

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL/MG**

BÁRBARA HELENA MUNIZ PRADO E FELIPHE

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE
COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS À *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae).**

**Alfenas - MG
2015**

BÁRBARA HELENA MUNIZ PRADO E FELIPHE

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDÓFITICOS PRODUTORES DE
COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS À *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae).**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

**Alfenas – MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Felipe, Bárbara Helena Muniz Prado e.

Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados à *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). / .
Bárbara Helena Muniz Prado e Felipe -- Alfenas/MG, 2015.
80 f.

Orientador: Masaharu Ikegaki.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.
Bibliografia.

1. Fungos. 2. Testes Biológicos. 3. Ação Antimicrobiana.
I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD-615.329

BÁRBARA HELENA MUNIZ PRADO E FELIPHE

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE
COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS À *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae).

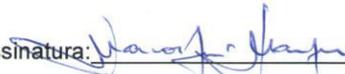
A Banca examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 17/07/2015

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcos José Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Prof. Dr. Bruno Bueno Silva
Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: 

Dedico este trabalho aos meus pais,
Jocely e Paulo,
à minha irmã, Raíssa e ao meu namorado
Luiz Pedro,
pelo apoio em todos os momentos e
decisões, principalmente nos mais
difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela proteção em todos os momentos, por guiarem meus caminhos, pela força e determinação concedidas para que eu pudesse concluir o mestrado.

Ao professor Masaharu Ikegaki pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Jocely e Paulo, que com amor e carinho incondicionais me apoiaram durante toda a vida sem nunca duvidar da minha capacidade, sempre dispostos para uma palavra de conforto e incentivo.

A Raíssa, minha irmã, que mesmo passando a maior parte desse tempo a muitos quilômetros de distância sempre esteve presente e torcendo por mim.

Ao meu namorado Luiz Pedro, por sua compreensão e paciência durante todo este percurso.

A Andrea, minha grande amiga pelos muitos anos de amizade e companheirismo. Pelo apoio nos momentos de desespero e pelos (vários) momentos divertidos.

A minha família, avos (*in memoriam*), tios, primos e amigos pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos e colegas de laboratório, pela ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao professor Marcos José que possibilitou a realização dos experimentos antiparasitários e a aluna Patrícia Espuri que teve imensa paciência em me auxiliar em todas as dúvidas.

A professora Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz pelos ensaios antiproliferativos realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)- Campinas.

A Universidade Federal de Alfenas por permitir a realização deste trabalho.

Ao órgão financiador FAPEMIG pela concessão da bolsa e pelo apoio na realização desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

(Cora Coralina)

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”

(Marcelo Camelo)

RESUMO

Os fungos endofíticos têm despertado o interesse da comunidade científica especialmente pela sua diversidade e seu potencial na produção de metabólitos secundários. *Eugenia pyriformis* (Cambess), conhecida como Uvaia, é uma espécie frutífera da família Myrtaceae, que demonstra potencial para a produção de compostos bioativos. Este trabalho teve como objetivo isolar a comunidade fúngica endofítica associada a *E. pyriformis* e avaliar o potencial em produzir metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana, antiproliferativa e antiparasitária. Foram isolados aproximadamente 200 fungos no período do Outono, a partir de folhas adultas. Metade dos isolados foram submetidos à fermentação e extração com acetato de etila. Os extratos foram testados em um ensaio de triagem antimicrobiano. Para o teste de difusão em agar os micro-organismos utilizados foram o *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a *Escherichia coli* ATCC 25922 e a *Candida albicans* ATCC 10231. No total, 54 dos 100 fungos endofíticos testados apresentaram atividade antimicrobiana frente a, no mínimo, um micro-organismo. O *S. aureus* foi inibido por 34 extratos, a *C. albicans* teve seu crescimento inibido por 12 extratos, já para *E. coli* 8 extratos demonstraram atividade. Baseado nos resultados da triagem antimicrobiana, foram selecionados os extratos fúngicos F6F3, F12F2 e F15F1, para os ensaios de CIM e CBM frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 22228, *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL, além dos ensaios antiproliferativo e antiparasitário. Os extratos obtiveram bons resultados no teste de CIM e os valores variaram entre 250 e 1000 µg/mL. Os extratos demonstraram capacidade bactericida na concentração de 1000 µg/mL. Os resultados obtidos no ensaio antiproliferativo demonstraram que os três extratos foram inativos frente as linhagem celulares tumorais, sendo que os extratos F6F3 e F15F1 também não foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas, e o extrato F12F2 foi fracamente ativo, no ensaio leishmanicida, contrariando as expectativas. Contudo, os resultados encontrados demonstram o grande potencial antimicrobiano dos fungos endofíticos isolados de *E. pyriformis* e destacam a importância da continuidade dos estudos dos fungos endofíticos, já que destes poderão ser identificados e isolados compostos bioativos e novas substâncias, provavelmente derivados da complexa interação endofítico/hospedeiro, com atividades de interesse farmacológico.

Palavras-chave: Fungos Endofíticos. *Eugenia pyriformis*. Ensaio Biológico. Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

The endophytic fungi have aroused the scientific community interest especially by its diversity and its potential in the production of secondary metabolites. *Eugenia pyriformis* (Cambess), known as uvaia, is a fruit species of Myrtaceae's family, demonstrating the potential for the production of bioactive compounds. This dissertation aimed to isolate the endophytic fungal community associated with *E. pyriformis* and assess the potential to produce bioactive metabolites with antimicrobial activity, antiproliferative and antiparasitic. 200 fungi were isolated in the autumn period, from mature leaves. Half of the isolates were subjected to fermentation and extraction with ethyl acetate. The extracts were tested in an antimicrobial screening assay. For the agar diffusion's test the microorganisms were tested: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231. In total, 54 of 100 endophytic fungi tested showed antimicrobial activity against at least one microorganism. The *S. aureus* was inhibited by 34 extracts, the *C. albicans* had their growth inhibited by 12 extracts, and 8 extracts showed activity for *E.coli*. Based on the antimicrobial test results, the following fungal extracts were selected F6F3, F12F2 and F15F1 to the MIC assays and MBC against of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 22228, *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL, besides the anti-proliferative and antiparasitic assays. The extracts showed good results in the MIC test and the values varied between 250 and 1000 µg/mL. The extracts showed bactericidal capacity at 1000 µg/mL. The results of the antiproliferative assay showed that the three extracts were inactive front the tumor cell lineage, in addition the F6F3 and F15F1 extracts also were not able to inhibit the growth of promastigotes, and the F12F2 extract was weakly active in leishmanicidal test, contrary to expectations. However, the results demonstrate the great antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from *E. pyriformis*, and highlight the importance to further study of the endophytic fungi, since from them some compounds and new substances may be isolated and identified from it, probably derived from the complex endophytic/host interaction, with pharmacological interest activities.

Keywords: Endophytic fungi. *Eugenia pyriformis*. Biological Assays. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fórmula do Paclitaxel (Taxol).....	23
Figura 2-	Árvore de <i>Eugenia pyriformis</i> , popularmente conhecida como Uvaia.	28
Figura 3-	Fluxograma de todo o processo de obtenção dos extratos.	33
Figura 4-	Formação de halos de inibição do crescimento frente a <i>C. albicans</i>	44
Figura 5-	Atividade da Doxorrubicina no ensaio Antiproliferativo.	51
Figura 6-	Atividade do extrato F6F3 no ensaio Antiproliferativo.	52
Figura 7-	Atividade do extrato F12F2 no ensaio Antiproliferativo.	52
Figura 8-	Atividade do extrato F15F1 no ensaio Antiproliferativo.	53
Figura 9-	Atividade do extrato do meio no ensaio Antiproliferativo.	53
Figura 10-	Atividade do extrato no teste Leishmanicida.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do Meio de Fermentação, Caldo Czapeck.	31
Tabela 2- Micro-organismos utilizados nos teste de microdiluição em caldo.....	34
Tabela 3- Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa	36
Tabela 4- Halos de Inibição dos fungos com melhores resultados no teste de triagem.	45
Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos de <i>E. pyriformis</i>	50
Tabela 6- Inibição parcial do crescimento celular (GI_{50}), expressos em $\mu\text{g/mL}$, de linhagens tumorais frente aos extratos e ao padrão.....	55
Tabela 7- Classificação dos extratos segundo a Média do $\log GI_{50}$	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	14
2.1.1	Atividade Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos.....	19
2.1.2	Atividade Antiproliferativa dos Fungos Endofíticos.....	21
2.1.3	Atividade Antiparasitária dos Fungos Endofíticos	24
2.2	A FAMÍLIA Myrtaceae E A ESPÉCIE <i>Eugenia pyriformis</i>	25
3	MATERIAIS E METODOS	29
3.1	MATERIAL VEGETAL E LOCAL DAS COLETAS.....	29
3.2	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE PLANTAS DA ESPÉCIE <i>Eugenia pyriformis</i>	29
3.3	CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS	30
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS	30
3.5	PRÉ-SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR HALO DE INIBIÇÃO	33
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
3.6.1	Micro-organismos utilizados e preparo dos inóculos	33
3.6.2	Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)	34
3.6.3	Avaliação da concentração bactericida e fungicida mínima (CBM).....	35
3.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	36
3.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITARIA.....	38
3.9	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1	ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	40
4.1.1	Experimento Piloto	40
4.2	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À <i>Eugenia</i> <i>pyriformis</i>	41
4.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	43
4.3.1	Pré-seleção por halo de inibição	43

4.3.2 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida e fungicida mínima (CBM)	46
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	51
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	57
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE	78

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade está diretamente relacionada à diversidade química, uma vez que os organismos estão sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais que podem originar novos metabólitos secundários de grande importância para a indústria farmacêutica (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, foram registradas 33.885 espécies de plantas no Brasil em um levantamento, sendo que 18.357 são endêmicas, o que demonstra uma alta taxa de endemismo de 54,2% (FORZZA, 2010). Uma parte significativa das espécies de plantas do país é encontrada na Mata Atlântica, a qual contém 2% do total de espécies de plantas endêmicas e 20% do total de plantas do planeta. Esse bioma é considerado um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade, sendo reconhecido por sua excepcional riqueza e endemismo de espécies (MYERS et al., 2000; SILVA; CASTELETTI, 2005). Atualmente devido à intensa intervenção antrópica apenas cerca de 8% de sua área original esta conservada (MORELLATO; HADDAD, 2000). Consistindo em sua maior parte de pequenos fragmentos florestais secundários isolados, colocando em risco a sua grande biodiversidade (HIROTA, 2005).

Dentre as plantas da Mata Atlântica encontramos *Eugenia* L. um dos maiores Gêneros da família Myrtaceae, com uma ampla distribuição nas Américas Central e do Sul (MERWE et al., 2004). Dentro deste gênero encontra-se a *Eugenia pyriformis* (Cambess) popularmente denominada uvaia, uvaieira, uvalha, uvalheira, que foi o alvo do presente trabalho. Segundo Chavasco et al. (2014) a folha e a semente apresentam potencial antimicrobiano.

De todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos, aproximadamente um quarto foram obtidos de fungos (KONGSAEREE et al., 2003). Segundo Hawksworth (2001), somente 10% foram descritos em literatura e apenas 1% verificado se produz algum tipo de metabólito secundário.

Dentro do amplo leque de fontes para a busca de compostos de interesse podemos afirmar que fontes pouco exploradas como os fungos, mais especificamente os endofíticos, devem ser fortemente consideradas. Pois existe grande possibilidade de encontrarmos associadas a esses micro-organismos uma substância química promissora.

Micro-organismos endofíticos são aqueles cultiváveis ou não, que penetram à planta e vivem em seu interior, interagindo com outras espécies de micro-organismos, sem causar algum dano ou prejuízo ao seu hospedeiro, ou mesmo, às estruturas externas visíveis (MAKI, 2006).

Há evidências da influência de micro-organismos endofíticos em diversas características expressas pela planta hospedeira devido à produção ou indução de metabólitos primários e secundários. Estes podem conferir vantagens à mesma, dentre as quais podemos citar a produção de hormônios de crescimento e antibióticos, a proteção contra herbivoria pela produção de alcalóides, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos (MAKI, 2006).

Dentre as substâncias bioativas produzidas pelos micro-organismos endofíticos, os compostos antimicrobianos, antiparasitários e antiproliferativos apresentam grande relevância e interesse científico. Há vários relatos na literatura correlacionando o conhecimento fitoterápico e o isolamento de endofíticos, possibilitando a descoberta de novas substâncias para a produção de insumos farmacêuticos.

Dentro desse contexto este trabalho teve como objetivo isolar e selecionar fungos endofíticos a partir de plantas da espécie *Eugenia pyriformis*, os quais foram testados quanto a sua atividade antimicrobiana, antiproliferativa e antiparasitária.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

A perda da biodiversidade dos biomas pode afetar a vida e a subsistência da população humana, além de contribuir para a ruptura e esgotamento de processos evolutivos. É preciso considerar que os recursos naturais oferecidos, uma vez extintos, não estarão disponíveis para as gerações futuras. Assim o estudo dos organismos em interação com o meio é fundamental para que se possa compreender a biologia dos ecossistemas.

Conseqüentemente o estudo de novos e estruturalmente diversificados micro-organismos endofíticos com um grande potencial de conter compostos bioativos ainda desconhecidos e de um novo campo de estudo, no que se referem às aplicações desses metabólitos faz-se necessário.

Além disto, a pesquisa de novas substâncias com potencial bioativo permite a ampliação das ferramentas para o controle dos micro-organismos, que vêm adquirindo resistência aos fármacos já existentes.

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endofítico é derivado do grego (éndon = dentro + phytón = planta). São encontradas diferentes definições de endofítico na literatura (AZEVEDO, 2010). Mas a definida por Bacon e Write (2000) amplamente aceita e utilizada, é que endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos no hospedeiro. Podendo habitando de forma sistêmica o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos o interior da célula (AZEVEDO et al., 2003). Diferentes grupos de organismos tais como fungos, bactérias, actinomicetes e micoplasmas são relatados como endofíticos de plantas (BANDARA et al., 2006). Sendo os fungos filamentosos os mais comumente isolados (GUNATILAKA, 2006).

A primeira descrição dos fungos endofíticos foi feita em 1866, por Bary (PEIXOTO NETO et al., 2002). Até a década de 70 acreditava-se que a interação endofítico - planta era assintomática, ou seja, não trazia benefício ou dano. Porém,

após anos de pesquisas, alterações no conceito destes micro-organismos foram relatadas, sedimentando-se o conhecimento sobre a relação benéfica para ambos (AZEVEDO, 2010; WANG; DAI, 2011).

