

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS
NÍVEL DOUTORADO**

MICHELLE ROSE DE OLIVEIRA SILVA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
LAGUNCULARIA RACEMOSA (L.) GAERTN.: PRODUÇÃO,
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**RECIFE
2009**

MICHELLE ROSE DE OLIVEIRA SILVA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA*
(L.) GAERTN.: PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA
COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE
FUNGOS COMO PARTE DOS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.

ORIENTADORA: PROF^a DR^a NORMA BUARQUE DE GUSMÃO

**RECIFE
2009**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Michelle Rose de Oliveira

Diversidade de fungos endofíticos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn: produção, isolamento e identificação da substância com atividade antimicrobiana/ Michelle Rose de Oliveira Silva–Recife: O Autor, 2013.

101 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2013.**

Inclui bibliografia

- 1. Fungos 2. *Laguncularia racemosa* 3. Antimicrobianos I.
Gusmão, Norma Buarque de (orientadora) II. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 243

MICHELLE ROSE DE OLIVEIRA SILVA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.)
GAERTN.: PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA COM
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR.

BANCA EXAMINADORA

RECIFE, 01 DE JULHO DE 2009.

PROF^a DR^a MARIA APARECIDA RESENDE, UFMG
TITULAR EXTERNO

PROF^a DR^a LOURINALDA LUIZA DANTAS SILVA SELVA DE OLIVEIRA, UFRPE
TITULAR EXTERNO

PROF^a DR^a GALBA MARIA DE CAMPOS TAKAKI, UNICAP
TITULAR EXTERNO

PROF^a DR^a OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES, UFPE
TITULAR INTERNO

PROF^a DR^a NORMA BUARQUE DE GUSMÃO, UFPE
ORIENTADORA

PROF^a DR^a REJANE PEREIRA NEVES, UFPE
SUPLENTE INTERNO

DR^a PATRÍCIA MENDES DE SOUZA, UNICAP
SUPLENTE EXTERNO

“A todos que depositaram em mim a confiança que por muitas vezes
perdi...”

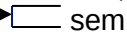
LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do taxol, um agente antitumor.	18
Figura 2. Estrutura da artemisina, um agente antimalárico.	18
Figura 3. Proporção de novos metabólitos entre os fungos endofíticos e do solo.	19
Figura 4. Estuário do rio Paripe.	23
Figura 5. Folhas e flores de <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) Gaertn.	25
Figura 6. Pecíolo e glândulas de sal em <i>L. racemosa</i> (detalhe da glândula ←).	26
Figura 7. Estrutura química das xilocetales e as diferentes variações de A - H	29
Figura 8. Eniatina G de <i>Halosarpheia ratnarigiensis</i> 732.	30
Figura 9. Dipeptídeos de <i>Verruculina enalia</i> 2606.	30
Figura 10. Estrutura dos pentapeptídeos (A e B) do fungo não-identificado 2524.	31
Figura 11. Estrutura química das isocumarinas avicennina A e B e vermipirona (V).	31
Figura 12. Cloro-monoterpeno do fungo <i>Tryblidiopycnis</i> sp. 4275.	32
Figura 13. Triterpenos do fungo <i>Phomopsis</i> sp. HKI0458.	32
Figura 14. Antraquinonas (1-7) isoladas do fungo <i>Halorosellinia</i> sp. 1403.	33
Figura 15. Antraquinonas do fungo <i>Paecilomyces</i> sp.	34
Figura 16. Paeciloxantona do fungo <i>Paecilomyces</i> sp.	34
Figura 17. Alcalóides dos fungos endofíticos não-identificados 1924 e 3893.	35
Figura 18. Cromonas do fungo <i>Paecilomyces</i> sp.	35
Figura 19. Bacilosporinas C (2) e D (1) do fungo <i>Paecilomyces</i> sp.	36

