas em meio BDA. Em seguida foi calculada a frequência relativa de colonização (Araújo et al. 2010).

### **Identificação dos fungos endofíticos**

A identificação foi realizada através da observação das características macro e microscópicas das colônias nos meios de cultura BDA, ágar - Sabouraud (SAB), Czapek - ágar (CZ) e extrato de malte - ágar (MEA) utilizando metodologia e literatura específica (Mason e Ellis 1953; Morton e Smith 1963; Booth 1971; Ellis 1971 e 1976; Sutton 1980; Barnett e Hunter 1988; Hanlin 2000; Samson e Frisvad 2004; Kirk et al. 2008).

## Screening de atividade antimicrobiana

Todos os fungos endofíticos isolados foram submetidos ao ensaio antimicrobiano em meio sólido baseado na metodologia descrita por Zhou (2006) a qual permite uma seleção rápida e qualitativa de micro-organismos bioativos. Os micro-organismos teste foram obtidos na Coleção de Culturas da Micoteca - URM do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil e na Coleção de Culturas - UFPEDA do Departamento de Antibióticos da mesma universidade. Os inóculos dos fungos *Candida albicans* URM - 5825, *Candida krusei* UFPEDA - 1002, *Candida tropicalis* URM - 5871 e *Malassezia furfur* URM - 4220 foram padronizados por meio da escala Mc Farland nº 1 em densidade óptica, que corresponde a  $3 \times 10^8$  UFC/mL e para as bactérias *Staphylococcus aureus* UFPEDA - 02, *Bacillus subtilis* UFPEDA - 86, *Escherichia coli* UFPEDA - 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA - 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA - 416 e *Proteus mirabilis* - UFPEDA - 767, densidade óptica 0,5 que corresponde de 1 a  $2 \times 10^8$  UFC/mL.

Todos os fungos isolados foram cultivados em forma de tapete em placa de Petri contendo o meio SAB a  $28 \pm 2$  ° C por sete dias. Após este período, com o auxílio de um vazador estéril foram obtidos blocos de 5 mm de diâmetro de cada isolado que foram transferidos para placas de Petri com os meios Muller-Hinton-Ágar (MHA), SAB e SAB suplementado com 0,5% de azeite de oliva extra virgem, previamente semeados, com as suspensões devidamente padronizadas de bactérias, fungos e com o fungo *M. furfur*, respectivamente. As placas de Petri foram incubadas a 37 ° C por 24 horas para o teste com bactérias e a 30 ° C por 48 horas para o teste com fungos. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros após o período de incubação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

## Cultivo em meio semi-sólido para obtenção dos extratos metanólicos brutos

Inicialmente os isolados selecionados foram cultivados em placa de Petri contendo o meio SAB à temperatura ambiente por sete dias. Com o auxílio de um vazador estéril foram obtidos de cada colônia cinco inóculos de 5 mm de diâmetro. O preparo do meio semi-sólido foi realizado em frascos de Erlenmeyers (1000 mL) contendo 100 g de arroz parboilizado tipo 1 (Camil, Brasil) e 100 mL de água destilada esterilizada. Após 24 h o meio foi autoclavado e os inóculos foram transferidos para o

meio semi-sólido e cultivados a  $35 \pm 2$  ° C de modo estático por 30 dias (Aly et al. 2008). Utilizando as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente os isolados também foram cultivados no meio semi-sólido de grãos de milho (Yoki, Brasil). Meios semi-sólidos de milho e arroz sem inóculos também foram incubados pelo mesmo período e utilizados como controle.

Terminado o período de incubação foi adicionado 300 mL de metanol (MeOH) em cada frasco Erlenmeyer e, após 24 horas, submetido a maceração e filtração por gravidade. O líquido orgânico resultante da filtração foi rota-evaporado, em temperatura inferior a 50 ° C, para concentração dos metabólitos (Cafêu et al. 2005). Após seco e pesado o precipitado foi ressuspensionado em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 100 mg/mL.

#### Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A determinação da concentração mínima inibitória dos extratos foi realizada segundo a metodologia da diluição em caldo (microtécnica) proposta pelo National Committee for Clinical Laboratory Standard - NCCLS (2002) e NCCLS (2003) com modificações. Após a micropipetagem as placas multipoços foram fechadas e incubadas a 37 °C por 24 h (bactérias) e 48 h (leveduras). Terminado o período de cultivo, foram adicionados 15 µL de resazurina 0,01% em cada poço, após 4 h de reincubação, a leitura foi realizada. A menor concentração do extrato que inibiu o crescimento visível foi registrada como a CMI.

#### Determinação das concentrações mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF)

A determinação das concentrações mínima bactericida (CMB) e mínima fungicida (CMF) foram realizadas concomitantemente com a concentração mínima inibitória (CMI) conforme metodologia descrita por Escalona-Arranz (2010) com modificações. Uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada concentração a partir da CMI já estabelecida e inoculada em placas de Petri contendo os meios sólidos MHA para bactérias e SAB para leveduras. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 e 48h para bactérias e leveduras, respectivamente. A CMB/CMF foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície dos meios, ou seja, com 99,9 % de morte microbiana.

## Resultados

### Fungos endofíticos isolados da casca do caule de *H. speciosa*

Ao final das coletas, dos 180 fragmentos analisados (90 em cada período do ano) foram obtidos 116 isolados de fungos endofíticos, o que corresponde a 64,4 % da frequência total de colonização. No que se refere ao período do ano foram obtidos 40 isolados no período seco e 76 no chuvoso. No período seco a frequência de colonização foi de 44,4 %, enquanto no período chuvoso esta taxa foi de 84,4 %.

Os fungos endofíticos isolados foram agrupados em 14 espécies sendo *Phoma cava* a espécie mais frequente (13,8 %), seguida de *Colletotrichum gloeosporioides* (12,1 %), *Lasiodiplodia theobromae* (11,2%), *Trichoderma harzianum* (9,5 %), *Phomopsis archeri* (8,7%), *Aspergillus niger* (6,9 %), *Penicillium fellutanum* (6,9 %), *Nigrospora sphaerica* (6 %) e *Fusarium solani* (5,2 %). A ocorrência de espécies ocasionais também foi observada neste estudo, sendo representadas por: *Aspergillus flavus*, *Fusarium lateritium*, *Tritirachium oryzae*, *Cladosporium cladosporioides* e *Marianea elegans*. Os isolados que não desenvolveram estruturas reprodutivas, necessárias à classificação, foram agrupados como *Mycelia sterilia* (Tabela 1).

### Screening de atividade antimicrobiana

No total, dos 116 fungos endofíticos isolados 33,6 % (39) apresentaram atividade antimicrobiana com halos de inibição variando de 11 a 39 mm de diâmetro para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras patogênicas, observando-se então um amplo espectro de ação dos isolados (Tabela 2). Neste estudo consideramos halos menores que 10 mm como pouco ativos, entre 10 e 20 mm moderadamente ativos e maiores que 20 mm como ativos (Wang et al. 2007).

### CMI e CMB/CMF dos extratos metanólicos brutos obtidos a partir da fermentação dos fungos endofíticos nos meios semi-sólidos de milho e arroz

Os dez fungos endofíticos *A. flavus* (FHS012), *A. flavus* (FHS018), *A. niger* (FHS058), *A. niger* (FHS059), *A. niger* (FHS061), *F. solani* (FHS105), *F. solani* (FHS106), *L. theobromae* (FHS070), *L. theobromae* (FHS074) e *P. fellutanum* (FHS089) que apresentaram halos de inibição com média  $\geq 20$  mm de diâmetro frente

ao maior número de micro-organismos patogênicos testados foram selecionados para o ensaio fermentativo em meio semi-sólido. Foram utilizados os meios semi-sólidos de milho e arroz para obtenção do extrato bruto metanólico e, posteriormente, determinação da CMI e CMB/CMF.