A classificação dos fungos endofíticos pode variar de acordo com cada autor. Segundo Schulz e Boyle (2005) os fungos endofíticos podem ser divididos, em dois grupos distintos, o grupo dos Balansiaceos e os Não- Balansiaceos. O primeiro grupo consiste em colonizadores de gramíneas, que compreende os gêneros de ascomicetos *Epichloe* e *Balansia* e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*, são encontrados em todos os órgãos das gramíneas, crescendo de forma sistêmica e intercelular (BACON; WHITE, 2000). Além disso, estruturas especializadas para absorção de nutrientes são encontradas em seus micélios e muitos destes fungos produzem uma variedade de metabólitos secundários (SCHULZ; BOYLE, 2005).

O segundo grupo dos Não - Balansiaceos representa um grupo mais diverso. As espécies comumente relacionadas ao grupo são em sua maioria, pertencente a famílias do filo Ascomycota, considerado o maior filo dos fungos, com aproximadamente metade das espécies de fungos conhecidas (GUARRO et al., 1999). A colonização deste grupo pode ser inter ou intracelular, sistêmica ou localizada (SCHULZ; BOYLE, 2005). Assim como os Balansiaceos, os endofíticos Não - Balansiaceos são encontrados em todos os órgãos e em quase todas as plantas terrestres (STONE et al., 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005).

A presença da comunidade fúngica endofítica na planta hospedeira geralmente varia de acordo com a espécie vegetal (MORICCA et al., 2012), a localização geográfica e as condições climáticas, podendo ser encontrados em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (HOFFMAN; ARNOLD, 2008; JALGAONWALAN, et al., 2011; GIAUQUE; HAWKES, 2013). Podem também diferir entre os vários tecidos e órgãos de uma mesma planta (MORICCA et al., 2012). Além de variar com a idade do vegetal, altitude, umidade, precipitação anual, entre outros fatores, consistindo em um grupo bastante diversificado (OKI et al., 2008; NASCIMENTO, 2009; VIEIRA et al., 2011).

A infecção da espécie hospedeira pelos fungos endofíticos pode acontecer horizontalmente ou verticalmente. O modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endofítico-hospedeiro. Na forma horizontal a

infecção ocorre por lesões naturais, como estômatos e hidatódios ou crescimento das raízes, e lesões artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas e ação de insetos ou outros animais. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endofítico é difundido sistematicamente entre gerações da planta, podendo instalar-se durante toda a vida da hospedeira (PETRINI, 1992).

Uma vez no hospedeiro os fungos endofíticos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminarem pelo sistema vascular, caracterizando a colonização como intra e intercelular limitada ou sistêmica (BACON; WHITE, 2000; ZINNIEL et al., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; MARINHO et al., 2005; JOHRI, 2006). Geralmente, permanecem em um estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado, até que as condições ambientais lhe sejam favoráveis (AZEVEDO, 1998; ALY, et al, 2011).

A relação que se estabelece entre endofítico-hospedeiro é complexa e depende de vários fatores, como características do vegetal, do fungo, do ambiente, entre outras (OWEN; HUNDLEY, 2004). Diversos autores discorrem sobre a principal hipótese para esta relação a da simbiose mutualística (FAETH, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; KOGEL et al., 2006). A hipótese de simbiose mutualística é a mais considerada, já que há na relação um benefício para o fungo com o ganho nutricional e proteção contra estresse abiótico, enquanto a planta beneficia-se pela proteção contra a herbívora, devido à produção de alcaloides tóxicos por parte do fungo. (WHITE et al., 2000; SAIKKONEN et al., 2004). A proteção simbiote dos micro-organismos é determinante para o sucesso ecológico da planta (SELOSSE et al., 2004).

Dessa relação mutualista, caracterizada pelo recebimento de nutrientes e proteção, o efeito benéfico da associação planta-endofítico é muito significativo. Os fungos podem desempenhar funções relevantes para sanidade vegetal, protegendo as plantas contra pragas e patógenos, aumentando o crescimento, enraizamento, resistência a estresses por fatores bióticos como os insetos, herbívoros, nematoides parasitas e micro-organismos fitopatogênicos ou fatores abióticos tais como o pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade, entre outros (AZEVEDO, 2010; OWNLEY et al., 2010; ARAÚJO et al., 2010; KHARWAR et al., 2011). Além disso, a síntese de compostos químicos como enzimas, alcaloides, hormônios e antibióticos pode ser induzida por condições de estresse à planta hospedeira, que

interferem na interação da planta com o meio ambiente (NASCIMENTO, 2006). Devido a todos esses benefícios os fungos endofíticos podem ser utilizados no controle biológico de pragas, levando-os a se tornarem uma importante ferramenta para a agricultura moderna (PEIXOTO NETO et al., 2002; JABER; VIDAL, 2009).

Contudo esse cenário de relações simbiotes pode se tornar mais complexo, pois alguns fungos endofíticos produzem substâncias químicas caracterizadas originalmente da planta hospedeira (ALY et al., 2013; KUSARI et al., 2013; GANDHI et al., 2015). Acredita-se que essa capacidade pode estar relacionada a uma “recombinação genética” do endofítico com a planta, que acontece durante o processo de evolução (TAN; ZOU, 2001). Em algum momento durante essa co-evolução, pode ocorrer uma transferência horizontal de genes, o que permitiu que o endofítico receptor executasse as mesmas reações biossintéticas para a produção de metabolitos da planta doadora (ALY et al., 2010). E em alguns casos as relações simbióticas tornam-se extremamente complexas, como por exemplo, o do fungo patogênico de plantas, *Rhizopus*, ao qual foi atribuído a síntese do composto Rizoxina, e posteriormente descobriu-se que a síntese é feita pela bactéria simbiótica *Burkholderia* encontrada dentro do fungo (PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2005).

A habilidade do endofítico em produzir o mesmo metabólito bioativo que sua planta hospedeira pode reduzir a coleta de plantas raras, de crescimento reduzido e ameaçadas de extinção, aumentando assim, a preservação, da biodiversidade (STIERLE et al., 1993). Além da possibilidade de empregar os fungos endofíticos para a produção abundante de novos metabólitos secundários biologicamente ativos. Para isso a utilização de condições controladas de fermentação, visando à otimização (alteração dos parâmetros do processo como a composição do meio de cultivo, aeração, pO₂, pCO₂, pH, temperatura, forma de agitação, amostragem e momento de coleta) da produção de compostos pelos endofíticos é fundamental (KUSARI, 2012).

Calcula-se que existam, aproximadamente, 400.000 espécies de plantas e cada uma delas pode abrigar pelo menos entre três a seis espécies de fungos endofíticos. Com isso, estima-se que a diversidade de fungos endofíticos seja enorme, cerca de 1,5 milhões de espécies a nível mundial (STROBEL et al., 2004). Deste total, apenas cerca de 10% foram descobertos e estudados, e apenas 1% foram alvo de estudo quanto à sua capacidade de produção de metabolitos

secundários (GUO et al., 2008). Estudos mais recentes, considerando a alta diversidade de fungos associados ao clima tropical, sugerem que a proporção do número total de espécies de fungos endofíticos para cada hospedeiro, seja muito superior, aproximando-se de 5,1 milhões de espécies (GAMBOA et al., 2003; BLACKWELL, 2011).

Os fungos endofíticos representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos com um amplo espectro de atividades biológicas. Mesmos com apenas 1% dos fungos endofíticos estudados mais de 20000 substâncias foram descritas de acordo com Ownley et al., (2010), sendo que destas 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica (PARANAGAMA et al., 2007; YANG et al., 2012). Em revisão publicada em 2001, Tan e Zou já descreviam 184 metabólitos, isolados de 59 fungos, sendo 96 destes inéditos.

Os metabólitos secundários já isolados de extratos de fungos endofíticos pertencem a inúmeros grupos estruturais, como as xantonas, esteroides, terpenoides, fenóis, isocumarinas, derivados perilenos, furandionas, quinonas, depsipeptídeos e citocalasinas (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Organismos filamentosos como os fungos e os actinomicetos, se constituem na principal fonte de metabólitos secundários com atividade frente à micro-organismos (DEMAIN; FANG 2000). Quanto à atividade antimicrobiana, especificamente, os compostos ativos isolados de fungos endofíticos pertencem a diversas classes estruturais de metabólitos tais como os alcalóides, peptídeos, fenóis, flavonoides, terpenóides, esteróides e quinonas (YU et al., 2010; RADIC; STRUKELJ, 2012).

Em estudos realizados com plantas no Brasil vários autores reportaram a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos por endofíticos como *Xylaria sp.*, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum sp.*, *Guignardia sp.* e também *Phomopsis sp.* (LU et al., 2000; RODRIGUES, et al., 2000; GOMES, 2008).

Segundo a teoria ecológica, a produção metabólica do fungo depende do nicho ecológico no qual o micro-organismo está inserido e das conseqüentes interações bióticas e abióticas. Isto sugere que a seleção da planta hospedeira para estudo deve ser realizada com espécies vegetais de diferentes biomas, principalmente as que enfrentam frequentes e intensas alterações no ambiente como plantas de florestas tropicais, regiões áridas, manguezais, entre outros (CHAPLA et al., 2013).

Neste sentido, as florestas tropicais são consideradas ecossistemas com grande biodiversidade, principalmente a Mata Atlântica. Esta diversidade biológica implica em diversidade química, já que no contexto da corrida evolucionária, sobrevive o organismo capaz de estar em constante inovação química (BILLS, 2002). De fato, os mesmos autores mostram que fungos endofíticos de ambientes tropicais, fornecem um maior número de compostos além disso, notaram que é significativamente elevado o número destes micro-organismos produzindo diversos metabólitos secundários ativos, se comparado com os fungos de florestas temperadas. Esta observação sugere a importância do ambiente em que a planta hospedeira está inserida sobre o metabolismo dos endofítico (CHAPLA et al., 2013).

Devido à descoberta do grande potencial dos fungos endofíticos, nos últimos anos a atenção dos químicos de produtos naturais foi atraída, conforme indicado pelo aumento constante de publicações dedicadas a este tema (ALY et al., 2010; CHAPLA et al., 2013).

Contudo dentre as aproximadamente 400 mil espécies de plantas existentes, poucas foram às espécies vegetais estudadas em relação a sua comunidade endofítica. Conseqüentemente é grande a oportunidade de descoberta de novos micro-organismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas, gerando um potencial novo campo de estudo, no que se referem às aplicações dos seus metabólitos (STROBEL et al., 2002; PEIXOTO NETO et al., 2004; AZEVEDO, 2010; KUSARI et al., 2011).

2.1.1 Atividade Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos

A resistência de bactérias e fungos aos antibióticos representa, na atualidade, um grave problema de Saúde Pública a nível mundial. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam para a proliferação descontrolada das resistências microbianas aos antibióticos convencionais, que perdem gradualmente eficácia clínica, complicando o tratamento de futuros doentes e exigindo a utilização de antibióticos de amplo espectro na terapêutica de infecções mais simples (OMS, 2012). Ao mesmo tempo em que acontece a perda da eficácia dos antimicrobianos conhecidos, há uma redução no desenvolvimento de novos

antimicrobianos, o tempo estimado de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento é de 10 a 20 anos e se seguirmos essa tendência, o arsenal terapêutico contra os micro-organismos resistentes se esgotarão em pouco tempo (OMS, 2012).

Devido à crescente resistência aos fármacos antimicrobianos faz-se necessária à prospecção de novos compostos com atividade antagônica a micro-organismos patogênicos e suas linhagens resistentes.

Antibióticos produzidos por micro-organismos são definidos como produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular, ativos em baixas concentrações contra outros micro-organismos (DEMAIN, 2002). Os fungos endofíticos, frequentemente, são fontes destes antibióticos, podendo inibir ou matar uma variedade de agentes causadores de doenças, como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (STROBEL; DAISY, 2003). Estudos sugerem que a ação antimicrobiana de algumas espécies de plantas, poderia estar relacionada à sua comunidade endofítica e que o princípio ativo antimicrobiano pode ser produzido pelo micro-organismo e não propriamente pelo vegetal, ou provavelmente pela interação planta-hospedeiro (CORRADO; RODRIGUES, 2004).

Vários agentes bioativos com atividade antimicrobiana têm sido isolados de fungos endofíticos, como a Coronamicina, um antibiótico peptídico produzido pela actinobactéria endofítica *Streptomyces sp.*, isolada a partir de *Monstera sp.* Ela é ativa contra os fungos pitiáceos, o fungo patogênico humano *Cryptococcus neoformans* e o parasita da malária, *Plasmodium falciparum* (EZRA et al., 2004).

Agentes antivirais isolados a partir de fungos endofíticos também são relatados, como por exemplo, o ácido citônico A e B, isolados do fungo endófito *Cytonaema sp.* Estes compostos são inibidores do Citomegalovírus (hCMV) e da protease humana (GUO et al., 2000).

A partir da fermentação de um fungo endofítico *Phomopsis sp.*, obtido da planta medicinal *Erythrina crista*, Weber et al., (2004), encontraram um novo antibiótico, uma Lactona Policetídica.

O policetídeo Citrinina, obtido do fungo endofítico *Penicillium janthinellum* a partir de frutos de *Melia azedarach*, apresentou 100% de atividade bactericida contra *Leishmania sp.* (MARINHO et al., 2005).

Guo et al., (2008), isolaram fungos endofíticos a partir de quatro tipos de plantas medicinais da família *Euphorbiaceae*. Detectaram a atividade antibacteriana

dos mesmos, encontrando onze linhagens pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Coniothyrium* e *Phomopsis*. Com consistente atividade contra as bactérias testadas, dentre elas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Trisuwan et al., (2010), observaram a atividade antibacteriana e antimalárica dos metabolitos Fusarantraquinona, Fusarnafitoquinona A, B e C e Fusarona, isolados do fungo endofítico *Fusarium sp.* da planta *Annella sp.*

Devi et al., (2012), isolou o composto com atividade bactericida 3,1'-didehydro- 3[2''(3''',3'''- dimethyl-prop-2- enyl)-3''-indolylmethylene]-6- methyl piperazina-2,5-diona do fungo endofítico *Penicillium chrysogenum* hospedeiro da planta *Porteresia coarctata*. Outro metabólito com atividade bactericida foi isolado do endofítico *Neurospora crassa* obtido de *Rhizophora mucronata* (JOEL; BHIMBA, 2013).

Xiao et al., (2013), isolaram a Flavipina, do endofítico *Chaetomium globosum*, da planta *Ginkgo biloba*. O composto apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium graminearum*.

Wellensiek et al., (2013), encontraram resultados positivos, quanto a avaliação da capacidade de inibição de replicação do vírus HIV-1, em linfócitos T, dos fungos *Phoma sp.*, *Alternaria tenuissima* e *Aspergillus sp.*, associados às plantas *Ephedra sp.*, *Quercus emoryi* e *Caesalpinia gilliesii*, respectivamente.