CAPÍTULO I DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

Figura 1. Dendograma de similaridade pelo índice de Jaccard.	62
Figura 2. Dendograma de similaridade pelo coeficiente de Morisita-Horn.	62

CAPÍTULO II ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

Figura 1. Cromatogramas do extrato bruto obtido da linhagem de *Paecilomyces variotii* FEL32: A) Revelação biológica frente a *B. subtilis*; B) Revelação em Iodo, mancha de Rf 0,48 (1); C) Revelação em UV, mancha de Rf 0,70 (2). →  sem crescimento. 83

CAPÍTULO III ISOLAMENTO DE VIRIDITOXINA DE *PAECILOMYCES VARIOTII*, UM ENDOFÍTICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

Figura 1. Estrutura molecular de viriditoxina. 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das áreas de manguezal no litoral de Pernambuco.	22
--	----

CAPÍTULO I DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

Tabela 1. Frequência de colonização dos fungos endofíticos de <i>Laguncularia racemosa</i> .	61
---	----

CAPÍTULO II ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos de <i>Laguncularia racemosa</i> .	81
--	----

CAPÍTULO III ISOLAMENTO DE VIRIDITOXINA DE *PAECILOMYCES VARIOTII*, UM ENDOFÍTICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

Tabela 1. Lista das bactérias usadas para o teste de atividade antimicrobiana.	100
---	-----

Tabela 2. Valores da CMI e da CMB da substância viriditoxina frente às bactérias.	101
--	-----

RESUMO

Fungos endofíticos são reconhecidos pela sua relevância ecológica, habilidade para produzir metabólitos secundários com diferentes estruturas químicas e importância biotecnológica. A proposta deste trabalho foi estimar a riqueza, abundância e diversidade dos fungos endofíticos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn., bem como avaliar a atividade antibacteriana e isolar o princípio ativo. As folhas de *L. racemosa* foram coletadas no estuário do rio Paripe, Vila Velha, Itamaracá, Pernambuco. Setenta linhagens de fungos endofíticos foram obtidas a partir de 140 fragmentos de folhas, resultando numa colonização de 50%. A espécie *Paecilomyces variotii* foi a mais representativa com 19,3% de colonização, seguida por *Mycelia Sterilia* (8,6%), *Penicillium* sp. (7,2%), *Trichoderma* sp. (5%) e *Aspergillus niger* (4,3%) e espécies que foram pouco expressivas como *Fusarium* sp., *Guignardia bidwellii* e Basidiomycota com 1,4%, enquanto *Curvularia pallescens* e *Periconia* sp. com 0,7%. O teste de atividade antibacteriana foi realizado pelo método de difusão em disco de papel e, dentre as 70 linhagens de fungos, apenas 34 (48,6%) foram capazes de produzir metabólitos secundários com atividade antibacteriana. *Micrococcus luteus* foi o microrganismo mais sensível, seguido por *Bacillus subtilis* (10 a 23,5 mm), *Staphylococcus aureus* (10 a 21 mm), *Enterococcus faecalis* (10,5 a 20 mm) e *Escherichia coli* (10,5 a 16,75 mm). O extrato bruto de *P. variotii* FEL32 foi submetido à cromatografia e camada delgada usando o sistema de solvente AcOEt:MeOH (9:1,v/v) e resultou em duas bandas de R_f 0,48 e 0,70. A bioatividade frente à *B. subtilis* foi confirmada ao redor das bandas. O extrato foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel eluído com CHCl₃/MeOH e o princípio ativo identificado por ressonância magnética nuclear e espectroscopia de massa, sendo identificada como viriditoxina (6-6'-binafto- α -pirona). A concentração mínima inibitória de viriditoxina resultou em valores de 0,5 μ g/mL para *Staphylococcus aureus*, 1 μ g/mL para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, 1 μ g/mL para *Micrococcus* sp. e 2 μ g/mL para *Enterococcus* sp. Nossos resultados confirmam o grande potencial dos fungos endofíticos, especialmente de ambiente estuarino. Este trabalho é o primeiro relato do isolamento de viriditoxina pelo fungo de ambiente estuarino *P. variotii*. Como perspectiva, muitos grupos de fungos de diferentes biomas estão esperando para serem explorados.