A análise da microdiluição dos extratos brutos metanólicos dos fungos endofíticos, obtidos através da fermentação em meios semi-sólidos, apresentaram atividade bacteriostática/fungistática e ação bactericida e fungicida contra os micro-organismos patogênicos testados. As CMIs variaram entre 19 e 2.500  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e as CMBs / CMFs entre 312 e  $>5000 \mu\text{g/mL}^{-1}$  (Tabela 3). Os extratos brutos metanólicos de *A. niger* (FHS058), *A. niger* (FHS061) apresentaram CMI de 39  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e CMB de 312  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  contra *S. aureus*, enquanto o extrato de *F. solani* (FHS106) apresentou CMI de 78  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e CMB 625  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  para *K. pneumoniae*. As bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae* são patógenos frequentemente isolados em pacientes acometidos por infecções hospitalares. No presente estudo, o extrato do fungo *A. niger* (FHS061) também apresentou a menor CMI para *P. mirabilis* (19  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ), a qual é uma bactéria Gram - negativa associada a infecções urinárias e cálculos renais. A melhor atividade contra *C. albicans* foi observada com o extrato metanólico do endofítico *F. solani* (FHS105) que apresentou CMI de 312  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e CMF de 1250  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ .

Na determinação da CMI, os controles utilizados foram válidos, uma vez que se detectou crescimento microbiano nos poços selecionados para controle positivo (C+); ausência de crescimento microbiano nos poços que não receberam inóculo, indicando a esterilidade do DMSO e do meio de cultura, controle negativo (C-). Além disso, o DMSO não inibiu o crescimento microbiano nos poços sem o extrato, caracterizando a eficácia do controle do solvente (Cs). Os extratos controle obtidos somente a partir dos meios de milho e arroz não apresentaram atividade antimicrobiana.

## Discussão

As espécies *P. cava*, *C. gloeosporioides* e *L. theobromae* apresentaram maior frequência de colonização e como relatados por Xing et al. (2010) e Siqueira et al. (2011) apenas algumas espécies são encontradas com maior frequência em relação às demais. As espécies que ocorrem em maior frequência, provavelmente, são aquelas que apresentam maior afinidade com a planta hospedeira a partir da incorporação de informações genéticas do vegetal o que lhes permite melhorar a adaptação e realizar funções tais como proteção contra patógenos (Tan e Zou 2001; Strobel 2003). Além

disso, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Phomopsis* e *Trichoderma* que foram isolados neste trabalho são frequentemente relatados como endofíticos de plantas tropicais e subtropicais (Banerjee, 2011). Os resultados mostraram que as menores taxas de colonização foram observadas para as espécies *C. cladosporioides*, *M. elegans* e *T. oryzae*. Em geral estas espécies podem ser classificadas como ocasionais, visto que, estão representadas por poucos isolados entre centenas e que investigações de isolados endofíticos invariavelmente geram longas listas de espécies ocasionais (Verma et al. 2007; Siqueira et al. 2011; Sun et al. 2012). Adicionalmente, também foram isolados endofíticos que não desenvolveram estruturas reprodutivas necessárias à identificação após determinado período de cultivo. Estes isolados são classificados como *Mycelia sterilia* e sua ocorrência é muito comum em estudos com endofíticos (Su et al. 2010; Siqueira et al. 2011; Gond et al. 2012). Observamos que a frequência de endofíticos isolados no período chuvoso foi maior do que no período seco, porém, estudos sobre a influência da sazonalidade e idade dos tecidos vegetais em relação a comunidade endofítica de coníferas, foram realizados por Guo et al. (2008) os quais observaram que os fungos endofíticos são bastante afetados pela sazonalidade, mas, esta não influencia visivelmente na diversidade da comunidade. A frequência de colonização pode ser amplamente variável em decorrência de inúmeros fatores, entre eles, as condições climáticas do local de coleta (Taylor et al. 1999). Arnold et al. (2003) sugerem que a frequência de colonização pode ser influenciada por diversos fatores como névoas, chuvas e orvalho, pois, podem servir de veículo para os esporos de fungos, que penetram nos tecidos vegetais e colonizam a planta como endofíticos. Naik et al. (2008) obteve em seus estudos uma frequência de isolados endofíticos maior no inverno em relação ao período das monções e verão.

Sobre o potencial antimicrobiano, uma das propriedades mais importantes dos micro-organismos endofíticos, em especial os fungos, está associada ao seu potencial metabólico em produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas muitas vezes protegendo a planta de agentes patogênicos (Tan e Zou 2001; Strobel 2003). Muitas dessas moléculas bioativas isoladas a partir de endofíticos pertencem a várias classes estruturais como alcaloides, peptídeos, esteroides, terpenóides, fenóis, quinonas e flavonóides que foram relatadas em diversos estudos (Yu et al. 2010). Compostos naturais sintetizados por fungos endofíticos têm sido observados inibindo uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos que afetam homens e animais (Gunatilaka 2006; Wiyakrutta et al. 2004). Neste trabalho, a porcentagem de fungos endofíticos

ativos da casca de *H. speciosa* é compatível e até mesmo superior a alguns resultados encontrados por outros autores em ensaios semelhantes. Estudos com fungos endofíticos dos mesmos gêneros e espécies dos isolados em nosso trabalho revelaram a enorme capacidade de produção de compostos biativos com potencial antimicrobiano, em alguns os compostos foram isolados e identificados. Hoffman et al. (2008) isolaram os compostos phomodine, ácido úsnico e cercosporamida de *Phoma* sp. ativos frente à *E. coli* e *S. aureus*. Extratos dos fungos endofíticos *Lasiodiplodia* sp. *Fusarium* sp. e *F. solani* foram ativos contra *E. coli* (Chen et al. 2010). Ramasamy et al. (2010) utilizaram com sucesso o extrato bruto de acetato de etila de *Aspergillus* sp. contra *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Micrococcus luteus*. Arivudainambi et al. (2011) revelaram o potencial antimicrobiano dos extratos orgânicos brutos de *Colletotrichum gloesporioides* contra bactérias patogênicas ao homem. Nesta mesma linha, ainda podemos destacar outros estudos com endofíticos de gêneros semelhantes aos dos nossos isolados com potencial antimicrobiano (Xing et al. 2011; Buatong et al. 2011; Siqueira et al. 2011). Os isolados que não apresentaram estruturas reprodutivas para identificação foram designados como *M. sterilia* também foram ativos contra alguns dos micro-organismos testados sugerindo que o potencial antimicrobiano pode ser independente dos processos reprodutivos de cada isolado. Fungos endofíticos classificados como *M. sterilia* isolados da planta medicinal *Camptotheca acuminata*, apresentaram atividade contra as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e contra o fungo *C. albicans* (Lin et al. 2007).

A relação entre o meio de cultivo utilizado na fermentação e a determinação das CMI e CMB / CMFs mostrou boa atividade antimicrobiana nos extratos dos fungos fermentados no meio semi-sólido de arroz. Este resultado está em concordância ao afirmado por Demain (2006) e Frisvald et al. (2008), que sugerem que a produção de metabólitos bioativos depende muito do meio de cultura onde o fungo é cultivado. Verificou-se que ao preparar o meio de cultura semi-sólido de arroz formavam-se interstícios entre os grãos, no qual garantia um aumento notável da superfície do meio, o que permitia ao fungo penetrar totalmente na massa do substrato. O meio de arroz oferece maior área de desenvolvimento do fungo, porém, somente um trabalho químico, deve esclarecer a importância do meio semi-sólido de arroz no cultivo de endofíticos produtores de compostos com atividade antimicrobiana.

Tratando-se dos valores das CMI e CMB / CMFs, resultados semelhantes aos nossos foram reportados por Sette et al. (2006) que obtiveram CMI entre 25 e 1000

$\mu\text{g/mL}^{-1}$  para *Salmonella choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* utilizando extratos de fungos endofíticos de plantas do gênero *Coffea*. Extratos de fungos endofíticos, dos mesmos gêneros dos isolados neste trabalho (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.), de várias espécies de plantas do gênero *Garcinia*, obtidos com acetato de etila, apresentaram CMI's entre 128 e 256  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  contra *S. aureus* e *S. aureus* meticilina-resistentes (Phongpaichit et al. 2006). Extratos brutos de fungos endofíticos isolados de espécies vegetais de manguezais apresentaram CMI's entre 32 e 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  contra *S. aureus* e *S. aureus* meticilina-resistentes, para *C. albicans* a CMI's determinadas ficaram entre 128 e  $>200 \mu\text{g/mL}^{-1}$  (Buatong et al. 2011). Neste mesmo estudo também foram determinadas as CMBs para *S. aureus*, 64 -  $>200 \mu\text{g/mL}^{-1}$  e para *S. aureus* meticilina-resistentes, 64 -  $>200$ , além disso, a CMF para *C. albicans* foram maiores ou iguais a 200  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Compostos obtidos do extrato do fungo endofítico *Ampelomyces* sp. isolado da planta medicinal *Urospermum picroides*, cultivado em meio de arroz, apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* com CMI entre 12,5 e 25  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  (Aly et al. 2008). Mohanta et al. (2008), demonstraram que o extrato do fungo endofítico *Fusarium* sp., cultivado em meio líquido, apresentava CMI's de, 250, 376, 260, 126 e 273  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  para *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *C. albicans*, respectivamente.