O antibiótico Trichodermaerina foi isolado por Xie et al., (2013) do endofítico *Trichoderma erinaceum* hospedeiro da *Acanthaster planci*.

Portanto, a pesquisa de novas substâncias com potencial antimicrobiano permite a ampliação das ferramentas para o controle dos micro-organismos, que vêm adquirindo resistência aos fármacos já existentes e também para o combate de várias outras doenças.

2.1.2 Atividade Antiproliferativa dos Fungos Endofíticos

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) o câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que são capazes de invadirem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de

tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. De acordo com estimativas mundiais da Organização Mundial da Saúde, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012 (INCA, 2014).

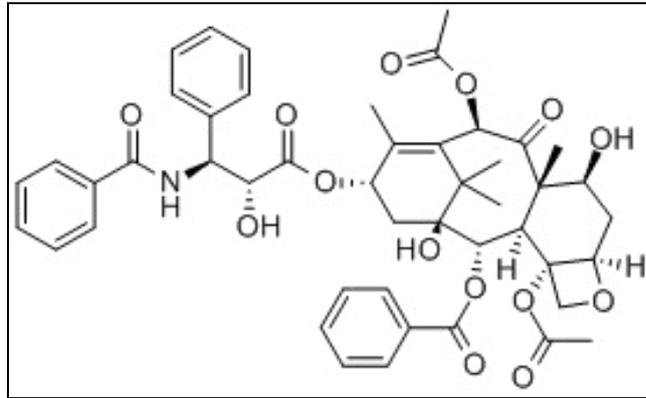
Conforme descrito pelo INCA (2010) existem três abordagens principais para o tratamento do câncer estabelecido a excisão cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, sendo que o papel de cada uma delas irá depender do tipo de tumor e do estágio de seu desenvolvimento.

A maioria dos fármacos antineoplásicos interfere no ciclo celular, já que as células tumorais multiplicam-se com maior rapidez do que a maioria das células normais. Contudo, comumente, quando se administra um fármaco antineoplásico, apenas uma pequena fração da dose reage com os sítios de ação. A maior parte da dose é distribuída aos órgãos sadios, causando-lhes toxicidade (PIMENTEL et al., 2011). Além da alta toxicidade os antineoplásicos também sofrem limitações contra as células tumorais multirresistentes as drogas (ZHANG et al., 2010).

Drogas antitumorais desenvolvidas a partir de recursos naturais são pesquisadas em todo o mundo. Estima-se que mais de 60% dos fármacos utilizados atualmente no tratamento do câncer, são derivados de compostos secundários do metabolismo de plantas superiores (NEWMAN et al., 2003).

Uma importante descoberta realizada foi a do fungo endofítico *Taxomyces andreane*, capaz de produzir o Paclitaxel-Taxol (figura 1), um poderoso anticancerígeno, utilizado no combate a diversos tipos de câncer e que já movimentou mais de 9 bilhões de dólares (STIERLE et al., 1993). Até então, acreditava-se que a única fonte dessa substância era a planta *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Outros fungos isolados de plantas do gênero *Taxus* L. também têm a capacidade de produzir Taxol (HEMPHILL, 2006; PEIXOTO NETO et al., 2004). O fungo *Stegolerium kukenani* endofítico da espécie tropical *Stegolepis guianensis*, é outro exemplo de fungo endofítico capaz de produzir o complexo diterpenóide Taxol (STROBEL et al., 2001; GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008). Em 2012, Elavarasi e colaboradores isolaram o complexo Taxol do fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, encontrado na planta *Rhizophora annamalayana*.

Figura 1- Fórmula do Paclitaxel (Taxol).



Fonte: TAN; ZOU (2001).

Outras drogas utilizadas na quimioterapia como a Vincristina e a Vinblastina, isoladas da *Catharantus roseus*, foram isoladas do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (FELLOWS, 1995; CARVALHAES et al., 2002; JALGAONWALA et al., 2011).

Em estudo Kumala et al., (2007) avaliou a potencialidade dos fungos endofíticos na produção de compostos antitumorais. Após o isolamento do composto Bruceocina foi notada ação anticancerígena do fungo endofítico *Fusarium chlamydosporum*, hospedeiro da planta *Brucea javanica*.

Um composto derivado de 9,10-antracenediona, isolado dos endofíticos *Halorosellinia sp.* e *Guignardia sp.*, fungos de manguezais, demonstrou forte atividade contra as células cancerígenas KB e KBv200 (ZHANG et al., 2010). A Podofilotoxina, também utilizada no tratamento de câncer, é encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophylum* e foi relatada nos fungos endofíticos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (ALY et al., 2011).

Muitos dos casos de câncer ainda não dispõem de tratamento adequado e novos alvos terapêuticos precisam ser conhecidos e testados (COSTA- LOTUFO et al., 2010).

Não é difícil verificar o elevado potencial de produção de metabólitos secundários pelos fungos endofíticos. Assim, o estudo dos fungos endofíticos visando a bioprospecção, a descoberta e a industrialização de novos compostos antiproliferativos é uma área fascinante para pesquisadores.

2.1.3 Atividade Antiparasitária dos Fungos Endofíticos

A leishmaniose visceral (LV) é uma das doenças tropicais prioritárias para a Organização Mundial da Saúde, pois é considerada endêmica em mais de 60 países (ALVAR et al., 2012). Entretanto, a maior parte dos casos (cerca de 90%) abrange países de clima tropical e subtropical. A epidemiologia da LV no Brasil tem sofrido mudanças significativas nos últimos 30 anos. Embora a maior parte dos casos ainda ocorra na Região Nordeste, a doença, apresentou uma grande expansão para outras regiões, notadamente a Região Norte, mas afetando também as Regiões Centro-Oeste e Sudeste, nesta última particularmente os Estados de Minas Gerais e São Paulo (GONTIJO; MELO, 2004; MSB, 2010).

Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos antileishmanioses, sendo que as principais estão direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento, ainda são os antimoniais pentavalentes (Sb⁵⁺). Alguns grupos de fármacos atuais utilizados contra leishmanioses são as Amidinas, Poliênicos, Aminoglicosídeos e Hexadecilfosfocolina (miltefosina), sendo que alguns apresentam elevada toxicidade para o paciente (BEZERRA et al., 2004).

A descoberta de propriedades terapêuticas de compostos ativos produzidos por fungos endofíticos tem despertado o interesse pela investigação de novas opções de tratamento da leishmaniose (CROFT; COOMBS, 2003). Todavia, poucos metabolitos secundários com atividade antileishmania têm sido reportados na literatura. Destacando-se os produzidos pelos fungos endofíticos *Penicillium janthinellum*, a Citrinina (MARINHO et al., 2005). E pelo *Cochliobolus* sp., a Cochlioquinona A e Isochlioquinona A (CAMPOS et al., 2008).

Martínez-Luís et al., (2008; 2009) isolaram sete compostos com atividade antileishmania provenientes do fungo endofítico *Edenia* sp: Preusomerina EG₁, Palmarumicina CP₂, Palmarumicina CP₁₇, Palmarumicina CP₁₈, Palmarumicina CP₁₉, 5- metilocracina, CJ- 12,371. Do fungo endofítico *Mycosphaerella* sp., foi isolado o metabolito secundário Cercosporina também com atividade antileishmania (MARTÍNEZ-LUÍS et al., 2011).

Santiago et al., 2011 isolou 564 fungos endofíticos de duas angiospermas provenientes da Antártida. Foram testados quanto a sua capacidade leishmanicida

contra a forma promastigota de *L. amazonensis* e destes, dezenove apresentaram atividade.

Santos et al., (2012), testaram o extrato da folha de *Eugenia uniflora* frente à linhagens de promastigotas de *Leishmania braziliensis*, obtendo resultados eficazes de inibição. Os autores sugerem que a *E. uniflora* possa ser uma fonte alternativa de produtos naturais com atividade contra *L. brasiliensis*.

Neste sentido, devido à grande dificuldade de encontrar fármacos antiparasitários que garantam uma ação terapêutica eficiente e menos tóxica ao hospedeiro, os fungos endofíticos, produtores em potencial de compostos antileishmania devem continuar a serem estudados.

2.2 A FAMÍLIA Myrtaceae E A ESPÉCIE *Eugenia pyriformis*

A família Myrtaceae Juss. pertencente à ordem Myrtales, que reúne 12 famílias botânicas consiste em aproximadamente 130 gêneros e 4.000 espécies de acordo com Lorenzi et al., (2006), distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente nas Américas e na Austrália (SOUZA; LORENZI, 2005). No Brasil, espécies de Myrtaceae restringem-se à tribo Myrteae, subdividida classicamente em Myrtinae, Eugeniinae e Myrciinae (LUCAS et al., 2005.; WILSON et al., 2005). Sendo uma das maiores famílias do país em número de espécies, 1.038 dessas 972 espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2005). Essa família se destaca como uma das mais importantes da flora brasileira, segundo Vieira et al., (2004), sendo a de maior riqueza específica na Mata Atlântica (FARIAS et al., 2009; ARMSTRONG et al., 2012).

Espécies da família Myrtaceae são constantemente relacionadas como produtoras de compostos secundários, especialmente compostos fenólicos (PAULA, 2008; PIETROVSKI et al., 2008; REYNERTSON et al., 2008). Investigações fitoquímicas destas espécies revelaram a presença de várias classes de metabólitos secundários, tais como flavonoides, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, esteróis e tanino (LIMBERGER et al., 2001; MARKMAN et al., 2004; VALLILO et al., 2008; MARIN et al., 2008).

Eugenia L. é um dos maiores gêneros da família, com uma ampla distribuição nas Américas Central e do Sul (MERWE et al., 2004). É um táxon importante, pois apresenta um valor nutricional, comercial e potencial de aproveitamento na obtenção de fármacos (DONADIO et al., 2002). Em uma revisão por Auricchio e Bacchi (2003) sobre a *E. uniflora* L. , confirmou-se os efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, anti-hipertensivos e anti-diabéticos desta espécie. Estudos posteriores demonstraram que a mesma espécie exibiu atividades antimicrobianas, antioxidantes e atividade leishmanicida (AURICCHIO et al., 2007).

A *Eugenia pyriformis* (Cambess) popularmente conhecida como uvaia, uvalha, ubaia, uvaieira (figura 2), é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica brasileira de porte médio entre 5 e 15 m de altura, com crescimento relativamente rápido. A árvore apresenta uma copa alongada formada por uma folhagem serícea, subcoriáceas e acetinadas na superfície inferior, característica que lhes confere um brilho particular, flores solitárias brancas e frutificação precoce (LORENZI, 2002; SCALON et al., 2004b).

Os frutos desta espécie são indeiscentes, carnosos, piriformes, pilosos e com coloração amarela e comestíveis, de sabor adocicado e acidulado, podendo ser utilizados na fabricação de suco, vinagre e vinho (FRANZON et al., 2004; SOBRAL, 2013). O fruto é uma baga, quimicamente composto por 90,7% de água, 7,5% de sólidos solúveis, com sólidos solúveis totais (SST) / acidez total titulável (ATT), 100g⁻¹ de vitamina C e de 1,5% de acidez, entretanto a sua alta perecibilidade restringe a comercialização *in natura* (DONADIO, 1997; SCALON et al., 2004a; RUFINO et al., 2009).

A planta pode ser cultivada em pomares e empregada na medicina popular, seus frutos apresentam altos níveis de atividade antioxidante e compostos fenólicos (STEFANELLO et al., 2009; ARMSTRONG et al., 2012). Stefanello et al., (2009) pesquisou a composição do óleo essencial da folha e das flores de *E. pyriformis* e encontrou principalmente sesquiterpenos e uma pequena quantidade de monoterpenos. Os constituintes principais do óleo da folha foram o α -cadinol, epi- α -cadinol, δ -cadineno e biciclogermacreno 3. Já no óleo essencial das flores encontraram a presença de compostos aromáticos. Sendo os principais constituintes o *E*-cariofileno (22,8%) e Germacreno D (15,3%).

Schmeda-Hirschmann et al., (1987) e Theoduloz et al., (1988) encontraram nas folhas de *E. pyriformis* flavonoides com propriedades inibidoras da xantino-

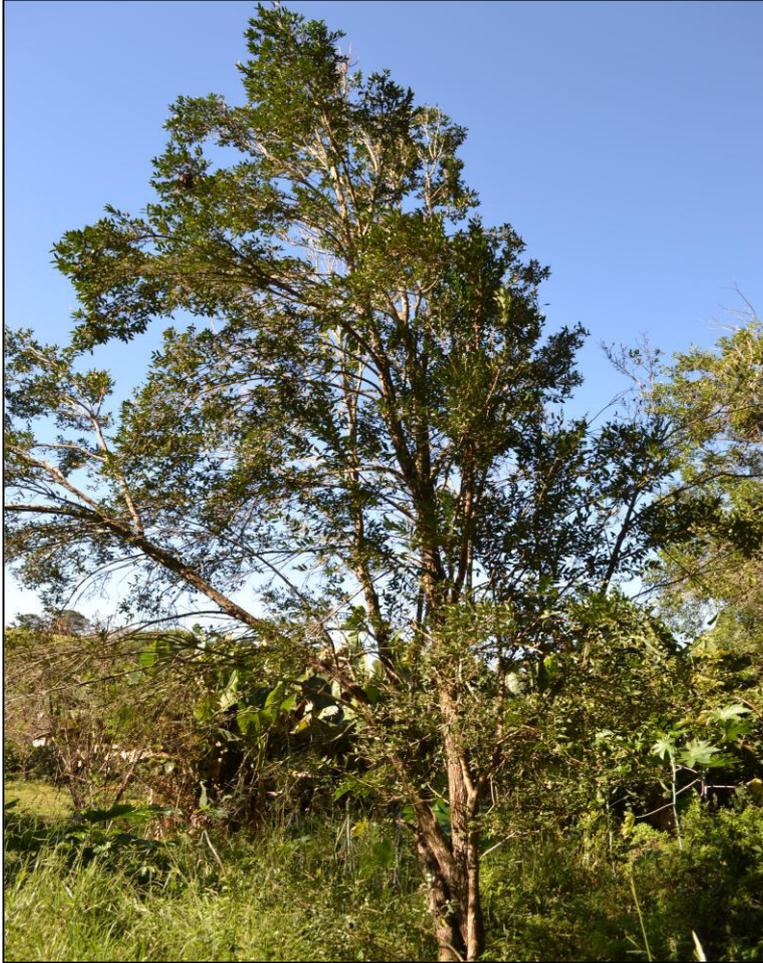
oxidase, uma enzima envolvida na conversão da xantina em ácido úrico, que pode atuar no tratamento da gota humana.