Palavras-chave: Diversidade; Fungos Endofíticos; Atividade Antibacteriana; Viriditoxina; Mangue

ABSTRACT

Endophytic fungi are recognized for your ecological relevance, ability to produce secondary metabolites with new chemical structures and biotechnological importance. The purpose of this work was to estimate the richness, abundance and diversity of the endophytic fungi from *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. as well as to evaluate the antibacterial activity and to isolate the active substance. The *L. racemosa* leaves were collected from the estuary of the Paripe river, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brazil. Seventy endophytic fungi strains were obtained from 140 leaf segments, resulting in 50% of colonization. *Paecilomyces variotii* specie was the most representative with 19.3% of occurrence frequency, followed by *Mycelia Sterilia* (8.6%), *Penicillium* sp. (7.2%), *Trichoderma* sp. (5%) e *Aspergillus niger* (4.3%) and species little expressive such as *Fusarium* sp., *Guignardia bidwellii*, Basidiomycota with 1.4% and *Curvularia pallescens*, *Periconia* sp. with 0.7%. The preliminary antibacterial activity was performed by disk diffusion assay and pointed that among 70 fungal strains, only 34 (48.6%) were able to produced secondary metabolites with antibacterial activity. *Micrococcus luteus* was the most sensitive microorganism, with inhibition zones ranging from 13.5 to 35.0 mm diameter, followed by *Bacillus subtilis* (10.0 to 23.5 mm), *Staphylococcus aureus* (10.0 to 21 mm), *Enterococcus faecalis* (10.5 to 20 mm) and *Escherichia coli* (10.5 to 16.75 mm). The crude extract from *P. variotii* FEL32 was submitted to thin layer chromatography using the solvent system EtOAc:MeOH (9:1,v/v) and yielded two spots of Rf 0.48 and 0.70. The bioactivity for both spots was confirmed against *B. subtilis*. So, the extract was chromatographed over silica gel column eluted with CHCl₃:MeOH and the active substance was identified by nuclear resonance magnetic and mass spectroscopy, as viriditoxina (6,6' binaphtho- α -pyrone). Minimal inhibitory concentration (MIC) of viriditoxin towards pathogenic bacteria was evaluated by microdilution and presented values of 0.5 μ g/mL for *Staphylococcus aureus*, 1 μ g/mL for *Staphylococcus* sp. coagulase negative, 1 μ g/mL for *Micrococcus* sp. and 2 μ g/mL for *Enterococcus* sp. Our results confirm the great potential of the endophytic fungi especially from estuarine environmental. This work is the first report in the isolation of viriditoxin by mangrove endophytic fungus *P. variotii*. In perspective, many groups of fungi in different biotopes are waiting to be explored.

Keywords: Diversity; Endophytic Fungi; Antibacterial Activity; Viriditoxin; Mangrove

SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Revisão de Literatura	15
2.1 Interação Planta x Fungo	15
2.2 Ecossistema Manguezal	20
2.2.1 O Mangue <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) Gaertn.	24
2.3 Diversidade de Fungos Endofíticos em Ambiente Estuarino	26
2.4 Metabólitos dos Fungos Endofíticos de Ambiente Estuarino	29
Referências	38
CAPÍTULO I DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM <i>LAGUNCULARIA RACEMOSA</i> (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)	
1. Introdução	48
2. Material e Métodos	50
2.1 Local de Coleta	50
2.2 Isolamento dos Fungos Endofíticos	50
2.3 Identificação dos Fungos Endofíticos	51
2.4 Análise Estatística dos Dados	51
3. Resultados e Discussão	53
4. Referências	58
CAPÍTULO II ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>LAGUNCULARIA RACEMOSA</i> (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)	
1. Introdução	65
2. Material e Métodos	68
2.1 Fungos Endofíticos	68
2.2 Condições de Cultivo	68
2.3 Obtenção dos Extratos brutos	69
2.4 Microrganismos-teste	69
2.5 Teste de Atividade Antimicrobiana	70
2.6 Biocromatografia	70
3. Resultados e Discussão	72
4. Conclusão	76