De forma geral, os resultados contribuíram para evidenciar a diversidade de fungos endofíticos na casca de *H. speciosa* e a importância destes micro-organismos como alvos promissores de compostos bioativos com potencial antimicrobiano. Futuros trabalhos devem ser realizados com o objetivo de aperfeiçoar as condições de cultivo para a produção de compostos bioativos, bem como, realizar a caracterização química dos mesmos e empregá-los diretamente ou como base para a síntese de novos agentes com atividade antimicrobiana.

### Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco (PROPESQ-UFPE) pelo suporte durante a realização deste trabalho.

## Referências

- Aly AH, Edrada-Ebel R, Wray V, Müller WEG, Kozytska, S, Hentschel U, Proksch P, Ebel R (2008) Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* 69:1716-1725. doi:10.1016/j.phytochem.2008.02.013
- Araújo WL, Lacava PT, Marcon J, Lima AOS, Sobral JK, Pizzirani-kleiner AA, Azevedo JL (2010) Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos, 2nd edn. Copiadora Luiz de Queiroz, Piracicaba
- Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15649-15654. doi\_10.1073\_pnas.2533483100
- Arivudainambi US, Anand TD, Shanmugaiah V, Karunakaran C, Rajendran A (2011) Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 61:340-345. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00780.x
- Azevedo JL, Araújo WL (2007) Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds) *Fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton, pp 189-207
- Banerjee D (2011) Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. *Research Journal of Microbiology* 6:54-62. doi: 10.3923/jm.2011.54.62
- Barnett HL, Hunter BB (1988) *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th edn. APS Press, St. Paul
- Booth C (1971) *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew
- Buatong J, Phongpaichit S, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J (2011) Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:3005-3008. doi: 10.1007/s11274-011-0765-8
- Cafêu MC, Silva GH, Teles HL, Bolzani VS, Araújo AR, Young MCM, Pfenning LH (2005) Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de

*Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). Química Nova 28:991-995. doi: 10.1590/S0100-40422005000600011

Chen XM, Dong HL, Hu KX, Sun ZR, Chen JA, Guo SX (2010) Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. Journal of Plant Growth Regulation 29:328-337. doi: 10.1007/s00344-010-9139-y

Costa ES, Hiruma-Lima CA, Lima EO, Sucupira GC, Bertolin AO, Lolis SF, Andrade FD, Vilegas W, Souza-Brito AR (2008) Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. Phytotherapy Research 22:705-707. doi: 10.1002/ptr.2397

Demain AL (2006) From natural products discovery to commercialization: a success history. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 33:486-495. doi: 10.1007/s10295-005-0076-x

Ellis MB (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Ellis MB (1976) More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Escalona-Arranz JC, Péres-Roses R, Urdaneta-Laffita I, Camacho-Pozo MI, Rodríguez-Amado J, Licea-Jiménez I (2010) Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. Pharmacognosy magazine 6:242-247. doi: 10.4103/0973-1296.66944

Ferreira HC, Serra, CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF (2007) Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. Phytomedicine 14:473-478. doi: 10.1016/j.phymed.2006.11.008

Frisvald J, Andersen B, Thrane U (2008) The use of secondary metabolites profiling in the chemotaxonomy of filamentous fungi. Mycological Research 105:231-240. doi: 10.1016/j.mycres.2007.08.018

Gond SK, Mishra A, Sharma VK, Verma SK, Kumar J, Kharwar RN, Kumar A (2012) Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. Mycoscience 53:113-121. doi: 10.1007/s10267-011-0146-z

Gunatilaka AAL (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and applications of their occurrence. *Journal of Natural Products* 69:509-526. doi:10.1021/np058128n.

Guo LD, Huang GR, Wang Y (2008) Seasonal and Tissue Age Influences on Endophytic Fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology* 50:8 997-1003. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00394.x

Hanlin RT (2000) Illustrated genera of Ascomycetes, vol. II. APS Press, St. Paul

Hoffman AM, Mayer SG, Strobel GA, Hess WM, Sovocool GW, Grange AH, Harper JK, Arif AM, Grant DM, Kelley-Swift EG (2008) Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochemistry* 69:1049-1046. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.10.031

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) Dictionary of the Fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford

Lin X, Lu C, Huang Y, Zheng Z, Su W, Shen Y (2007) Endophytic fungi from a pharmaceutical plant *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23:1037-1040. doi: 10.1007/s11274-006-9329-8

Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD (2011) The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 135:530-537. doi:10.1016/j.jep.2011.03.059

Mason EW, Ellis MB (1953) British species of *Periconia*. *Mycological Papers* 56:1-127

Mohanta J, Tayung K, Mohapatra U (2008) Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology* 5(2). doi: 10.5580/80b

Moraes TM, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, Brito A, Hiruma-Lima CA (2008) *Hancornia speciosa*: indications of gastroprotective, healing and anti - *Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology* 120:161-168. doi:10.1016/j.jep.2008.08.001

Morton FJ, Smith G (1963) The genera *Scopulariopsis* Bainier, *Microascus* Zukal and *Doratomyces* Corda. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Naik BS, Shashikala J, Krishnamurthy YL (2008) Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Fungal Ecology* 1:89-93. doi: 10.1016/j.funeco.2008.05.001

National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard, 2nd edn. NCCLS document M27-A2, Wayne

National Committee for Clinical Laboratory Standard (2003) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard, 6th edn. NCCLS document M7-A6, Wayne

Porras-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 49:291-315. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081831

Phongpaichit S, Rungjindamai N, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J (2006) Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Gacinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 87:79-99. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00155.x

Radić N, Štrukelj B (2012) Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine* 19:1270-1284. doi: 10.1016/j.phymed.2012.09.007

Ramasamy K, Lim SM, Abu Bakar H, Ismail N, Ismail MS, Ali MF, Weber JF, Cole AL (2010) Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. *Phytotherapy Research* 24:640-643. doi: 10.1002/ptr.2891

Serra CP, Cortes SF, Lombardi JA, Braga de Oliveira A, Braga FC (2005) Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine* 12:424-432. doi: 10.1016/j.phymed.2004.07.002

Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, Salati F, Duarte MCT (2006) Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants.

World Journal of Microbiology and Biotechnology 22:1185-1195. doi: 10.1007/s11274-006-9160-2

Siqueira VM, Conti R, Araújo JM, Souza-Motta CM (2011) Endophytic fung ifrom the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. Symbiosis 53:89-95. doi: 10.1007/s13199-011-0113-7

Silva TF, Coelho MRR, Vollú RE, Goulart FRV, Alviano DS, Alviano CS, Seldin L (2011) Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil. Antonie van Leeuwenhoek 99:523-532. doi: 10.1007/s10482-010-9520-7

Strobel GA (2003) Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection 5:535-544. doi:10.1016/S1286-4579(03)00073-x

Su YY, Guo LD, Hyde KD (2010) Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. Fungal Diversity 43:93-101. doi: 10.1007/s13225-010-0040-6

Sun X, Ding Q, Hyde KD, Guo LD (2012) Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. Fungal Ecology 5:624-632. doi: 10.1016/j.funeco.2012.04.001

Samson RA, Frisvad JC (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomics schemes, mycotoxins and other extrolites. Studies in Micology 49:1-260. doi: 10.1017/s095375620500300x

Sutton CB (1980) The Coelomycetes fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew

Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolities. Natural Product Reports 18: 448-459. doi: 10.1039/ b100918o

Taylor JE, Hyde KD, Jones EBG (1999) Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. New Phytologist 142:335-346. doi: 10.1046/j.1469-8137.1999.00391.x

Verma VC, Gond SK, Kumar A, Kharwar RN, Strobel G (2007) The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). *Microbial Ecology* 54:119-125. doi: 10.1007/s00248-006-9179-9

Wang FW, Jiao RH, Cheng AB, Tan SH, Song YC (2007) Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:79-93. doi: 10.1007/s11274-006-9195-4

Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrungsi N, Meevootisom V (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20:265-272. doi: 10.1023/B:WIBI.0000023832.27679.a8

Xing X, Guo S, Fu J (2010) Biodiversity and distribution of endophytic fungi associated with *Panax quinquefolium* L. cultivated in a forest reserve. *Symbiosis* 51:161-166. doi: 10.1007/s13199-010-0062-6

Xing YM, Chen J, Cui JL, Chen XM, Guo SX (2011) Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. *Current Microbiology* 62:1218-1224. doi: 10.1007/s00284-010-9848-2

Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, Sun P, Qin L (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* 165:437-449. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.009

Zhou DQ (2006) *Laboratory Experiment in Microbiology*. Higher Education publishing Inc., Beijing

## Tabelas e figuras

**Tabela 01.** Frequência absoluta e frequência relativa de fungos endofíticos de *H. speciosa* por período do ano.

| Fungos endofíticos                                          | P.C.      |      | P.S.      |      | P.C.+P.S.  |      |
|-------------------------------------------------------------|-----------|------|-----------|------|------------|------|
|                                                             | F         | F%   | F         | F%   | F          | F%   |
| <i>Aspergillus flavus</i> Link                              | 4         | 5,3  | 1         | 2,5  | 5          | 4,3  |
| <i>Aspergillus niger</i> Tiegh                              | 5         | 6,6  | 3         | 7,5  | 8          | 6,9  |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries | -         | -    | 3         | 7,5  | 3          | 2,6  |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. | 6         | 7,9  | 8         | 20   | 14         | 12,1 |
| <i>Fusarium lateritium</i> Nees                             | 4         | 5,3  | -         | -    | 4          | 3,4  |
| <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.                        | 6         | 7,9  | -         | -    | 6          | 5,2  |
| <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Grif. Maubl.         | 8         | 10,5 | 5         | 12,5 | 13         | 11,2 |
| <i>Mariannaea elegans</i> G. Arnaud                         | -         | -    | 2         | 5    | 2          | 1,7  |
| <i>Mycelia sterilia</i>                                     | 3         | 3,9  | 2         | 5    | 5          | 4,3  |
| <i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason.                  | 4         | 5,3  | 3         | 7,5  | 7          | 6,0  |
| <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge                       | 8         | 10,5 | -         | -    | 8          | 6,9  |
| <i>Phoma cava</i> Schulzer                                  | 6         | 7,9  | 10        | 25   | 16         | 13,8 |
| <i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton.                         | 10        | 13,1 | -         | -    | 10         | 8,7  |
| <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.                         | 8         | 10,5 | 3         | 7,5  | 11         | 9,5  |
| <i>Tritirachium oryzae</i> (Vincens) de Hoog                | 4         | 5,3  | -         | -    | 4          | 3,4  |
| <b>Total</b>                                                | <b>76</b> |      | <b>40</b> |      | <b>116</b> |      |

P.C.: Período chuvoso;

P.S.: Período seco;

F: Frequência absoluta dos isolados fúngicos;

F%: Frequência relativa dos isolados fúngicos;

- : Não isolado.

**Tabela 2.** Screening de atividade antimicrobiana de fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa*.

| Código | Fungo endofítico          | Período | Micro-organismos teste |                |                      |                      |                     |                  |                    |                  |                      |                  |
|--------|---------------------------|---------|------------------------|----------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------------|------------------|
|        |                           |         | <i>B. subtilis</i>     | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. mirabilis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. krusei</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>M. furfur</i> |
| FHS012 | <i>A. flavus</i>          | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | +++                  | ++                  | ++               | ++                 | -                | -                    | +                |
| FHS018 | <i>A. flavus</i>          | P.C.    | ++                     | +              | ++                   | +++                  | ++                  | ++               | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS019 | <i>A. flavus</i>          | P.C.    | ++                     | ++             | +                    | ++                   | ++                  | +++              | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS061 | <i>A. niger</i>           | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | ++                  | +                | -                  | -                | -                    | +                |
| FHS058 | <i>A. niger</i>           | P.C.    | ++                     | ++             | +++                  | ++                   | ++                  | ++               | +                  | +                | -                    | +                |
| FHS042 | <i>C. gloeosporioides</i> | P.C.    | +                      | -              | -                    | ++                   | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS051 | <i>F. lateritium</i>      | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | +                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS052 | <i>F. lateritium</i>      | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | +                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS101 | <i>F. solani</i>          | P.C.    | ++                     | ++             | +                    | +                    | ++                  | ++               | +                  | -                | -                    | +                |
| FHS105 | <i>F. solani</i>          | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | -                   | ++               | +                  | -                | -                    | ++               |
| FHS106 | <i>F. solani</i>          | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | +++                 | ++               | +                  | -                | -                    | -                |
| FHS109 | <i>F. solani</i>          | P.C.    | ++                     | ++             | +                    | ++                   | +                   | ++               | +                  | -                | -                    | +                |
| FHS070 | <i>L. theobromae</i>      | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | +                   | ++               | -                  | -                | -                    | +                |
| FHS073 | <i>L. theobromae</i>      | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | -                   | +                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS115 | <i>M. sterila</i>         | P.C.    | +                      | -              | -                    | +                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS089 | <i>P. fellutanum</i>      | P.C.    | +++                    | ++             | ++                   | ++                   | -                   | ++               | -                  | -                | -                    | +                |
| FHS093 | <i>P. fellutanum</i>      | P.C.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | -                   | +                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS096 | <i>P. fellutanum</i>      | P.C.    | +                      | ++             | ++                   | +                    | -                   | ++               | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS005 | <i>P. archeri</i>         | P.C.    | ++                     | ++             | +                    | -                    | ++                  | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS003 | <i>P. archeri</i>         | P.C.    | ++                     | -              | -                    | -                    | ++                  | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS100 | <i>T. oryzae</i>          | P.C.    | +                      | +              | -                    | ++                   | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS059 | <i>A. niger</i>           | P.S.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | ++                  | +                | ++                 | -                | -                    | -                |
| FHS067 | <i>A. niger</i>           | P.S.    | ++                     | +              | +                    | +                    | -                   | +                | -                  | -                | +                    | +                |
| FHS041 | <i>C. cladosporioides</i> | P.S.    | -                      | -              | +                    | ++                   | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS046 | <i>C. gloeosporioides</i> | P.S.    | +                      | -              | -                    | ++                   | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS049 | <i>C. gloeosporioides</i> | P.S.    | -                      | -              | -                    | +                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS074 | <i>L. theobromae</i>      | P.S.    | ++                     | ++             | ++                   | ++                   | -                   | ++               | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS075 | <i>L. theobromae</i>      | P.S.    | ++                     | ++             | +                    | ++                   | -                   | +                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS079 | <i>L. theobromae</i>      | P.S.    | ++                     | +              | +                    | ++                   | +                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS090 | <i>M. elegans</i>         | P.S.    | +                      | -              | -                    | -                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS091 | <i>M. elegans</i>         | P.S.    | +                      | -              | -                    | -                    | +                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS114 | <i>M. sterila</i>         | P.S.    | -                      | ++             | -                    | -                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS116 | <i>M. sterila</i>         | P.S.    | +                      | -              | -                    | -                    | -                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS031 | <i>N. sphaerica</i>       | P.S.    | ++                     | -              | -                    | ++                   | ++                  | ++               | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS032 | <i>N. sphaerica</i>       | P.S.    | +                      | +              | +                    | +                    | +                   | +                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS065 | <i>P. cava</i>            | P.S.    | -                      | -              | +                    | +                    | ++                  | ++               | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS066 | <i>P. cava</i>            | P.S.    | +                      | -              | +                    | +                    | ++                  | ++               | -                  | -                | -                    | +                |
| FHS033 | <i>T. harzianum</i>       | P.S.    | -                      | -              | -                    | -                    | +                   | -                | -                  | -                | -                    | -                |
| FHS037 | <i>T. harzianum</i>       | P.S.    | -                      | -              | -                    | +                    | -                   | -                | -                  | +                | -                    | -                |