Segundo Stieven et al., (2009) o fruto da *Eugenia pyriformis* apresentou atividade bacteriostática frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Souza et al., (2014) também obtiveram bons resultados com extratos brutos e frações do caule e folhas de *E. pyriformis* frente a bactérias gram positivas, negativas e leveduras. Assim como Chavasco et al., (2014) que testou extratos das sementes e folhas.

Apesar de inúmeros trabalhos com a *Eugenia pyriformis*, não há relatos na literatura sobre isolamento e bioprospecção de fungos endofíticos da espécie. Motivando a sua escolha para esse estudo, visto que pesquisas sobre a planta demonstram grande potencial para a produção de metabólitos ativos. Além de, pertencer ao gênero *Eugenia* da família Myrtaceae, que apresenta espécies de plantas com um número elevado de fungos endofíticos isolados.

Figura 2- Árvore de *Eugenia pyriformis*, popularmente conhecida como Uvaia.



Fonte: Do autor.

3 MATERIAIS E METODOS

A parte experimental consistiu no isolamento e seleção de fungos endofíticos conforme descrito na figura 3. Posteriormente os endofíticos selecionados foram submetidos à avaliação das atividades biológicas antimicrobianas, antiproliferativas e antiparasitárias.

3.1 MATERIAL VEGETAL E LOCAL DAS COLETAS

As coletas das folhas saudáveis de uma espécime adulta de *Eugenia pyriformis* (Uvaia) foram realizadas na zona rural do município de Alfenas, no estado de Minas Gerais, Brasil (21° 24' 53.3" S e 45° 52' 13.8" W). Para obtenção do material vegetal foram realizadas duas coletas no período do Outono, a primeira no dia 08/04/2013 e a segunda no dia 10/06/2013 ambas na parte da manhã. Posteriormente a coleta, ramos com flores foram depositados no herbário da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL- MG) para exsicata, sob o número UALF 2537.

3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE PLANTAS DA ESPÉCIE *Eugenia pyriformis*.

As folhas foram levadas ao Laboratório de Bioprocessos, onde foram previamente lavadas sob água corrente e submetidas à desinfecção superficial por imersão em etanol 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 2 minutos, e etanol 70% (v/v) por 30 segundos, sendo lavadas em água destilada após o processo (PETRINI et al., 1992; SCHULZ et al., 1993). Discos de folhas de 2,5 mm de diâmetro foram retirados utilizando um perfurador esterilizado (GAMBOA, et al., 2003).

Discos de folhas foram transferidos, em número de sete fragmentos por placa, para placas de Petri (90 mm diâmetro) contendo meio de cultura MA2 (extrato de malte 2%, agar 2%) acrescido de sulfato de estreptomicina (50 mg/L) para suprimir crescimento de bactérias. Alíquotas de água destilada esterilizada utilizada ao final do processo de desinfecção foram plaqueadas em meio Agar-Batata-Dextrose (ABD), para avaliar se o processo de desinfecção foi bem sucedido e assegurar que somente os fungos endofíticos seriam isolados. As placas de Petri foram incubadas em estufa tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), na temperatura de 28°C. As placas foram avaliadas diariamente, por um período de aproximadamente 7 dias, para a verificação da ocorrência de crescimento de colônias fúngicas a partir do material vegetal inoculado. Todos os fungos detectados foram transferidos para placas de Petri de 60 mm contendo o meio ABD, sem antibióticos por sete dias no DBO à 28°C.

3.3 CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS

Culturas representativas das espécies isoladas foram preservadas em tubos inclinados contendo meio de cultura ABD. Após cinco dias de crescimento a 28°C no DBO, foram estocados sob-refrigeração em geladeira a 8°C até o momento de sua utilização.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Para a obtenção dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos, os isolados foram repicados, primeiramente, em meio de cultura ABD por sete dias a 28°C e em seguida submetidos ao processo de fermentação.

Discos (5 mm) de micélio das culturas recentes em ABD foram cortados e inoculados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de caldo para fermentação Czapeck (Tabela 1) e incubados a 28°C, por 14 dias, em condições estáticas e na ausência de luz.

A fermentação microbiana como meio de produção de substâncias bioativas tem várias vantagens, como a possibilidade de reprodução e produtividade segura, já que o micro-organismo cultivado em tanques de fermentação se torna uma fonte potencialmente inesgotável. Além disso, os micro-organismos geralmente respondem de forma favorável às técnicas rotineiras de cultura (TEJESVI et al., 2007; SPECIAN et al., 2014).

Tabela 1- Composição do Meio de Fermentação, Caldo Czapeck.

Componentes	Quantidade
C ₆ H ₁₂ O ₆	30,0 g
NaNO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Água Destilada	qsp 1000 mL

Fonte: Do autor.

Após o período de crescimento, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo com papel filtro. O filtrado obtido foi separado por partição líquido-líquido com o solvente Acetato de Etila na proporção de (1:1) v/v.

O extrato orgânico obtido foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo, na temperatura de 45°C e pressão de 1,5 atm, a massa de extrato bruto obtido foi mensurada para cálculo do rendimento.

Para controle negativo nos testes posteriores foi utilizado o extrato do caldo Czapeck sem inoculação, obtido da mesma forma que os extratos contendo os inóculos.

3.5 PRÉ-SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR HALO DE INIBIÇÃO

Visando selecionar os micro-organismos endofíticos isolados com atividade antimicrobiana, foi realizada uma seleção primária através da técnica de difusão em Agar, realizada utilizando o método de Pour Plate. Um volume determinado das suspensões microbianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram-positiva), *Escherichia coli* 25922 (Gram-negativa) e *Candida albicans* ATCC 10231 foi padronizado de forma a obter um crescimento no agar de 3×10^8 UFC. mL⁻¹ para as bactérias e 3×10^6 UFC. mL⁻¹ para a levedura. Sendo inoculado em meio Agar Mueller Hinton para as bactérias e fungos, a mistura foi homogeneizada delicadamente.

Após a homogeneização, 30 mL do meio, inoculado com os micro-organismos, foram imediatamente vertido em placas de petri previamente esterilizadas. Após a solidificação, foram feitos poços no meio de cultura das placas onde foi colocada uma alíquota de 25 µL de extrato resuspendido com Dimetilsulfóxido (DMSO). Os volumes de DMSO para a ressuspensão variaram de 100 a 500 µg/mL conforme o rendimento dos extratos. Os volumes foram obtidos por meio da fórmula (500 mL DMSO para 0,1g de extrato), visando uma concentração fixa aproximada de cada extrato. As placas, então, foram incubadas por 24 horas a 37°C.

O DMSO e o extrato obtido do caldo Czapeck sem inóculo foram utilizados como controle e o ensaio foi realizado em triplicata.

A análise dos resultados do teste permitiu selecionar os micro-organismos potencialmente produtores de substâncias com atividade antimicrobiana, levando em consideração a formação do halo de inibição ao redor dos poços.

Figura 3- Fluxograma de todo o processo de obtenção dos extratos.



Fonte: Do autor.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A metodologia utilizada foi a de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços de acordo com as instruções do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005) segundo Sarker et al., (2007) com modificações.

3.6.1 Micro-organismos utilizados e preparo dos inóculos

Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas (tabela 2), gentilmente cedido pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da UNIFAL-MG. Os micro-organismos foram previamente cultivados (24 horas) e suas suspensões foram preparadas em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada a 75% de transmitância em 660 nm, de modo a fornecer 3×10^8 UFC mL⁻¹ para as bactérias.

Tabela 2- Micro-organismos utilizados nos teste de microdiluição em caldo.

Micro-organismos	Identificação	Classificação
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram – positiva
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	Gram – positiva
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Gram – positiva
<i>Serratia marcescens</i>	LMI-UNIFAL ^a	Gram – positiva
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram – negativa
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 22228	Gram – negativa
<i>Enterobacter cloacae</i>	LMI-UNIFAL ^a	Gram – negativa
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 25933	Gram – negativa

Fonte: Do autor.

Nota: a) Isolado e Mantido pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da UNIFAL-MG.

3.6.2 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para o ensaio de CIM foram preparadas duas soluções dos extratos fúngicos. A solução mãe (S1) continha 0,025g de extrato, 500 µL DMSO e 500 µL de Álcool Absoluto. A solução dois (S2) utilizada no teste continha 160 µg de S1 e 840 µL de caldo Mueller Hinton.

Em cada poço das microplacas de 96 poços, foram depositados 50 µL de caldo Mueller Hinton para bactérias, 50 µL de solução do extrato fúngico e mais 50 µL da suspensão do micro-organismo. A diluição seriada foi feita com o objetivo de obter uma mistura final com 100 µL por poço. As faixas de concentrações utilizadas foram 1000 µg; 500 µg; 250 µg; 125 µg; 62,50 µg; 31,25 µg; 15,62 µg; 7,81 µg; 3,90 µg; 1,95 µg de substância por mL da mistura final.

Um dos poços de cada placa foi utilizado como controle do crescimento bacteriano, adicionando a ele 100 µL dos meios de cultura mais 100 µL da suspensão de micro-organismos. Um poço foi utilizado para o controle de esterilidade dos meios de cultura utilizados e em outro foi feito o controle negativo dos solventes utilizados na solubilização dos extratos (Etanol e Dimetilsulfoxido). Cada extrato testado também foi depositado em um poço para controle.

As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas para as bactérias. Posteriormente foram acrescentados 50 µL do revelador Resazurina a 0,01%, as

placas foram novamente encubadas nas mesmas condições e após 2 horas a leitura foi feita.

3.6.3 Avaliação da concentração bactericida e fungicida mínima (CBM)

Para a realização deste ensaio foram utilizadas como inóculo as concentrações que não apresentaram crescimento microbiano no teste de concentração inibitória mínima. Foram retirados 50 μL de cada poço e inoculados em placa com meio Mueller Hinton e posteriormente incubadas a 37°C, por 24 horas.

A concentração bactericida ou fungicida mínima foi aquela em que não houve crescimento no agar inoculado, ou seja, 99,9% de morte microbiana.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Para a avaliação da atividade citotóxica dos extratos o ensaio da Sulforodamina B (SRB) de acordo com Monks et al., (1991), foi utilizado. O experimento foi realizado no CPQBA – Unicamp - Campinas/SP.

Dez linhagens de células tumorais humanas (tabela 3), gentilmente cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI - EUA), foram utilizadas no ensaio. Anteriormente mantidas em 5 mL de meio RPMI suplementados com 5% de soro fetal bovino e incubadas a temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Tabela 3- Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária
U251	SNC; Glioma	Ectoderme
HaCat ^a	Pele; Queratinocitos imortalizados	Ectoderme
MCF-7	Mama; Adenocarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES ^b	Ovário; Adenocarcinoma	Ectoderme
786-O	Rim; Adenocarcinoma	Mesoderme
NCI-H460	Pulmão; Carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme
PC-3	Próstata; Adenocarcinoma	Mesoderme
OVCAR-3	Ovário; Adenocarcinoma	Mesoderme
HT-29	Cólon; Adenocarcinoma	Endoderme
K562	Medula Óssea; Leucemia Mielóide Crônica.	Mesênquima

Fonte: Do autor.

Nota: a) Linhagem humana não tumoral b) esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc[®]), de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3x10⁴ e 6,5x10⁴ cel/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 50 µg/mL de gentamicina (Schering Plus[®]). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foi adicionada 100µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10mg dos extratos foi dissolvida em 100µL de DMSO. Em seguida, 50µL dessa solução-mãe foi disperso em 950 µL de meio RPMI/ 5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não deverá interferir no crescimento celular.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL. Neste momento, procedeu-se a fixação com Ácido Tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T₀, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/ compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 60 minutos a 4°C; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma[®]), 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração do extrato, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada de acordo com as seguintes fórmulas:

- a) Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular;
- b) Se $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$;
- c) Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$;

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula;

T₁ = absorbância do branco de células;

T₀ = absorbância do controle de células na placa T₀.

Gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração do extrato foram gerados para cada uma das linhagens testadas. Três concentrações efetivas denominadas de GI₅₀ (do inglês *growth inhibition*), concentração necessária para interromper em 50% do crescimento celular e TGI (do inglês *total growth inhibition*), concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) foram calculadas por regressão não linear, tipo sigmoideal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Para a avaliação da atividade antiparasitária dos extratos o ensaio *in vitro* da atividade leishmanicida (promastigotas) de acordo com Pereira et al., 2010 foi realizado.

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram mantidas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas à razão de 1×10^6 células/mL para placas de 24 poços.

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg dos extratos foi dissolvida em 1 mL de DMSO. Em seguida, 50 µL dessa solução-mãe foi disperso em 3,12 µL de meio LIT (Liver Infusion and Tryptose), para preparação da solução de trabalho. Esta foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das faixas de concentração das amostras dos extratos utilizadas no ensaio de 20 a 160 µL/mL. As placas foram incubadas a 25°C por 72 horas e a leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 600 nm em leitor de microplacas.

O meio LIT, acrescido de DMSO (6 µL) e de formas promastigotas foi utilizado como controle no ensaio.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

As linhagens isoladas que apresentaram atividade biológica estão em processo de identificação no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA/MG). Para a identificação foi feito o micro-cultivo e os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas foram observados. Os resultados estão sendo comparados com base em literatura específica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos conforme as metodologias propostas estão descritos nos itens posteriores juntamente com a discussão.

4.1 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A primeira etapa de experimentos foi crucial para a continuidade do trabalho. Já que consistiu no processo isolamento de isolamento dos fungos endofíticos, que foram avaliados nas etapas posteriores.

4.1.1 Experimento Piloto

Para isolamento de endofíticos faz-se necessária à eliminação dos micro-organismos epifíticos. Visando a eliminação, é de vital importância determinar com precisão o tempo e concentração de compostos que serão utilizados durante o tratamento de lavagem. A textura do material vegetal utilizado deve ser exaustivamente verificada, no intuito de eliminar apenas os micro-organismos da superfície vegetal, impedindo a destruição dos fungos endofíticos (PEREIRA et al., 1993; SCHULTZ et al., 1993; FISHER et al., 1995).

A técnica utilizada baseia-se na imersão das folhas em Hipoclorito de Sódio 3%, durante alguns minutos. Devido às características particulares das folhas de cada espécie, o tempo de imersão pode variar consideravelmente.

Fernandes et al., (2009) utilizaram no processo de desinfecção de folhas de *Coffea arabica* L. Hipoclorito de Sódio 3% durante quatro minutos, não observando oxidação dos fragmentos foliares, permitindo o isolamento de fungos endofíticos.