5. Referências	77
----------------	----

CAPÍTULO III ISOLAMENTO DE VIRIDITOXINA DE *PAECILOMYCES VARIOTII*, UM ENDOFÍTICO DE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN. (MANGUE-BRANCO, COMBRETACEAE)

1. Introdução	86
2. Material e Métodos	88
2.1 Fungo Endofítico	88
2.2 Condições de cultivo	88
2.3 Extração e Obtenção do Extrato Bruto	89
2.4 Pré-Purificação do Extrato Bruto	89
2.5 Isolamento e identificação de Viriditoxina	90
2.6 Ensaio Antimicrobiano	91
3. Resultados e Discussão	92
4. Referências	96

1 INTRODUÇÃO



As plantas podem servir como reservatório para inúmeros microrganismos conhecidos como endofíticos. Por definição, esses organismos estão presentes no interior dos tecidos e órgãos das plantas sem causar sintomas de doença (PETRINI, 1991; WILSON, 1995). A associação entre os microrganismos endofíticos e as plantas é mutualística, onde os endofíticos obtêm nutrientes e proteção das plantas hospedeiras, enquanto estas são beneficiadas pelos seus metabólitos protegendo-as contra a herbivoria e ao ataque por fungos, bactérias e outros organismos patógenos. Vários endofíticos podem, ainda, auxiliar na fixação do nitrogênio, produção de fitohormônios, armazenamento de nutrientes e água, aumentando assim, a tolerância da planta hospedeira a ambientes inóspitos. (PEREIRA, 1993; ARAÚJO, 1996; AZEVEDO, 1998; NEJAD e JOHNSON, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2001; OMACINE *et al.*, 2001; REDMAN *et al.*, 2002).

Dentre os microrganismos endofíticos, os fungos têm de destaque pela sua diversidade metabólica e capacidade em colonizar diferentes hospedeiros. A variedade de metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos ainda não foi estimada, mas acredita-se que seja alta dada a versatilidade adaptativa desses microrganismos. Eles podem ser encontrados em regiões biogeográficas distintas, de clima temperado a tropical e, ainda, em ambientes inóspitos tais como ártico, desertos, pântanos e estuários (RODRIGUES e PETRINI, 1997; COSTA, 2003).

Nos últimos anos, a ocorrência de bactérias resistentes aos principais antibióticos disponíveis no mercado tem aumentado, havendo inclusive relatos de casos isolados com resistência múltipla. Devido à amplitude e frequência, a resistência aos antimicrobianos é considerada uma questão emergente e

significativa para a saúde pública, e o principal motivo para que novas alternativas sejam criadas e novos métodos utilizados na busca por compostos de atividade antimicrobiana (PELÁEZ, 2006).

Atualmente, os pesquisadores têm direcionado atenção especial aos fungos endofíticos de origem marinha. Estes microrganismos são particularmente atraentes porque ainda não foram muito explorados e possuem uma grande capacidade de produzir substâncias bioativas, devido às particularidades do ambiente de origem tais como salinidade, temperatura, oxigênio, disponibilidade de nutrientes e diversidade de substratos (JAITLEY, 1987; JONES e ALIAS, 1997; ZHANG *et al.*, 2005).

De acordo com SRIDHAR (2004) os fungos de ambiente estuarino representam o maior grupo entre os fungos marinhos e, embora esse ecossistema seja conhecido por sua alta produtividade, estudos pertinentes à microbiota são recentes e pouco se conhece a respeito do potencial biotecnológico dos fungos endofíticos de ambiente estuarino no Brasil.