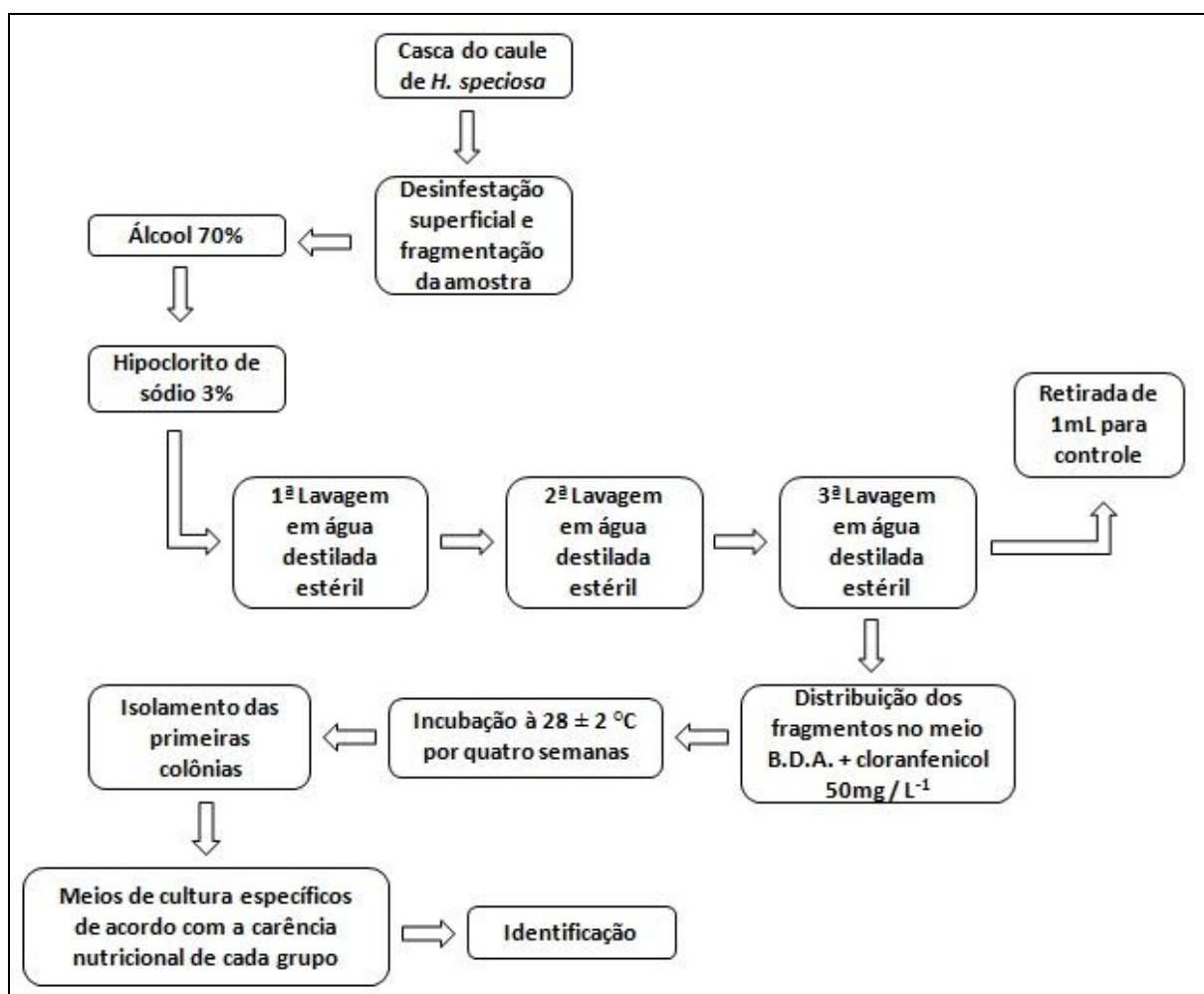
FHS: Fungo endofítico de *Hancornia speciosa*, P.C. Período chuvoso, P.S.: Período seco, Média dos halos de inibição: +:  $\geq 10$  mm; ++:  $\geq 20$  mm; +++:  $\geq 30$  mm; - : Sem atividade

**Tabela 03.** Concentração mínima inibitória e bactericida / fungicida dos extratos metanólicos brutos de fungos endofíticos de *H. speciosa*.

| Código | Fungo endofítico     | Meio  | Micro-organismos teste |       |                |       |                      |       |                      |       |                     |       |                  |       |                    |       |                  |       |
|--------|----------------------|-------|------------------------|-------|----------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|---------------------|-------|------------------|-------|--------------------|-------|------------------|-------|
|        |                      |       | <i>B. subtilis</i>     |       | <i>E. coli</i> |       | <i>K. pneumoniae</i> |       | <i>P. aeruginosa</i> |       | <i>P. mirabilis</i> |       | <i>S. aureus</i> |       | <i>C. albicans</i> |       | <i>M. furfur</i> |       |
|        |                      |       | CMI                    | CMB   | CMI            | CMB   | CMI                  | CMB   | CMI                  | CMB   | CMI                 | CMB   | CMI              | CMB   | CMI                | CMF   | CMI              | CMF   |
| FHS012 | <i>A. flavus</i>     | Arroz | 1250                   | 5000  | 1250           | >5000 | 1250                 | 5000  | 1250                 | 2500  | 312                 | 2500  | 1250             | >5000 | 2500               | >5000 | 1250             | >5000 |
| FHS018 | <i>A. flavus</i>     | Arroz | 1250                   | 5000  | 1250           | >5000 | 1250                 | >5000 | 1250                 | 2500  | 312                 | 2500  | 2500             | >5000 | 2500               | >5000 | 2500             | 5000  |
| FHS058 | <i>A. niger</i>      | Arroz | 156                    | 625   | 156            | 2500  | 312                  | 1250  | 156                  | 1250  | 78                  | 625   | 39               | 312   | 2500               | >5000 | 2500             | 5000  |
| FHS059 | <i>A. niger</i>      | Arroz | 156                    | 1250  | 625            | 5000  | 625                  | 1250  | 156                  | 2500  | 39                  | 625   | 156              | 625   | 1250               | >5000 | 2500             | >5000 |
| FHS061 | <i>A. niger</i>      | Arroz | 156                    | 1250  | 312            | 5000  | 625                  | 2500  | 156                  | 1250  | 19                  | 625   | 39               | 312   | 2500               | 5000  | 2500             | >5000 |
| FHS105 | <i>F. solani</i>     | Arroz | 1250                   | 5000  | 625            | >5000 | 78                   | 625   | 625                  | 5000  | 312                 | 5000  | 625              | 1250  | 312                | 1250  | 625              | 1250  |
| FHS106 | <i>F. solani</i>     | Arroz | 1250                   | >5000 | 625            | >5000 | 156                  | 625   | 625                  | 5000  | 312                 | 5000  | 625              | 5000  | 625                | 1250  | 625              | 2500  |
| FHS070 | <i>L. theobromae</i> | Arroz | 1250                   | 5000  | 1250           | >5000 | 1250                 | 2500  | 312                  | 5000  | 312                 | >5000 | 1250             | >5000 | 625                | 2500  | 1250             | 5000  |
| FHS074 | <i>L. theobromae</i> | Arroz | 1250                   | 5000  | 2500           | >5000 | 1250                 | 5000  | 625                  | 5000  | 312                 | >5000 | 1250             | 5000  | 625                | 5000  | 2500             | >5000 |
| FHS089 | <i>P. fellutanum</i> | Arroz | 1250                   | >5000 | 625            | 5000  | 1250                 | >5000 | 625                  | >5000 | 625                 | 5000  | 1250             | >5000 | 1250               | >5000 | 2500             | >5000 |
| FHS012 | <i>A. flavus</i>     | Milho | 1250                   | 5000  | 1250           | >5000 | 1250                 | >5000 | 1250                 | >5000 | 625                 | 5000  | 1250             | 5000  | 2500               | >5000 | 1250             | >5000 |
| FHS018 | <i>A. flavus</i>     | Milho | 1250                   | >5000 | 2500           | >5000 | 1250                 | >5000 | 1250                 | 5000  | 625                 | 5000  | 1250             | 5000  | 1250               | 5000  | 2500             | 5000  |
| FHS058 | <i>A. niger</i>      | Milho | 625                    | 2500  | 625            | 2500  | 625                  | 5000  | 312                  | 2500  | 156                 | 1250  | 156              | 625   | 2500               | >5000 | 2500             | 5000  |
| FHS059 | <i>A. niger</i>      | Milho | 625                    | 2500  | 312            | 2500  | 625                  | 2500  | 312                  | 5000  | 156                 | 1250  | 156              | 1250  | 2500               | 5000  | 1250             | 5000  |
| FHS061 | <i>A. niger</i>      | Milho | 312                    | 1250  | 312            | 5000  | 1250                 | 2500  | 156                  | 2500  | 78                  | 625   | 625              | 1250  | 1250               | >5000 | 1250             | 5000  |
| FHS105 | <i>F. solani</i>     | Milho | 625                    | 1250  | 1250           | >5000 | 156                  | 625   | 1250                 | >5000 | 625                 | >5000 | 312              | 1250  | 312                | 1250  | 2500             | >5000 |
| FHS106 | <i>F. solani</i>     | Milho | 625                    | 1250  | 2500           | >5000 | 156                  | 1250  | 1250                 | >5000 | 312                 | >5000 | 1250             | 2500  | 312                | 2500  | 625              | 1250  |
| FHS070 | <i>L. theobromae</i> | Milho | 2500                   | 5000  | 1250           | 5000  | 2500                 | 5000  | 625                  | >5000 | 312                 | 5000  | 1250             | 5000  | 1250               | >5000 | 1250             | 2500  |
| FHS074 | <i>L. theobromae</i> | Milho | 2500                   | 5000  | 1250           | 5000  | 2500                 | >5000 | 625                  | >5000 | 312                 | >5000 | 1250             | >5000 | 625                | 5000  | 1250             | 5000  |
| FHS089 | <i>P. fellutanum</i> | Milho | 1250                   | 5000  | 1250           | 5000  | 1250                 | 5000  | 1250                 | >5000 | 625                 | 5000  | 1250             | >5000 | 2500               | >5000 | 2500             | >5000 |