No presente estudo, visando à desinfecção superficial das folhas, sem o comprometimento do isolamento devido à oxidação, foi realizado um isolamento prévio (piloto) para determinar o tempo adequado de imersão no reagente.

No piloto, folhas de *Eugenia pyriformis*, foram submetidas à desinfecção com Hipoclorito de Sódio 3% durante quatro e dois minutos. No primeiro tempo foi observado escurecimento das folhas, indicativo de oxidação. Após sete dias de incubação no DBO não houve crescimento de colônias e foi possível constatar alta oxidação em todos os fragmentos. Em decorrência deste resultado o tempo determinado em hipoclorito de sódio foi de dois minutos, que se mostrou eficiente para a desinfecção superficial das folhas.

4.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Eugenia pyriformis*

O processo de isolamentos dos micro-organismos teve como resultado o isolamento de aproximadamente 200 fungos endofíticos, a partir das folhas de uma árvore adulta de *E. pyriformis*.

A técnica de isolamento dos fungos endofíticos foi eficaz, não havendo crescimento de micro-organismos no plaqueamento da última água de lavagem. Sugerindo que o tempo de dois minutos estabelecido para imersão em hipoclorito de sódio 3% no processo de desinfecção das folhas foi adequado.

Das amostras de folhas *Eugenia pyriformis* coletadas no Outono, foram observadas a partir do quarto dia de isolamento, colônias de fungos emergindo dos fragmentos das folhas. O meio MA2 acrescido de sulfato de estreptomicina mostrou-se eficiente para o isolamento de fungos endofíticos, não permitindo o crescimento de bactérias.

A taxa de crescimento dos endofíticos durante o isolamento pode variar conforme a espécie hospedeira. Soares et al., (2012) isolando endofíticos das folhas de *Eugenia uniflora* L. observou o surgimento das colônias bacterianas e fúngicas após 48 horas de cultivo.

Pode - se dizer que o número de isolados endofíticos encontrados no presente estudo esta de acordo com os relatos da literatura, já que o número costuma variar conforme a espécie. Vários fatores podem interferir na obtenção de isolados endofíticos, são eles a temperatura e umidade, o pH do meio de cultura, época de coleta das amostras e técnicas de isolamento. Além disso, micro-

organismos que crescem lentamente, ou mesmo que não crescem em ABD, podem não ser obtidos (PROMPUTTHA et al., 2007).

Carvalho, (2011) pesquisando a frequência de fungos endofíticos associados à *Rheedia brasilienses*, isolou a partir de 245 fragmentos de folhas, 154 fungos endofíticos. Tonial, (2010) isolou 128 fungos endofíticos das folhas da aroeira *Schinus terebenthifolius*. Vieira et al., (2012) obteve 530 fungos endofíticos, isolados *Ixora coccinea* L. Em estudo recente, Moreira, (2013) isolou 316 fungos endofíticos, destes, 204 obtidos das folhas e 112 dos caules de *Araucaria angustifolia*, única gimnosperma endêmica do Brasil.

Dos aproximadamente 200 fungos endofíticos isolados, 100 foram colocados para fermentar, submetidos à partição líquido-líquido com solvente e rotoevaporados para obtenção dos extratos fúngicos. Os fungos e conseqüentemente os extratos foram nomeados com o número da folha seguido pelo número do fragmento dos quais foram isolados. A massa dos extratos brutos obtida após a fermentação em 100 mL de caldo Czapeck foi mensurada para cálculo dos rendimentos. Os valores estão expostos no quadro 1 (apêndice A). Os extratos foram então submetidos à pré-seleção.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Conforme os resultados obtidos na triagem dos extratos foi possível observar e selecionar os fungos com maior potencial antimicrobiano para a realização dos testes de CIM e CBM.

4.3.1 Pré-seleção por halo de inibição

O teste de difusão em agar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em um meio de cultura sólido. A interpretação do ensaio relaciona-se ao tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado com a concentração da substância testada (PINTO et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008). No presente estudo a técnica utilizada para a realização do teste foi a de perfuração do agar.

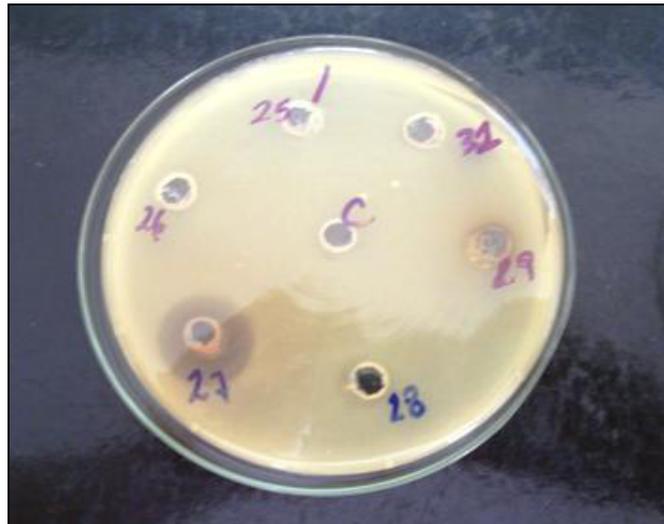
O teste de difusão em Agar para a pré-seleção das linhagens fúngicas foi feito com os extratos fúngicos obtidos a partir do fermentado e observamos a inibição do crescimento pela formação do halo. O teste foi feito em triplicata e as médias dos resultados estão expostas no quadro 1 (apêndice A).

De acordo com os dados do quadro 1 podemos observar que o *S.aureus* foi inibido por um maior número de extratos, 34 extratos apresentaram a formação de halo. Em comparação com a *C.albicans* que teve seu crescimento inibido por 12 extratos, já para *E.coli* esse número foi ainda menor, 8 extratos demonstraram atividade.

Este perfil de ação ocorre, geralmente, devido às diferenças estruturais destes micro-organismos. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular quimicamente mais complexa do que as Gram-positivas, com um teor lipídico maior, gerando resistência à ação dos compostos (VARGAS et al, 2004). A estrutura complexa das leveduras, células eucarióticas que podem apresentar características celulares muito semelhantes às de células humanas, pode constituir uma barreira para a atividade dos mesmos (FREITAS, 2003).

No total 54% dos extratos fúngicos provenientes da fermentação dos fungos endofíticos isolados, apresentaram halos de inibição frente a pelo menos um dos micro-organismos (figura 4).

Figura 4- Formação de halos de inibição do crescimento frente a *C. albicans*.



Fonte: Do autor.

Nota: Extrato fúngico F15F1 (27).

Estudos encontrados na literatura, com plantas hospedeiras da mesma família e gênero de *Eugenia Pyriformis* corroboram com os resultados do presente trabalho.

Banhos et al., (2014) avaliaram o potencial antimicrobiano de 46 fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae), uma planta amazônica pertencente a mesma família da *E. pyriformis*. Três extratos foram capazes de apresentar halo de inibição frente a *S. aureus* e um frente a *C. albicans*.

Em estudo sobre os endofíticos de *Eugenia uniflora*, planta pertencente ao mesmo gênero de *E. pyriformis*, Soares, (2011) observou atividade antimicrobiana com formação de halo de inibição frente a *S. aureus* e *E. coli* de 33% dos 21 fungos endofíticos isolados no período chuvoso.

A atividade antimicrobiana de fungos endofíticos presentes em galhos e folhas de *Eugenia dysenterica*, planta também pertencente ao mesmo gênero de *E. pyriformis* foi avaliada. Foram isolados 263 fungos endofíticos, dos quais 96 apresentaram potencial para o biocontrole de alguns dos fitopatógenos avaliados (SILVA, 2013; MAZUTI SILVA et al., 2015).

Recentemente, Yadav et al., (2014) estudando fungos isolados de *Eugenia jambolana*, planta também pertencente ao mesmo gênero de *E. pyrifomis*, observou atividade antimicrobiana significativa no ensaio de difusão em agar de 68% dos 22 extratos de acetato de etila obtidos dos endofíticos testados.

Apesar de vários extratos apresentarem a formação de halos de inibição, é necessário avaliar quais foram significativos. Levando em consideração o tamanho do halo e a atividade frente aos três micro-organismos, os extratos que apresentaram uma atividade mais significativa foram o F6F3, o F12F2 e o F15F1 (tabela 4).

Os três extratos fúngicos que demonstraram atividade frente aos três micro-organismos na pré-seleção tiveram novamente os fungos fermentados, devido ao seu amplo espectro de ação, para a obtenção de novo extrato em maior quantidade a fim de realizar os testes de CIM e CBM. E posteriormente os testes antiparasitários e antiproliferativos.

O DMSO e o extrato obtido do caldo Czapeck sem inóculo foram utilizados como controles negativos, não sendo capazes de inibir o crescimento de nenhum dos micro-organismos testados.

Tabela 4- Halos de Inibição dos fungos com melhores resultados no teste de triagem.

Extratos	Micro-organismos		
	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C. albicans</i>
F6F3	20 mm	10 mm	20 mm
F12F2	22 mm	17 mm	18 mm
F15F1	17 mm	20 mm	20 mm

Fonte: Do autor.

4.3.2 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida e fungicida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é representada pela sensibilidade dos micro-organismos às substâncias antimicrobianas, correspondendo a menor concentração da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo (MADIGAN et al., 2010). A interpretação dos resultados é feita pela observação da manutenção da cor azul da resazurina ou pelo surgimento de coloração rosa nos poços. A resazurina é um indicador de óxido redução, utilizado para revelar alteração de pH no meio determinado pelo crescimento bacteriano (LANGONI et al.,1996; KORU et al., 2007). As cavidades que adquirirem uma coloração rosada indicam a reação química de óxidoredução da resazurina em resorfurina sendo interpretada como presença de células viáveis, enquanto que nas cavidades onde não há mudança na coloração do corante, interpreta-se como ausência de células viáveis, indicando inibição do crescimento celular pelo extrato (LANGONI et al.,1996) .

Foram testados os três extratos que apresentaram os melhores resultados contra todas as três cepas na pré - seleção pelo teste de difusão em Agar.

Na Tabela 5, estão descritos os resultados de atividade antimicrobiana para os extratos F6F3, F12F2, F15F1 e o extrato do Meio de Fermentação frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. luteus*, *B. subtilis* e *S. epidermidis*.

Analisando a tabela cinco podemos perceber que o extrato F15F1 teve um melhor resultado frente às bactérias na CIM, demonstrando ação antimicrobiana a cinco das oito bactérias testadas. Frente a três dentro da faixa de concentração de 250-500 µg/mL, sendo Gram-positivas e Gram-negativas. O extrato F12F2 também foi capaz de inibir cinco bactérias, contudo a faixa de concentração foi mais elevada.

O extrato F6F3 apresentou atividade contra a quatro das oito bactérias testadas em alta faixa de concentração, de 500 a 1000 µg/mL. Diferentemente do teste de pré-seleção o fungo não foi capaz de inibir a bactéria *E.coli*. Contudo as comparações entre o testes devem ser feitas com parcimônia, já que os métodos não possuem a mesma sensibilidade e não são baseados sob o mesmo princípio, além de que diversos são os fatores que afetam a suscetibilidade do método de

difusão e de microdiluição. Dentre eles estão o meio de cultura, o pH, a disponibilidade de oxigênio, o inóculo e as condições de incubação (BARRY; THORNSBERRY, 1991; PINTO et al., 2003; LI-CHANG et al., 2005; OSTROSK et al., 2008).

Nenhum dos extratos foi capaz de inibir a bactéria gram-positiva *S. epidermidis*, importante patógeno relacionado com a ocorrência de endocardites, sepse, bacteremias, sendo o isolado com maior frequência entre os pacientes que adquiriram em ambiente hospitalar (HUDOME; FISHER, 2001), bem como outras graves infecções (KONEMANN et al., 1999; MARANGONI, 1997).

De uma maneira geral os extratos obtiveram um melhor resultado, a inibição dentro de faixas de concentração menores, quando testadas em bactérias gram-positivas. Esse padrão já era esperado, visto que já havia sido observado no teste de difusão em Agar.

As bactérias Gram negativas, apesar de possuírem uma estrutura de parede celular menos rígida do que as Gram positivas têm uma parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos principais constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é responsável por determinar a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses micro-organismos (CHEW et al., 2011). Esse grupo de bactérias possui também maior teor lipídico do que as Gram positivas. Segundo Vargas et al., (2004) tais características podem estar envolvidas com a maior resistência ao extrato do fungo endofítico testado.

Esses resultados estão próximos a outros encontrados na literatura. Em um ensaio semelhante Fernandes et al., (2009) testando um fungo endofítico isolado do café observou que maiores concentrações de extratos de 400 a 800 µg/mL são necessárias para inibir as bactérias gram-negativas como a *E. coli*, enquanto concentrações menores são capazes de inibir o *S. aureus*.

Momesso et al., (2008) realizaram o CIM de sub-frações obtidas do extrato acetato de etila do fungo endofítico *Chaetomium globosum*, associado a *Viguiera robusta*, afim de avaliar sua atividade antibactericida. Valores de CIM de 120 µg/mL para *S. aureus* e de 189 µg/mL para *E. coli* foram observados. Ola et al., (2014) obtiveram valores significativos de CIM em torno de 32 µg/mL, frente a *S. aureus* de metabolitos isolados de *Diaporthe melonis*, fungo endofítico hospedeiro de *Annona squamosa*. Johann et al., (2012) testando um composto isolado do endofítico *Alternaria* sp. observou uma forte atividade contra *Paracoccidioides brasiliensis* com

valores de MIC variando entre 1,9 e 31,2 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para *Schizosaccharomyces pombe*. Segundo Mitscher et al., (1972) substâncias isoladas devem apresentar valores menores de CIM visando o interesse para uso clínico.

Em um estudo similar ao presente, o fungo endofítico *Rhizoctonia sp.* isolado da planta nativa do cerrado *Annona crassiflora* não foi capaz de inibir a bactéria gram-negativa *E. coli*. Enquanto apresentou inibição frente a *S. aureus* na faixa de concentração de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MENDONÇA et al., 2015).

Os fungos isolados de *Eugenia jambolana* apresentaram, segundo os autores significativa atividade no ensaio frente a *P. mirabilis* e *S. aureus*, cuja concentração inibitória mínima (CIM) variou de 3,75 a 5,0 mg/mL conforme o endofítico testado (YADAV et al., 2014).

Apesar de inúmeros relatos na literatura apresentarem resultados próximos aos encontrados neste estudo, vale resaltar o trabalho realizado por Melo et al., 2013 sobre o endofítico *Mortierella alpina* isolado da planta hospedeira *Schistidium antarctici* nativa da Antártica. O extrato do fungo apresentou valores de CIM variando entre 26.9 e 430 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, sendo mais ativo frente a *E. coli* com uma CIM de 26.9 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, em comparação com *S. aureus* CIM de 215.3 $\mu\text{g/mL}^{-1}$.