Devido à grande importância desse ecossistema para o equilíbrio do ambiente aquático, faz-se necessário o isolamento e a caracterização desses microrganismos quanto à produção de metabólitos secundários para melhor entender a relação fungo/planta além de possibilitar a descoberta de novas substâncias de interesse tecnológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA



2.1 INTERAÇÃO PLANTA X FUNGO

De acordo com a etimologia da palavra, endofítico vem do grego (*éndon* + *phytón*) e significa dentro da planta. Esse termo compreende todos os organismos, como as bactérias, fungos, algas, vírus, insetos que vivem de forma mutualística com a planta hospedeira. Entretanto, a aplicabilidade do termo endofítico é direcionada principalmente para bactérias e fungos (SCHULZ e BOYLE, 2005).

As primeiras observações acerca dos microrganismos endofíticos foram feitas por Bary (1866) que os definiu como sendo “um organismo vivendo dentro de outro organismo”. Entretanto, essa definição se mostrou incapaz de diferenciá-los dos organismos patogênicos e, anos mais tarde, Petrini (1991) descreveu os fungos endofíticos, como: “microrganismos que colonizam os tecidos sadios das plantas em algum período do seu ciclo de vida, sem causar doenças ou danos aparente ao hospedeiro”.

Ainda, de acordo com Azevedo (1998) e Souza *et al.* (2004), os microrganismos endofíticos podem se distinguir dos epífitos que vivem nas superfícies dos vegetais e dos fitopatógenos que causam doenças. No entanto, a distinção entre endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos é utilizada apenas para fins didáticos, pois um dado microrganismo pode permanecer na superfície, sendo assim considerado epifítico, antes de penetrar nos tecidos da planta e tornar-se endofítico e em seguida devido à ocorrência de algum desequilíbrio se comportar como fitopatógeno (WHITE *et al.*, 1990; PARNISKE, 2000; PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002).

Entre os microrganismos endofíticos, os fungos possuem uma representatividade significativa. Esses organismos são isolados dos mais diversos tipos vegetais, como: as plantas herbáceas, as de florestas tropicais e temperadas, as medicinais, as cultivadas e, ainda, as aquáticas (MELNROY e KLOEPPER, 1995; HUANG *et al.*, 2001; STROBEL, 2002; CHEN *et al.*, 2003; TAECHOWISAN *et al.*, 2003). Como resultado, centenas de isolados podem ser obtidos de uma única planta, confirmando a importância ecológica dos fungos endofíticos na diversidade microbiana.

A análise de qualquer material vegetal pode resultar na descoberta de fungos endofíticos e provavelmente algumas espécies apresentam especificidade de hospedeiro. Por outro lado, alguns fungos endofíticos não exibem especificidade de hospedeiro e são, portanto, obtidos de plantas pertencentes a diferentes grupos e encontradas em localizações geográficas distintas. Fatores ambientais tais como solo, temperatura e umidade afetam diretamente a natureza e a dinâmica da população dos endofíticos (OWEN e HUDLEY, 2004).

Os fungos endofíticos, com exceção dos transmitidos de geração a geração através das sementes (transmissão vertical), penetram primariamente pela da zona radicular e também através dos esporos dispersos no ar, utilizando-se de aberturas naturais como os estômatos e lenticelas presentes nas plantas (transmissão horizontal) (KOBAYASHI e PALUMBO, 2000; CLAY e SCHARDL, 2002; SAIKKONEN *et al.*, 2004; MARINHO *et al.*, 2005; JOHRI, 2006). Uma vez instalado na planta hospedeira, os fungos endofíticos podem permanecer próximos ao local de entrada ou serem disseminados via sistema

vascular alojando-se intra ou intercelularmente (BACON e WHITE, 2000; ZINNIEL *et al.*, 2002).