FHS: Fungo endofítico de *Hancornia speciosa*; CMI: Concentração mínima inibitória; CMB/CMF: Concentração mínima bactericida/fungicida; Concentração mínima inibitória e bactericida/fungicida em  $\mu\text{g/mL}^{-1}$

**Figura 01.** Fluxograma do processo de isolamento, purificação e identificação dos fungos endofíticos.



## **6. CONCLUSÕES**

---

## 6.1 Conclusões

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

A frequência de colonização de endofíticos na casca de *H. speciosa* é maior durante o período chuvoso. Em relação à diversidade, as espécies que ocorreram nos períodos seco e chuvoso não foram significativamente diferentes.

Os endofíticos de *H. speciosa* demonstraram potencial para bioprospecção, 39 isolados apresentaram atividade antimicrobiana frente a, no mínimo, um micro-organismo patogênico com as médias dos halos de inibição variando entre 11 e 39 mm de diâmetro.

Todos os micro-organismos patogênicos testados tiveram o seu crescimento inibido pelos extratos metanólicos brutos dos fungos endofíticos.

Os extratos metanólicos brutos dos endofíticos obtidos durante a fermentação do meio semi-sólido de arroz apresentaram maior atividade antimicrobiana.

Os extratos dos fungos endofíticos *A. niger* (FHS058), *A. niger* (FHS061) apresentaram CMI de 39  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e CMB de 312  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  contra *S. aureus*. O extrato de *F. solani* (FHS106) apresentou CMI de 78  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  e CMB 625  $\mu\text{g/mL}^{-1}$  para *K. pneumoniae*. Portanto, os fungos endofíticos acima constituem alvos atrativos para estudos no sentido de avaliar a utilização dos mesmos como agentes de controle destas importantes bactérias patogênicas.

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

Este estudo contribuiu na busca por novas alternativas terapêuticas, no tratamento de infecções, bem como, na importância da conservação dos recursos naturais, na valorização e no reconhecimento da legitimidade dos saberes populares e tradicionais com a experimentação e validação científica.



**ANEXO 01 - Resumo e pôster apresentado no Congresso Brasileiro de Micologia,  
Brasília, 2010.**

**Isolamento e identificação de fungos endofíticos da casca do caule de *Hancornia speciosa* Gomes**

Entre os micro-organismos endofíticos, os fungos têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras. *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida como mangabeira, é uma espécie frutífera da família Apocynaceae, típica da área de cerrados, dos tabuleiros costeiros e baixada litorânea. O presente trabalho teve como objetivo identificar, isolar e purificar fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa*. Para o isolamento dos fungos foram coletadas amostras sadias da casca do caule de *H. speciosa* em 05 (cinco) pontos diferentes e equidistantes nas áreas de estudo. O material foi superficialmente desinfetado e fragmentado. Os fragmentos foram distribuídos na superfície do meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido com cloranfenicol (50 mg L<sup>-1</sup>) contidos em placas de Petri, em triplicata, e cultivados a 28 ± 2°C por até 30 dias. A identificação das espécies foi efetuada através da observação macroscópica das colônias, seguida do exame das características microestruturais e análise comparativa, de acordo com a literatura especializada. Entre os fungos isolados *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., foram predominantes, seguidos por *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Lasioidiplodia* sp., *Humicola* sp. e *Vigaria* sp. Em pesquisas futuras, os resultados deste trabalho poderão contribuir para a descoberta de compostos bioativos provavelmente derivados de fungos desta planta.



## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA CASCA DO CAULE DE *Hancornia* *speciosa* Gomes

CHAGAS, M.B.O.<sup>1</sup>; SILVA, C.M.A.<sup>1</sup>; NATIVIDADE, C.M.C.L.<sup>1</sup>; CAVALCANTI, M.S.<sup>1</sup>;

LIMA, V.L.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

<sup>2</sup>Depto. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

### INTRODUÇÃO

Entre os microrganismos endofíticos, os fungos têm despertado o interesse da comunidade científica especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras. *Hancornia speciosa* Gomes, conhecida como mangabeira, é uma espécie frutífera da família Apocynaceae, típica dos tabuleiros costeiros e baixada litorânea.

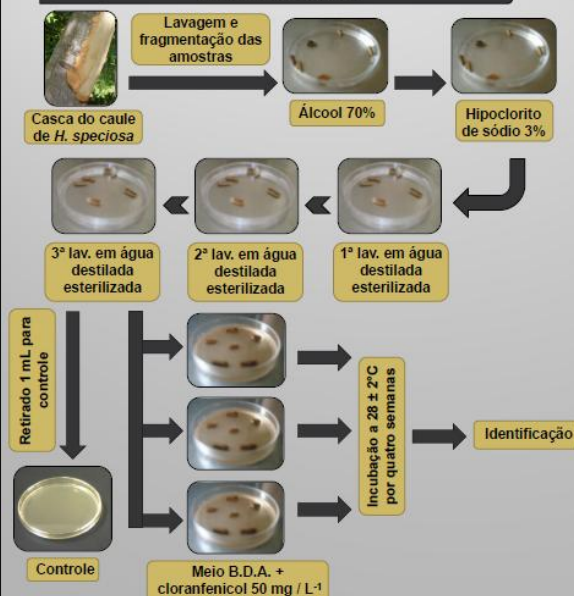


*Hancornia speciosa* Gomes

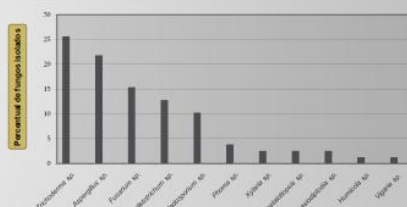
### OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo identificar, isolar e purificar fungos endofíticos da casca do caule de *H. speciosa*.

### METODOLOGIA



### RESULTADOS



Entre os fungos isolados *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. foram predominantes em todas as amostras, seguidos por *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Xylaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Humicola* sp. e *Vigaria* sp.

### CONCLUSÕES

• Novas coletas serão realizadas visando o aumento da micobiota para posteriores estudos estatísticos.

• Em estudos futuros, os resultados deste trabalho poderão contribuir para a descoberta de compostos bioativos provavelmente derivados de fungos desta planta.

### BIBLIOGRAFIA

AGUIAR FILHO, S.P.; BOSCO, J. A mangabeira (*Hancornia speciosa*) domesticação e técnicas de cultivo. João Pessoa: EMEPA-PB, 1998. 26 p.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, S.O.A.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, P.T. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

AZEVEDO, J.L.; SERAFINE, L. A.; BARROS, N.M. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINE, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, Cap.08. 2002. p. 233-263.

SILVA JUNIOR, J. F.; LEDO, A. S. (Org.). A cultura da Mangaba. 1. ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. v. 1. 253 p.