Os extratos dos endofíticos de *E. pyriformis* não obtiveram uma boa atuação no teste de CBM, sendo incapazes de apresentar atividade bactericida em faixas de concentração mais baixas.

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada considerando a variação das concentrações de 1000 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$. Essas concentrações foram definidas até este valor máximo, pois na busca por produtos naturais bioativos, um valor superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ é considerado inativo e não seria viável para utilização futura (HOLETZ et al., 2002; DALL'ANGOL et al., 2003; TANAKA et al., 2005). Segundo os autores, extratos com CIM variando entre 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ são classificados como tendo atividade antimicrobiana moderada e extratos com CIM de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ são classificados como tendo atividade antimicrobiana fraca.

O extrato do caldo de fermentação (Czapeck), não inibiu o crescimento dos micro-organismos, o que nos leva a acreditar que o caldo não exerceu influência sobre a atividade antimicrobiana do extrato fúngico.

A busca por fungos endófitos para a produção de substâncias com potencial antimicrobiano atualmente é intensa, contudo não há relatos na literatura sobre

isolamento e bioprospecção de fungos endofíticos da espécie *Eugenia pyriformis*. Os resultados obtidos nesse trabalho pioneiro confirmam a potencial ação antimicrobiana dos fungos endofíticos isolados. Deve-se ressaltar que os extratos avaliados são brutos e melhores resultados podem ser obtidos com o isolamento de compostos responsáveis pela atividade. Porém, estudos mais aprofundados acerca da eficácia desses endofíticos fazem-se necessários.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos de *E. pyriformis*.

Extratos	F6F3		F12F2		F15F1		Meio	
	CIM ^a (µg/mL)	CBM ^b (µg/mL)						
<i>Staphylococcus aureus</i>	500-1000	SI	250-500	1000	250-500	1000	SI	SI
<i>Escherichia coli</i>	>1000	SI	500-1000	SI	500-1000	SI	SI	SI
<i>Proteus mirabilis</i>	500-1000	SI	500-1000	SI	500-1000	SI	SI	SI
<i>Enterobacter cloacae</i>	>1000	SI	>1000	SI	>1000	SI	SI	SI
<i>Serratia marcescens</i>	>1000	SI	>1000	SI	>1000	SI	SI	SI
<i>Micrococcus luteus</i>	250-500	1000	250-500	1000	250-500	1000	SI	SI
<i>Bacillus subtilis</i>	500-1000	SI	500-1000	SI	250-500	1000	SI	SI
<i>S. epidermidis</i>	>1000	SI	>1000	SI	>1000	SI	SI	SI

Fonte: Do autor.

Nota: a) CIM: Concentração Inibitória Mínima; b) CBM: Concentração Bactericida Mínima; SI: sem inibição.

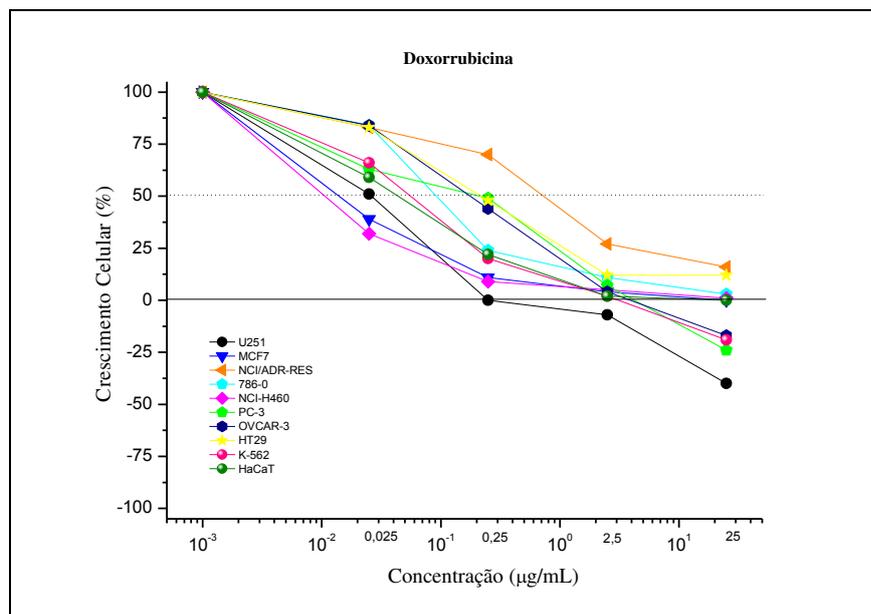
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Os três extratos fúngicos que demonstraram atividade frente aos três micro-organismos na pré-seleção, F6F3, o F12F2 e o F15F1, tiveram sua ação antiproliferativa avaliada. O ensaio realizado para a avaliação foi o da Sulforodamina B (SRB), a Doxorrubicina foi utilizada como padrão no teste.

O extrato obtido a partir do meio de fermentação dos fungos (Caldo Czapeck), também foi submetido ao teste para comparação dos resultados.

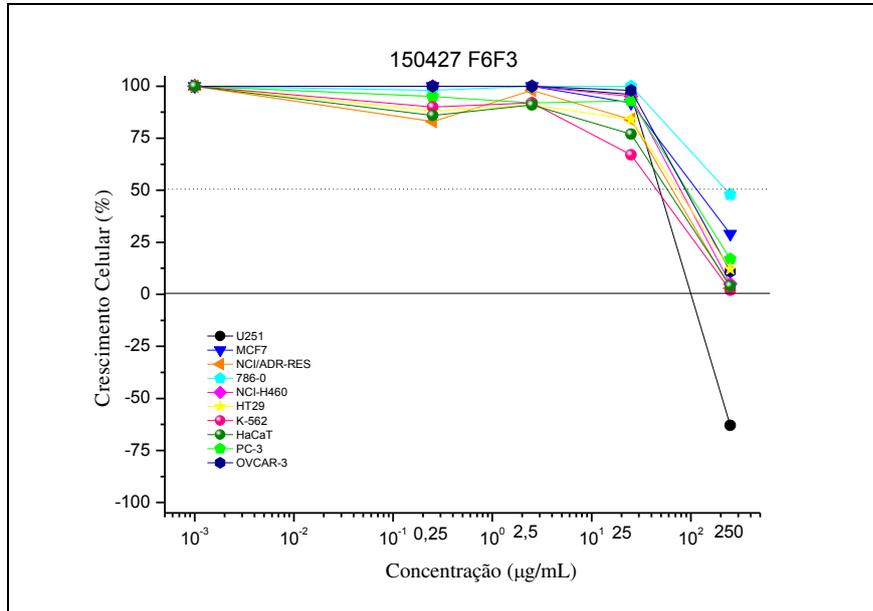
As atividades antiproliferativas exercidas pela Doxorrubicina utilizada como padrão, pelos extratos acetato de etila dos fungos endofíticos e pelo extrato do meio são demonstradas pelos gráficos abaixo (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9), respectivamente.

Figura 5- Atividade da Doxorrubicina no ensaio Antiproliferativo.



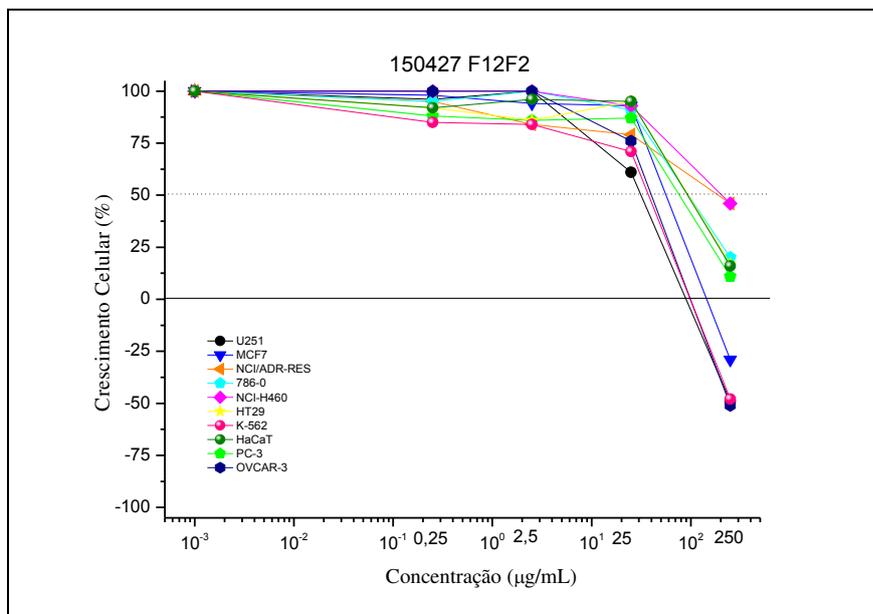
Fonte: Do autor.

Figura 6- Atividade do extrato F6F3 no ensaio Antiproliferativo.



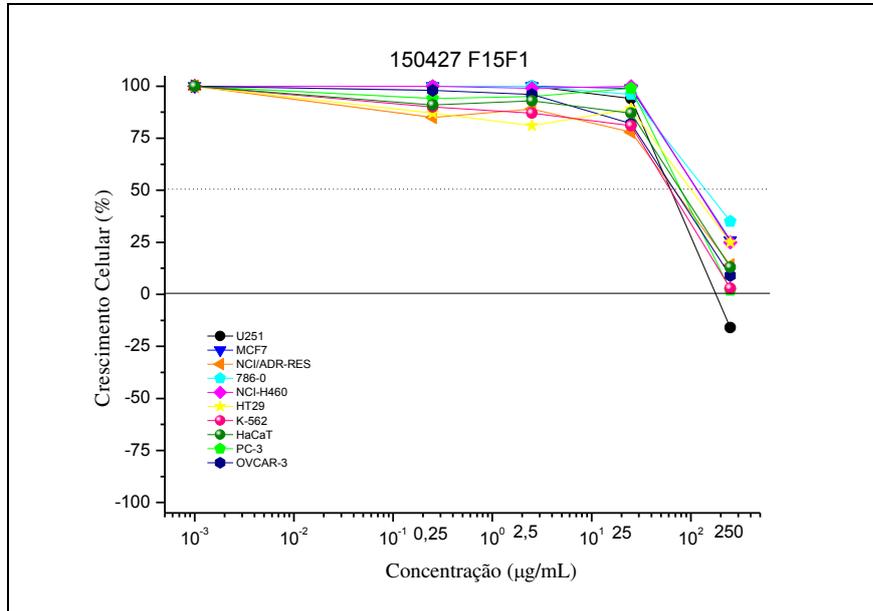
Fonte: Do autor.

Figura 7- Atividade do extrato F12F2 no ensaio Antiproliferativo.



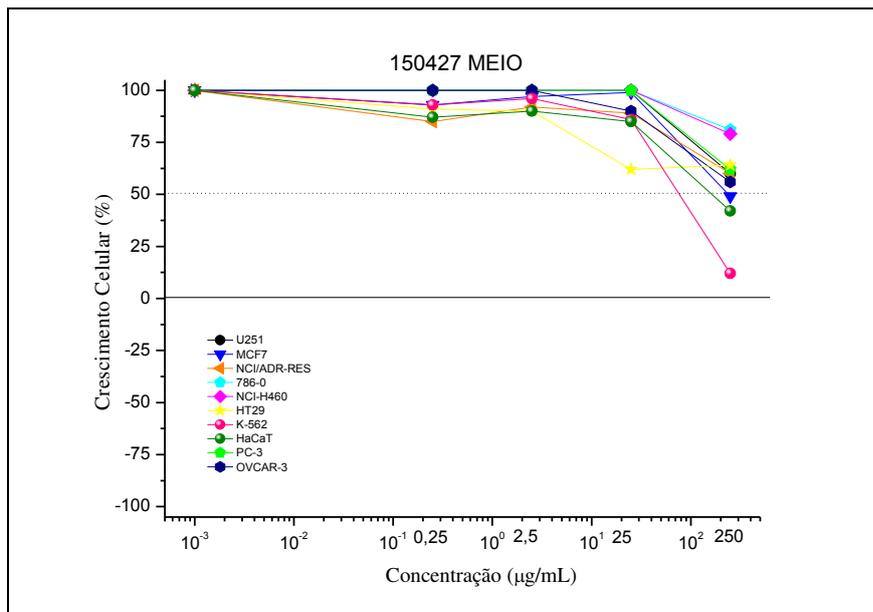
Fonte: Do autor.

Figura 8- Atividade do extrato F15F1 no ensaio Antiproliferativo.



Fonte: Do autor.

Figura 9- Atividade do extrato do meio no ensaio Antiproliferativo.



Fonte: Do autor.

De acordo com a análise qualitativa dos gráficos podemos observar que os extratos não demonstraram atividade antitumoral parecida com a do padrão Doxorubicina, agente antineoplásico amplamente administrado em Oncologia Humana e Veterinária (NAKAGE; SANTANA, 2008). Sendo capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens tumorais testadas.

Para a avaliação da atividade antiproliferativa foram empregadas nove linhagens de células tumorais humanas e uma linhagem não tumoral. Na Tabela 6 encontram-se os valores da concentração necessária para inibição de 50% da proliferação celular (GI_{50}), expressos em $\mu\text{g/mL}$, para os extratos fúngicos, contra linhagens de células tumorais. Os resultados e as médias foram expressos em logaritmos.

Analisando a tabela 6 podemos verificam-se que os valores de GI_{50} variam entre $<-1,602 \mu\text{g/mL}$ e $>2,398 \mu\text{g/mL}$. Os valores mais baixos foram apresentados pela Doxorubicina frente às linhagens MCF-7 (Mama) e H460 (Pulmão) e os valores mais altos pelo Extrato do meio de fermentação frente a sete das nove linhagens de células tumorais humanas testadas.

O extrato F12F2 apresentou os menores valores no ensaio, frente às linhagens U251(Glioma) e OVCAR-03 (Ovário). Também foi o extrato que teve o menor valor frente à linhagem humana não tumoral.

Os altos valores obtidos pelo extrato do meio de fermentação evidenciam que o mesmo não exerce influencia na potencial atividade antitumoral dos extratos dos fungos endofíticos. Como também não foi ativo nos ensaios de triagem e de CIM, a escolha do caldo Czapeck como caldo de fermentação foi satisfatória, visto que o mesmo não interferiu na produção de compostos bioativos pelos fungos endofíticos.

A média dos $\log GI_{50}$ variam entre $<-0,80 \mu\text{g/mL}$ e $>2,36 \mu\text{g/mL}$. Sendo a menor média pertencente ao padrão e a maior ao extrato do meio de fermentação. As médias foram utilizadas para determinar o efeito dos extratos.