Apoio financeiro:

**ANEXO 02 - Resumo e pôster apresentado na XXVI Reunião Anual da FeSBE,  
Rio de Janeiro, 2011.**

**Antibacterial activity of endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from  
*Hancornia speciosa* Gomes.**

**Aim:** *Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is widely used in folk medicine as antibacterial. It is known, however, that some microorganisms inhabit the interior of plants and among these, fungi, have attracted great interest because of their biotechnological potential in production of secondary metabolites of economic interest, including those related to host plants. This study aims to analyze the antimicrobial potential of metabolites synthesized by the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from the stem bark of *H. speciosa* as possible antibacterial agent control.

**Methods and Results:** Samples were collected from healthy stem bark of *H. speciosa* in the district of Curcurana, Jaboatão dos Guararapes, coast of Pernambuco state in five different and equally spaced over the study area. Next, the material was superficially disinfected and fragmented disks 5 mm in diameter. The fragments were distributed on the surface of the medium potato dextrose agar (PDA) supplemented with chloramphenicol (50 mg L<sup>-1</sup>) contained in Petri dishes, in triplicate, and cultured at 28 ± 2 °C for 30 days. After development of the colonies on the edges of the discs, they were transferred to tubes containing PDA medium. The species identification was performed by macroscopic observation of the colonies, followed by the examination of microstructural characteristics and comparative analysis, according to specialized literature. The fungi isolated and identified as *L. theobromae* were grown in the form of carpet in Petri dishes for seven days with the agar - Sabouraud (SAB) medium. After this period, were fragmented in blocks of 5 mm in diameter and transferred to dishes in triplicate containing agar - Mueller-Hinton (MHA) medium previously inoculated with the bacteria *Staphylococcus aureus* - UFPEDA - 02; *Bacillus subtilis* - UFPEDA - 86; *Escherichia coli* - UFPEDA - 224; *Klebsiella pneumoniae* - UFPEDA - 396 and *Pseudomonas aeruginosa* - UFPEDA - 416, obtained from the Culture Collection UFPEDA, Department of Antibiotics, UFPE. After 24 hours were the readings of the inhibition halos, and is considered positive when the halos were more than 10 mm in diameter. The species *L. theobromae* was the most frequent (35.71%) among the 42 fungal isolates. Only two of the isolates tested showed activity against the bacteria *P. aeruginosa* with an average of inhibition halo of 12 mm in diameter. However, against other bacteria analyzed all isolates tested showed considerable activity, varying the average of inhibition halos of 17.5 mm to 33 mm in diameter.

**Conclusion:** The endophytic fungus *L. theobromae* isolated from the stem bark of *H. speciosa* showed antimicrobial activity against pathogenic bacteria. It is possible that the plant's medicinal properties are a consequence of their endophytic ability to produce biologically active secondary metabolites. In future research, the results of this study may contribute to the investigation of bioactive compounds, probably derived from the complex interaction between endophytes and host plant.

**Sources of research support:** Program to Support Restructuring Plan and Expansion of Federal Universities - REUNI



## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGUS *Lasiodiplodia theobromae* ISOLATED FROM *Hancornia speciosa* Gomes.

CHAGAS, M.B.O.<sup>1</sup>; SANTOS, I.P.<sup>1</sup>; SILVA, A.S.<sup>1</sup>; CAVALCANTI, M.S.<sup>1</sup>; LIMA, V.L.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

<sup>2</sup>Depto. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

### INTRODUCTION

*Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is widely used in folk medicine as antibacterial. It is known, however, that some microorganisms



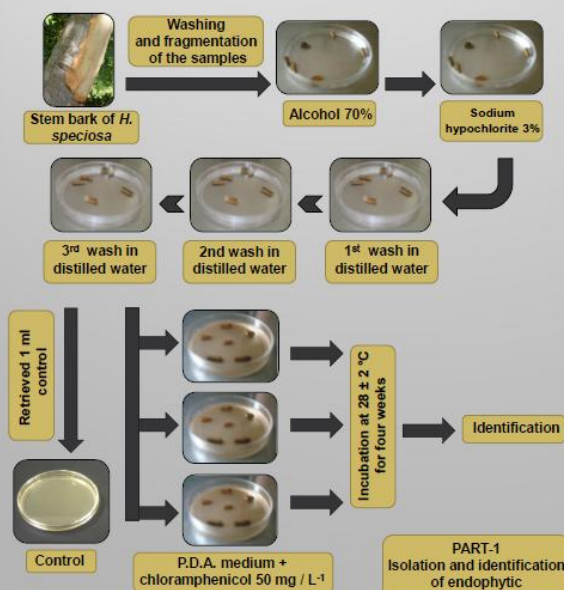
*Hancornia speciosa* Gomes

inhabit the interior of plants and among these, fungi, have attracted great interest because of their biotechnological potential in production of secondary metabolites of economic interest, including those related to host plants.

### AIM

This study aims to analyze the antimicrobial potential of metabolites synthesized by the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from the stem bark of *H. speciosa* as possible antibacterial agent control.

### METHODOLOGY



### PART- 2 Primary test



*L. theobromae*

Fragments 5 mm diameter



M.H.A. medium previously inoculated with the test bacteria



Reading of halos after 24 hours.

### RESULTS

The species *L. theobromae* was the most frequent (35.71%) among the 42 fungal isolates. All isolates tested showed considerable activity, varying the average of inhibition halos of 17.5 mm to 33 mm in diameter.

#### PRIMARY TEST

| TEST BACTERIA      | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| AVERAGE HALOS (mm) | 26.5                     | 17.5                    | 28.5                         | 12                            | 33                           |

It is considered the inhibition halos larger than 10 mm in diameter.

### CONCLUSIONS

- The endophytic fungus *L. theobromae* isolated from the stem bark of *H. speciosa* showed antimicrobial activity against pathogenic bacteria.
- It is possible that the plant's medicinal properties are a consequence of their endophytic ability to produce biologically active secondary metabolites.
- In future research, the results of this study may contribute to the investigation of bioactive compounds, probably derived from the complex interaction between endophytes and host plant.

**ANEXO 03 - Resumo e pôster apresentado no I Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Recife, 2011.**

**Antimicrobial activity of endophytic fungus *Trichoderma harzianum* isolated from *Hancornia speciosa* Gomes.**

**Background:** *Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is widely used in folk medicine as antimicrobial. It is known, however, that some microorganisms inhabit the interior of plants and among these, fungi, have attracted great interest because of their biotechnological potential. **Objectives:** Analyze the antimicrobial potential of endophytic fungus *Trichoderma harzianum* isolated from the stem bark of *H. speciosa*. **Methodology:** Samples were collected from stem bark of *H. speciosa*. Next, the material was superficially disinfected and fragmented. The fragments were distributed in the potato - dextrose - agar (PDA) medium contained in Petri dishes, in triplicate, and cultured at  $28 \pm 2$  °C for 30 days. The fungi isolated and identified as *T. harzianum* were grown in the form of carpet in Petri dishes for seven days with the agar - Sabouraud (SAB) medium. After this period, were fragmented in blocks of 5 mm in diameter and transferred to dishes in triplicate containing agar - Mueller-Hinton (MHA) medium previously inoculated with the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and the fungi *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *Malassezia furfur* in SAB medium. After 48 hours were taken the readings of the inhibition halos, and is considered positive when the halos were more than 10 mm in diameter. **Results:** All isolates tested showed considerable activity against test bacteria and fungi, varying the average of inhibition halos of 12.5 mm to 33 mm in diameter. **Conclusions:** The endophytic fungus *T. harzianum* isolated from the stem bark of *H. speciosa* showed antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. In future research, the results of this study may contribute to the investigation of bioactive compounds, probably derived from the complex interaction between endophytes and host plant.

**Keywords:** Antimicrobial activity; *H.speciosa*; *T.harzianum*.



## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGUS *Trichoderma harzianum* ISOLATED FROM *Hancornia speciosa* Gomes.

Chagas, M.B.O.<sup>1</sup>; Santos, I.P.<sup>1</sup>; Silva, A. P. S.<sup>1</sup>; Silva, C.M.A.<sup>1</sup>; Albuquerque, R.M.A.<sup>1</sup>;  
Ribeiro, I.A.T.A.<sup>1</sup>; Cavalcanti, M.S.<sup>1</sup>; Lima, V.L.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

<sup>2</sup>Depto. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

### INTRODUCTION

*Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is widely used in folk medicine as antibacterial. It is known, however, that some microorganisms inhabit the interior of plants and among these, fungi, have attracted great interest because of their biotechnological potential in production of secondary metabolites of economic interest, including those related to host plants.