Tabela 6- Inibição parcial do crescimento celular (GI_{50}), expressos em $\mu\text{g/mL}$, de linhagens tumorais frente aos extratos e ao padrão.

Padrão e extratos	Linhagens celulares testadas										Média log GI_{50}	q
	2	m	a	7	4	p	o	h	K			
Doxorrubicina	-1,602	<-1,602	-0,155	-1,004	<-1,602	-1,000	-0,770	-0,658	-1,387	<-0,80	-1,284	
F6F3	1,543	2,130	1,722	2,395	1,898	2,014	2,048	1,849	1,683	1,98	1,573	
F12F2	1,420	1,521	2,334	2,023	2,340	1,870	1,456	2,043	2,036	1,97	1,428	
F15F1	1,520	2,212	1,801	2,235	2,353	1,939	1,794	2,033	1,895	2,02	1,704	
Meio	>2,398	2,398	>2,398	>2,398	>2,398	>2,398	>2,398	>2,398	2,247	>2,36	1,873	

Fonte: Do autor.

Nota: Linhagens celulares testadas: 2=U251(Glioma); m=MCF-7 (Mama); a= NCI-ADR/RES (Ovário) 7= 786-0 (Rim); 4= NCI-H460 (Pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (Próstata); o= OVCAR-03 (Ovário); h= HT29 (Cólon). Linhagem não tumoral humana: q= HaCat (Queratinócito).

Para análise e interpretação dos resultados de GI_{50} (tabela 7) foi considerado o critério do Instituto Nacional do Câncer – EUA (NCI), segundo Fouche et al., (2008), que classifica o efeito citostático dos extratos em quatro categorias, são elas: Inativo, Fraco, Moderado e Potente (tabela 7) conforme resultado da média do log GI_{50} . Esse método é utilizado para comparar diferentes amostras com um perfil parecido.

Tabela 7- Classificação dos extratos segundo a Média do log GI_{50} .

Classificação	Média do log GI_{50}
Inativo	média > 1,5
Fraco	1,1 < média < 1,5
Moderado	1,1 > média > 0
Potente	média < 0

Fonte: Do autor.

Segundo os critérios do NCI apresentados na tabela 7 os extratos F6F3, F12F2 e F15F1 foram classificados como Inativos, visto que a média dos log GI_{50} foram maiores que 1,5. Podemos então, constatar que as amostras são muito parecidas entre si, com um mesmo perfil de curva de proliferação celular e uma mesma potencia, não sendo capazes de inibir o crescimento de células tumorais.

Comparando os valores de GI_{50} dos extratos e do padrão podemos perceber a grande diferença nas médias. A Doxorubicina é classificada como potente, sendo capaz de demonstrar grande inibição no crescimento celular.

Os resultados obtidos nesse ensaio pelos extratos dos fungos endofíticos foram contrários às expectativas, devido aos vários relatos na literatura sobre substâncias com atividade antiproliferativa isoladas de fungos endofíticos.

Em um estudo similar ao presente, o fungo endofítico *Rhizoctonia sp.* isolado da planta nativa do cerrado *Annona crassiflora* foi classificado como potente apresentando atividade antiproliferativa frente a todas as linhagens tumorais testadas (MENDONÇA et al., 2015).

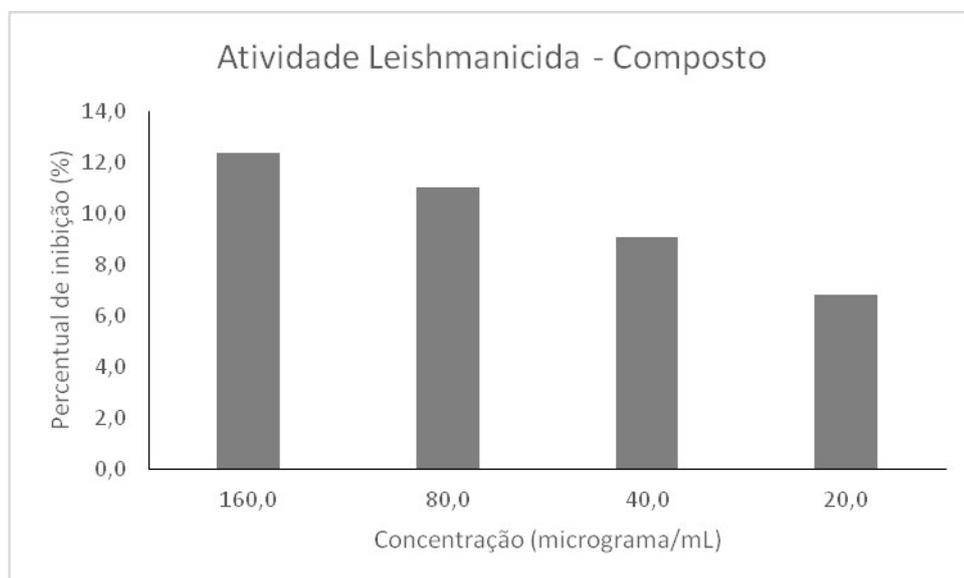
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Os três extratos fúngicos que demonstraram atividade frente aos três microorganismos na pré-seleção, F6F3, o F12F2 e o F15F1, tiveram sua ação antiparasitária avaliada. O ensaio *in vitro* realizado para a avaliação foi o da atividade leishmanicida (promastigotas).

A atividade leishmanicida exercidas pelo extrato do fungo F12F2 é demonstrada pelo gráfico abaixo. O percentual de inibição do extrato variou entre 6 a 12 % aproximadamente. Sendo o menor percentual de inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 20 µg/mL e o maior na concentração de 160 µg/mL.

Os fungos F6F3 e F15F1, não foram capazes de inibir o crescimento das promastigotas nas concentrações testadas.

Figura 10- Atividade do extrato no teste Leishmanicida.



Fonte: Do autor.

A baixa atividade leishmanicida demonstrada pelos fungos endofíticos isolados de *E. pyriformis* não era esperada e apesar de apresentar um percentual de inibição, o fungo F12F2 foi fracamente ativo, inviabilizando o cálculo da concentração inibitória para 50% das formas promastigotas (CI₅₀).

Em um estudo realizado avaliando a atividade antiparasitária de fungos isolados de *Ageratum myriadenia*, *Palicourea tetraphylla*, *Piptadenia adiantoides*, e *Trixis vauthieri*, foi observada, segundo os autores atividade leishmanicida altamente seletiva. Dois dos extratos testados inibiram o crescimento de *L. amazonensis* em mais de 90% (ROSA et al., 2010).

Os fungos endofíticos são grandes promessas na procura por metabolitos com ação antitumoral e antiparasitária, contudo como podemos observar pelos resultados dos ensaios nem todos os fungos isolados de plantas apresentam essas características. Não se sabe exatamente as razões das expectativas no encontro de compostos terem sido, em parte, frustradas.

Um dos motivos sugeridos é a atenuação ou perda da produção de metabolitos pelos endófitos após algumas repicagens em laboratório. Embora as razões para diminuição não sejam conhecidas, algumas especulações como, por exemplo, a ausência do estímulo do hospedeiro nas condições laboratoriais, e/ou o silenciamento de alguns genes em culturas axênicas durante o cultivo, são feitas. Tentativas para reverter à diminuição da produção dos compostos, tais como adicionar partes dos hospedeiros ou extratos de tecidos do hospedeiro ao meio de cultivo, não têm sido bem sucedidas (KUSARI; SPITELLER 2011; SUDHAKAR et al., 2013).

Alguns autores tentam elucidar essas questões através do estudo mais crítico dos mecanismos de produção de metabolitos secundários pelos fungos endofíticos. A relação mutualística que se estabelece entre endofítico-hospedeiro, pode levar a produção de compostos originalmente presentes na planta pelo fungo. Tan e Zou, (2001) sugerem que a recombinação genética dos endofíticos com a sua planta hospedeira levaria à incorporação de rotas genéticas da hospedeira ao genoma do fungo endofítico. Contudo, relações simbióticas podem ser extremamente complexas e alguns aspectos da transferência horizontal de genes entre a planta hospedeira e o fungo endofítico associado permanecem desconhecidos (STROHL, 2001; SACHIN et al., 2013; SUDHAKAR et al., 2013; FREIRE et al., 2014).

5 CONCLUSÕES

Fungos endofíticos constituem uma riqueza em termos de diversidade em ecossistemas tropicais e na produção de metabolitos secundários.

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos podemos concluir que:

- a) O tempo ideal de imersão em Hipoclorito de Sódio 3% foi de dois minutos para o isolamento de micro-organismos endofíticos;
- b) A espécie *Eugenia pyriformis* tem grande potencial como fonte de fungos endofíticos;
- c) Os fungos endofíticos F6F3, F12F2 e F15F1 não tiveram resultados satisfatórios nas concentrações testadas, nos testes de atividade antiproliferativa e antiparasitária;
- d) Os extratos Acetato de Etila dos fungos endofíticos apresentaram resultados significativos nos testes antimicrobianos, revelando-se potenciais agentes produtores de compostos antibióticos.

REFERÊNCIAS

ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Divers**, v. 41, n. 1, 2010.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, p. 1829–1845, 2011.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes—secret producers of bioactive plant metabolites. **Pharmazie**, v. 68, p. 499–505, 2013.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos ONE**, v. 7, 2012.

ARAÚJO, W. L. et al. **Guia Prático**: isolamento e caracterização de microorganismos endofíticos. Piracicaba: CALO, 2010.

ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 475-481, 2012.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, p. 55-61, 2003.

AURICCHIO, M. T. et al. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 76-81, 2007.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In : AZEVEDO, J. L.; MELOJ, I. S. **Ecologia Microbiana**. Jaguariuna: Editora Embrapa, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L. Importância dos microorganismos endofíticos na agricultura. In: LUZ, W.C. et al. (Eds). **RAPP**: revisão anual de patologia de plantas. v. 11. Passo Fundo, 2003. p.333-371.

AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON C. W.; WHITE, J. F. J. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000. p. 237–263.

BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among entophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Bioscience**, v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.

BANHOS, E. F. et al. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 153-161, 2014.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.

BEZERRA, R. J. S.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, 2004.

BILLS, G. et al. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: WATLING, R.; FRANKLAND, J. C.; AINSWORTH, A. M. et al. **Tropical Mycology: Micromycetes**. CABI Publishing, 2002, p.165-194.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426–438, 2011.

BUATONG, J. et al. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal Microbioly and Biotechnology**, n. 27, p. 3005–3008, 2011.

CAMPOS, F. F. et al. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus sp.*, an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 2, n. 12, 2008.

CARVALHAES, S. F. et al. Alternative extraction of alkaloid anticarcinogens from Brazilian “*Vinca rosea*” using ion exchange chromatography. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 83-84, 2002.

CARVALHO, P. L. N. **Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados às plantas do gênero Rheedia**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

CHEW, Y. L et al. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from Southern Minas Gerais Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 56 n. 1, p. 13-20, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASSETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

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

COSTA-LOTUFO L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis, current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.

DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum species*. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 69, p. 1-39, 2000.

DEMAIN, A. L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **Nature Biotechnology**, v. 20, 2002.

DEVI, P. et al. Isolation and characterization of antibacterial compound from a mangrove-endophytic fungus, *Penicillium chrysogenum* MTCC 5108. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 617-623, 2012.

DONADIO, L. C. Study of some Brazilian Myrtaceae in Jaboticabal – SP. **Acta Horticulturae**, v. 452, p. 181-183, 1997.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas Brasileiras**. 2. ed. Jaboticabal: Novos Talentos, 2002, p. 288.

ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora Annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 2, p. 1081-1085, 2012.

EZRA, D. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p. 785–793, 2004.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, v. 98, p. 25–36, 2002.

FARIAS, V. R. et al. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 398-406, 2009.

FELLOWS, L. E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: future prospects. In: COOMBS, J.D. **New Drugs from Natural Sources**. London: ed. IBC Technical Services, 1995.

FERNANDES, M. R. V. et al. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, 2009.

FISHER, P. J. et al., Fungal Endophytes of *Dryas octopetala* from a High Arctic Polar Semidesert and from the Swiss Alps. **Mycological Society of America**, v. 87, n. 3, 1995.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v.1, 2010, p. 21-39.

FOUCHE, G. et al. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 455– 461, 2008.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B.; WAGNER JÚNIOR, A. Fenologia da floração e maturação dos frutos da uvalheira (*Eugenia pyriformis* Camb.). In: Simpósio Nacional do Morango e do 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 2, 2004, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: 2004, p. 397-402.

FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, v. 16, n. 1, p. 61-102, 2014.

FREITAS, J.D. et al. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. **Biometals**, v. 16, n.1, p.185-197, 2003.

GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, n. 1, p. 41-45, 2003.

GANDHI, S.G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, p. 303–317, 2015.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycologia Balcanica**, v. 5, p. 1-4, 2008.

GIAUQUE, H.; HAWKES, C. V. Climate affects symbiotic fungal endophyte diversity and performance. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 7, p. 1435-1444, 2013.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GOMES, R. R. **Phomopsis spp. endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa***. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2008.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p. 338-349, 2004.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12. p. 454-500, 1999.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUO, B. et al. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora species*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 602-604, 2000.

GUO, B. et al. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 1422-1432, 2001.

HEMPHILL, T. A. Economic considerations in cooperative research and development agreements (CRADA): The case of Taxol, NIH, and technology transfer. **Technology in Society**, v. 28, n. 3, p. 321-331, 2006.

HIROTA, M. M. Monitoramento da cobertura da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 60-65.

HOFFMAN, M. T.; ARNOLD, A. E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. **Mycological Research**, v. 112, n. 3, p. 331-344, 2008.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HUDOME, S. M.; FISHER, M. C. Nosocomial infections in the neonatal intensive care unit. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14. p. 303-307, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (INCA). **Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional**, v. 4. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (INCA). **Estimativa | Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

JABER, L. R.; VIDAL, S. Interactions between an endophytic fungus, aphids and extrafloral nectaries: do endophytes induce extrafloral-mediated defences in *Vicia faba*? **Funct Ecol**, v. 23, p. 707–714, 2009.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

JOEL, E. L.; BHIMBA, B. V. Biological activity of secondary metabolites isolated from mangrove fungi *Neurospora crassa*. **Journal of Environmental Biology**, v.34, n. 4, p. 729-732, 2013.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 205-209, 2012.

JOHRI, B. N. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1315-1316, 2006.

KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite—what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n.4, p. 358–363, 2006.

KONEMAN, E. W, et al. **Diagnóstico Microbiológico** - Texto y Atlas Color. 5. ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1999.

KONGSAEREE, P. et al. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotricum* sp., and endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 709-711, 2003.

KORU, O. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, v. 13, p. 140-145, 2007.

KUMALA, S. R.; SUDARMONO, U. P.; KARDONO, L. B. S. Cytotoxic secondary metabolites from fermentation broth of *Brucea javanica* endophytic fungus 1.2.11. **Research Journal of Microbiology**, v.2, n.8, p. 625-631, 2007.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

KUSARI, S. et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. That produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1287-94, 2012.

KUSARI, P. et al. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. **Fungal Divers**, v. 60, p. 137-151, 2013.

LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano in vitro da própolis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 2, p. 227-29, 1996.

LI-CHANG, L.; YUE-WEN, C.; CHENG-CHUN, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 213-220, 2005.

LIMBERGER, R. P. et al. Chemical composition of essential oils from some *Campomanesia species* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 2, p. 113-115, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. et al. **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas: (de consumo in natura)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006, p. 640.

LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum sp.*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.

LUCAS, E. J. et al. Phylogenetic patterns in the fleshy-fruited *Myrtaceae* preliminary molecular evidence. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 35-5, 2005.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artemed, 2010.

MAKI, C.S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Tese (Doutorado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARANGONI, D.V. *Staphylococcus aureus*. In: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J.S.; AMARANTE, J.M.B. et al. **Infecções Hospitalares Prevenção e Controle**. São Paulo: Sarvier, 1997, p. 573-591.

MARIN, R. et al. Volatile components and antioxidant activity from some Myrtaceous fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p.172-177, 2008.

MARINHO, A. M. R, et al. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 280-283, 2005.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 55–57, 2004.

MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Antileishmanial constituents of the *Panamanian* endophytic fungus *Edenia sp.* **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 2011–2014, 2008.

MARTINEZ-LUIS, S. et al. Additional anti-leishmanial constituents of the *Panamanian* endophytic fungus *Edenia sp.* **Revista Latinoamericana de Química**, v. 37, n. 2, p. 104–114, 2009.

MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of *Panamanian* endophytic fungi. **International Microbiology**, v. 14, p. 95-102, 2011.

MAZUTI SILVA, S. M. et al. *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC. (cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 27, p. 49-95, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. (MSB) – **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**, 2010.

MELO, I. S. et al. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. **Extremophiles**, v. 18, p.15–23, 2014.

MENDONÇA, A. N. et al. Potential antimicrobial and antiproliferative activity of the crude extract of the endophytic fungus *Rhizoctonia sp.* from *Annona crassiflora*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 40, 2014.

MERWE, M. M.; WYK, A. E.; BOTHA, A. M. Molecular phylogenetic analysis of *Eugenia L.* (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa. **Plant Systematic Evolution**, v. 251, n. 1, p. 21-34, 2004.

MITSCHER, L. A. et al. Antimicrobial agents from higher plants. **Lloydia**, v. 35, p. 157-166, 1972.

MOMESSO, L. S. et al. Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). **Química Nova**, v. 31, n.7, p. 1680-1685, 2008.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MOREIRA, M. G. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 786-792, 2000.

MORICCA, S.; GINETTI, B.; RAGAZZI, A. Species and organ specificity in endophytes colonizing healthy and declining *Mediterranean oaks*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, p. 587–598, 2012.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

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

NASCIMENTO, T. L. **Fungos endofíticos de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.: aspectos ecológicos e potencial antimicrobiano**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

NAKAGEA, A. P. M.; SANTANA, A. E. Avaliação das Funções hepática e renal de cães expostos ao antineoplásico doxorubicina. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias Amb.**, v. 6, n. 3, p. 371-379, 2008.

NEWMAN, L. A. et al: Histopathologic evidence of tumor regression in the axillary lymph nodes of patients treated with preoperative chemotherapy correlates with breast cancer outcome. **Annals of Surgical Oncology**, v. 10, p. 734-739, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, v. 252, p. 64-66, 2008.

OLA, A. R. B. et al. Dihydroanthracenone metabolites from the endophytic fungus *Diaporthe melonis* isolated from *Annona squamosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 3147–3150, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE (OMS). **Antibiotic Resistance**. Geneva, Switzerland: WHO; 2012.

OSTROSKY E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, p. 79–99, 2004.

OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D.; VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **Bio Control**, v. 55, p. 113-128, 2010.

PARANAGAMA, P. A.; WIJERANTE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. J. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1939-1945, 2007.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, p. 884–888, 2005.

PAULA, J. A. M. et al. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum – Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, L. W. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 4, 2004.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: A First Report. **Mycological Society of America**, v. 85, n. 3, 1993.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomed**, v. 17, p. 339-345, 2010.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIETROVSKI, E. F. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n.4, p.479-487, 2008.

PIMENTEL, M.R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

PROMPUTTHA, I. et al. A Phylogenetic Evaluation of Whether Endophytes Become Saprotrophs at Host Senescence. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 579-590, 2007.

RADIĆ, N.; ŠTRUKELJ, B. Endophytic fungi - the treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v. 19, p. 1270–1284, 2012.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.

ROSA, L. H. et al. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 114–122, 2010.

RUFINO, M. S .M. et al. Total phenolic content and antioxidant activity in acerola, açai, mangaba and uvaia fruits by DPPPH method. **Acta Hort**, v. 841, p. 459-462, 2009.

SACHIN, N. et al. Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 104, n. 2, p. 178-182, 2013.

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

SANTIAGO, I.F. et al. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, p. 95-103, 2012.

SANTOS K. K. et al. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L., **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 1, p. 130–132, 2012.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321-324, 2007.

SCALON, S. P. Q.; DELL'OLIO, P.; FORNASIERI, J. L. Temperatura na conservação pós colheita de *Eugenia Uvalha* Cambess – Mirtaceae. **Ciência Rural**, v. 34, n 6, p. 1965- 1968, 2004a.

SCALON, S. P.Q.; SCALON FILHO, H; RIGONI, M.R. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1228-1234, 2004b.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 183-186, 1987.

SCHULZ, B. et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v. 97, p. 1447–1450, 1993.

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

SELOSSE, M. A. et al. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. **Microbial Ecology**, v. 47, p. 416–426, 2004.

SILVA, M. C.; CASTELETI, C. H. M. Estado da biodiversidade da Mata Atlântica brasileira. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. **Mata Atlântica: Biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005, p.43-59.

SILVA, T. H. Utilização de fungos endofíticos associados *Eugenia dysenterica* DC (cagaita) como antagonistas dos fungos fitopatogênicos: *Aspergillus parasiticus*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Monilinia fructicola*. **Resumo em Anais...** Palmas: Universidade Federal do Tocantins, 2013. p. 1-6.

SOARES, E. C. L. **Isolamento de endofíticos de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e avaliação da bioatividade**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SOARES, E. C. L. et al. Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* sp. UFPEDA 968. **Scientia Plena**, v. 8, n. 12, 2012.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10338>>. Acesso em: 11 Jun. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, A. M. et al. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae: Antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862-867, 2014.

SPECIANA, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Ciências Biológicas e Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-51, 2014.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Composição Química e Variação Sazonal dos Óleos Essenciais de *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 449-453, 2009.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214–216, 1993.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA C. F.; Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.

STONE, J. K. et al. Endophytic Fungus. In: MUELLER, G.M.; FOSTER, M.S.; BILLS, G.F. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. Elsevier Academic Press, 2004.

STROBEL, G. A. et al. *Stegolerium kukenani* gen, et sp nov., an endophytic taxol producing fungus from the Roraima and *Kukenan tepuis* of Venezuela. **Mycotaxon**, v. 78, p. 353–361, 2001.

STROBEL, G. A. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p. 179-183, 2002.

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

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

STROHL, W. R. Biochemical engineering of natural product biosynthesis pathways. **Metabolic Engineering**, v. 9, n.1, p. 4-14, 2001.

SUDHAKAR, T. et al. Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 104, n. 2, 2013.

TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 5, p. 834-837, 2005.

TEJESVI, M. V. et al. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química México**, v. 1, n. 1, p. 19-26. 2007.

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

THEODULOZ, C. et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Paraguayan* Myrtaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 24, p. 179-183, 1988.

TONIAL, F. **Atividade Antimicrobiana de Endófitos e de Extratos Foliare de *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TRISUWAN, K. et al. Anthraquinone, cyclopentanone, and naphthoquinone derivatives from the Sea Fan-derived fungi *Fusarium spp.* PSU-F14 and PSU-F135. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1507–1511, 2010.

VALLILO, M. I. et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231-237, 2008.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

VIEIRA, T. R. et al. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 536-539, 2004.

VIEIRA, P. D. S. et al. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. **Mycology**, v. 2, n. 2, p. 91-97, 2011.

VIEIRA, P. D. S. et al. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2012.

WANG, Y.; GUO, L. D. Endophytic fungi II. New records from pine in China. **Mycosystema**, v. 23, p. 24-27, 2004.

WANG, Y.; DAI, C. C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 207-215, 2011.

WEBER, D. et al. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina cristagalli*. **The Journal of Antibiotics**, v. 57, p. 559-563, 2004.

WELLENSIEK, B. P. et al. Inhibition of HIV-1 Replication by Secondary Metabolites From Endophytic Fungi of Desert Plants. **The Open Virology Journal**, v. 7, p. 72-80, 2013.

WHITE JR., J. F.; REDDY, P.V.; BACON, C. W. Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal. In: BACON, C.W.; WHITE JR, J.F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. cap.3, p 49–62.

WILSON, P. G.; et al. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.

XIAO, Y.; et al. Antifungal screening of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* for discovery of potent anti-phytopathogenic fungicides. **FEMS Microbiology Letters**, v. 339, p. 130-136, 2013.

XIE, Z. L. et al. Trichodermaerin, a new diterpenoid lactone from the marine fungus *Trichoderma erinaceum* associated with the sea star *Acanthaster planci*. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 1, p. 67-68, 2013.

YADAV, M. et al. Evaluation of in Vitro Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi Isolated from *Eugenia Jambolana* Lam. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 5, 2014.

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 622-641, 2012.

YU, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, p. 437–449, 2010.

ZHANG, J. Y. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1469-1481, 2010.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

APÊNDICE

Apêndice A: Quadro 1- Rendimento dos extratos (gramas) e médias dos halos de inibição frente às cepas (mm). (continua)

Extratos	Rendimento	Micro-organismos		
		<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E.coli</i>
F1F2	0,036 g	17 mm	-	-
F1F7	0,047 g	-	-	-
F2F7	0,097 g	17 mm	-	8 mm
F3F1	0,070 g	-	-	-
F3F4	0,012 g	15 mm	-	-
F3F5	0,219 g	13 mm	-	-
F3F6	0,287 g	15 mm	-	-
F4F1	0,216 g	-	-	-
F4F7	0,182 g	18 mm	-	9 mm
F5F1	0,076 g	23 mm	17 mm	12 mm
F6F3	0,029 g	20 mm	20 mm	10 mm
F7F5	0,936 g	-	-	-
F7F6	0,193 g	11 mm	-	-
F7F7	0,023 g	30 mm	20 mm	-
F9F4	0,195 g	-	-	-
F9F6	0,025 g	-	-	-
F10F3	0,285 g	13 mm	-	-
F10F6	0,010 g	15 mm	-	-
F11F1	0,141 g	19 mm	10 mm	8 mm
F11F2	0,054 g	-	-	-
F11F3	0,042 g	-	-	-
F11F7	0,030 g	-	-	-
F12F1	0,063 g	10 mm	-	-
F12F2	0,058 g	22 mm	18 mm	17 mm
F12F3	0,090 g	-	-	-
F12F4	0,074 g	-	-	-
F12F5	0,053 g	-	-	-
F12F6	0,028 g	-	-	-
F12F7	0,148 g	-	-	-
F13F1	0,101 g	-	-	-
F13F2	0,131 g	-	-	-

(continuação)

F13F3	0,087 g	-	-	-
F13F4	0,060 g	15 mm	-	-
F13F5	0,029 g	12 mm	16 mm	-
F13F6	0,020 g	-	-	-
F13F7	0,027 g	11 mm	-	-
F14F1	0,050 g	17 mm	10 mm	-
F14F3	0,019 g	-	-	-
F14F4	1,186 g	18 mm	-	-
F14F5	0,014 g	-	-	-
F14F6	0,070 g	-	-	-
F14F7	0,010 g	-	-	-
F15F1	0,115 g	17 mm	20 mm	20 mm
F15F2	0,063 g	-	-	-
F15F3	0,177 g	10 mm	-	-
F15F4	0,050 g	-	-	-
F15F7	0,036 g	-	-	-
F16F1	0,042 g	-	-	-
F16F3	0,045 g	14 mm	15 mm	-
F16F4	0,066 g	-	-	-
F16F6	0,118 g	-	-	-
F17F1	0,050 g	19 mm	16 mm	-
F17F3	0,031 g	-	-	-
F17F4	0,050 g	18 mm	-	-
F17F6	0,151 g	-	-	-
F18F1	0,016 g	-	-	-
F18F2	0,108 g	-	-	-
F18F3	0,068 g	-	-	-
F18F7	0,050 g	17 mm	-	-
F19F5	0,016 g	-	-	-
F20F3	0,014 g	-	-	-
F20F5	0,023 g	10 mm	-	-
F21F7	0,090 g	15 mm	-	-
F22F5	0,026 g	-	-	8 mm

(conclusão)

F23F2	0,165 g	-	-	-
F23F7	0,078 g	15 mm	-	-
F24F2	0,113 g	-	-	-
F25F2	0,030 g	16 mm	14 mm	-
F25F3	0,066 g	-	-	-
F26F1	0,013 g	-	-	-
F26F5	0,015 g	-	-	-
F27F1	0,013 g	-	-	-
F27F5	0,035 g	-	-	-
F27F7	0,044 g	-	-	-
F28F1	0,032 g	-	-	-
F28F5	0,012 g	-	-	-
F28F6	0,074 g	-	-	-
F29F7	0,066 g	-	-	-
F30F2	0,012 g	-	-	-
F30F7	0,045 g	-	-	-
F30F4	0,023 g	-	-	-
F31F5	0,050 g	-	-	-
F31F6	0,035 g	10 mm	16 mm	-
F32F2	0,072 g	-	-	-
F33F1	0,093 g	-	-	-
F33F4	0,014 g	12 mm	-	-
F33F5	0,141 g	-	-	-
F33F6	0,080 g	-	-	-
F34F1	0,023 g	-	-	-
F34F6	0,080 g	-	-	-
F34F7	0,020 g	-	-	-
F35F2	0,010 g	10 mm	-	-
F35F3	0,059 g	-	-	-
F35F4	0,050 g	-	-	-
F35F6	0,019 g	-	-	-
F35F7	0,050 g	8 mm	-	-