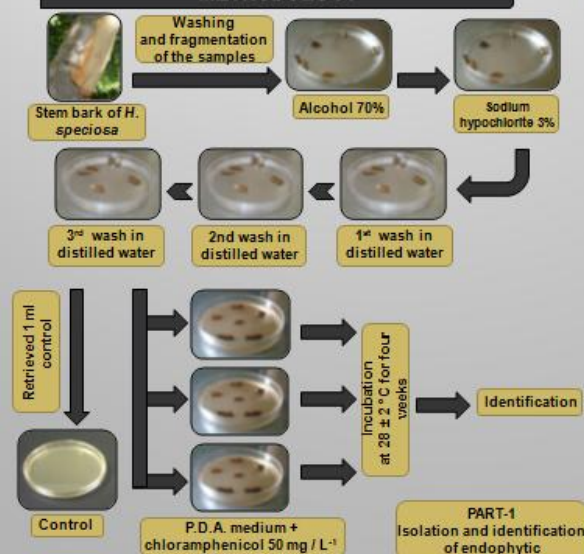


*Hancornia speciosa* Gomes

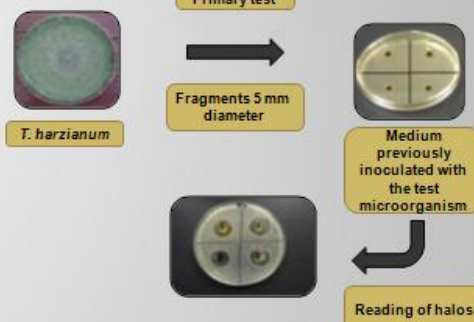
### AIM

This study aims to analyze the antimicrobial potential of metabolites synthesized by the endophytic fungus *Trichoderma harzianum* isolated from the stem bark of *H. speciosa* as possible antibacterial agent control.

### METHODOLOGY



### PART- 2 Primary test



### RESULTS

#### PRIMARY TEST

| TEST MICROORGANISM | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. tropicalis</i> | <i>C. glabrata</i> | <i>M. fortis</i> |
|--------------------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------------|--------------------|------------------|
| AVERAGE HALOS (mm) | 20.5             | 17.5           | 20.5                 | 12.5                 | 30               | 15                 | 10.5                 | 12.5               | 15.5             |

It is considered the inhibition halos larger than 10 mm in diameter.

### CONCLUSIONS

• The endophytic fungus *T. harzianum* isolated from the stem bark of *H. speciosa* showed antimicrobial activity against pathogenic bacteria.

• It is possible that the plant's medicinal properties are a consequence of their endophytic ability to produce biologically active secondary metabolites.

• In future research, the results of this study may contribute to the investigation of bioactive compounds, probably derived from the complex interaction between endophytes and host plant.



Financial support:

**ANEXO 04 - Resumo e pôster apresentado no I Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Recife, 2011.**

**Antimicrobial activity of extracts of stem bark from *Hancornia speciosa* against the most common microorganisms in nosocomial infections.**

**Background:** The incidence of nosocomial infections is a concern because it is related, in most cases, the emergence of resistant microorganisms, especially in public health. In this context it is important to search for new therapies. *Hancornia speciosa* Gomes, known as mangabeira, is widely used in folk medicine as antimicrobial. **Objectives:** To evaluate the antimicrobial activity of extracts of stem bark of *H. speciosa*. **Methodology:** The extraction was performed by soaking for 24 hours at room temperature under constant stirring, using 70% ethanol (v/v) in the proportion of 1:100 (w/v) for the ethanolic extract and methanol in the same proportion to the extract methanolic. After extraction period, the solvent was eliminated by rotaevaporation. The dry extracts were re-suspended with dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 100 µg/mL. Were then added 30 µL of the extracts on disks (5 mm in diameter) sterile paper and transferred to Petri dishes, in triplicate, containing agar-Müller-Hinton (MHA) medium previously inoculated with the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and a yeast *Candida albicans* and *C. tropicalis* in Sabouraud-agar (SAB) medium. After 48 hours were taken the readings of the inhibition halos, and is considered positive when the halos were more than 10 mm in diameter. **Results:** The ethanolic extract did not show significant activity against yeasts, but in relation to other microorganisms showed activity, varying the average inhibition halos of 17.5 mm to 28 mm in diameter. The methanolic extract showed considerable activity against all test microorganisms varying the average of inhibition halos of 16 mm to 31 mm in diameter. **Conclusions:** The extract methanolic showed more active against the test microorganism when compared to extract ethanolic, to be promising for future studies in order to evaluate its use in infection control.

Keywords: *H.speciosa*; nosocomial infections



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DA CASCA DO CAULE DE *Hancornia speciosa* GOMES FRENTE AOS MICRORGANISMOS MAIS FREQUENTES NAS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

Chagas, M.B.O.<sup>1</sup>; Santos, I.P.<sup>1</sup>; Silva, A. P. S.<sup>1</sup>; Silva, C.M.A.<sup>1</sup>; Albuquerque, R.M.A.<sup>1</sup>; Ribeiro, I.A.T.A.<sup>1</sup>; Cavalcanti, M.S.<sup>1</sup>; Lima, V.L.M.<sup>2</sup>

1. Departamento de Micologia - UFPE  
2. Departamento de Bioquímica - UFPE

### INTRODUÇÃO

A incidência de infecções nosocomiais é um fator preocupante, pois está relacionada, na maioria das vezes, ao surgimento de microrganismos resistentes, principalmente na rede pública de saúde. *Hancornia speciosa* Gomes, uma frutífera conhecida popularmente como mangabeira, é largamente utilizada na medicina tradicional em nossa região como antimicrobiano.



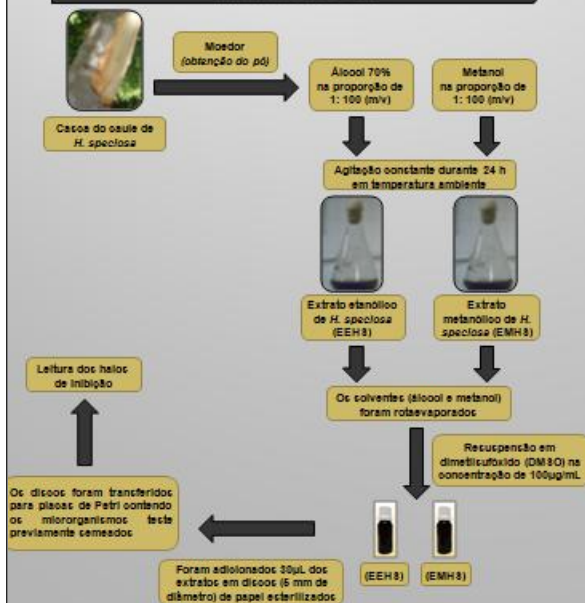
*Hancornia speciosa* Gomes

*Hancornia speciosa* Gomes, uma frutífera conhecida popularmente como mangabeira, é largamente utilizada na medicina tradicional em nossa região como antimicrobiano.

### OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da casca do caule de *H. speciosa*.

### METODOLOGIA



### RESULTADOS

ENSAIO ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DA CASCA DE *H. speciosa*

| EXTRATO | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. tropicalis</i> |
|---------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| EEH8    | 17,3           | 28                   | —                    | 22,6             | —                  | —                    |
| EMH8    | 28             | 31                   | 15,3                 | 18,3             | 18                 | 18                   |

Média do diâmetro dos halos em milímetros

### CONCLUSÃO

- O extrato etanólico não apresentou atividade significativa contra *P. aeruginosa* e leveduras;
- Em relação aos demais microrganismos, o extrato etanólico apresentou atividade considerável variando a média dos halos de inibição entre 17,3 mm e 28 mm de diâmetro.
- O extrato metanólico apresentou atividade considerável contra todos os microrganismos teste variando a média dos halos entre 15,3 mm a 31 mm de diâmetro.
- O extrato metanólico mostrou-se mais ativo frente aos microrganismos teste quando comparado ao etanólico.
- O próximo passo deste estudo é a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) para verificar com mais precisão o potencial antimicrobiano deste promissor extrato vegetal.