Segundo Schulz e Boyle (2005), os fungos endofíticos podem ser divididos basicamente em dois grupos ecológicos: os balansiaceus ou endofíticos de gramíneas e os não-balansiaceus. O primeiro grupo compreende espécies de *Epichloë* e *Balansia* que são relacionadas e necessitam de requerimentos ecológicos e adaptações distintas em relação a outros grupos de fungos. Devido a sua relevância ecológica, costumam servir de modelos para o entendimento da interação endofítico/hospedeiro (PETRINI, 1996; BACON e WHITE, 2000). Enquanto que, o grupo dos fungos não-balansiaceus é bastante diversificado e formado por diversas espécies pertencentes aos *Ascomycetes* e *Deuteromycetes* (formas anamórficas). Até então, são isolados de todos os órgãos e tecidos das plantas e a sua colonização pode ser intra ou intercelular. Os gêneros mais comumente encontrados são *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora* e *Xylaria* (ARNOLD, 2000; STONE *et al.*, 2004; PIMENTEL *et al.*, 2006).

A função biológica dos fungos endofíticos com relação ao hospedeiro ainda é pouco entendida, mas acredita-se que muitas propriedades medicinais de certas plantas podem estar relacionadas com metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos (YANG *et al.*, 1994; STROBEL *et al.*, 1997; BAKER *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001; STROBEL e DAISY, 2003).

Um exemplo de metabólito secundário com importância biotecnológica produzido por um fungo endofítico é o taxol (Figura 1). Esse composto é utilizado no combate ao câncer de útero e foi previamente obtido das plantas

do gênero *Taxus*, no entanto, vários trabalhos têm identificado a produção dessa substância por fungos endofíticos como *Alternaria*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces* e *Taxomyces* (STIERLE *et al.*, 1995; STROBEL *et al.*, 1996; SERAFINI *et al.*, 2002).

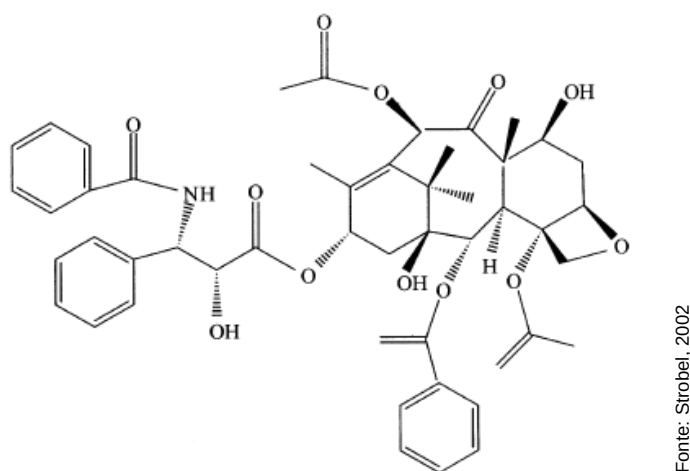


Figura 1. Estrutura química do taxol, um agente antitumor.

Da mesma forma, Lu *et al.* (2000) demonstraram que uma linhagem endofítica do fungo *Colletotrichum* é capaz de sintetizar a substância artemisina (Figura 2), que possui atividade antimalárica proveniente da planta medicinal *Artemisia annua*.

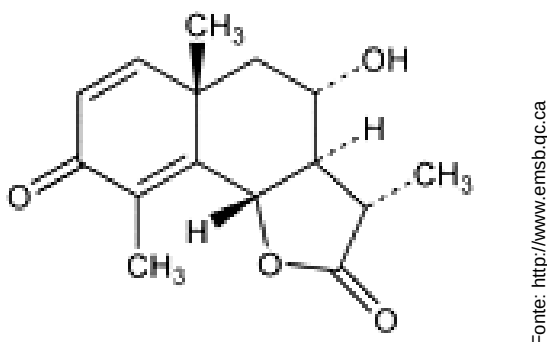


Figura 2. Estrutura da artemisina, um agente antimalárico.

A população brasileira tradicionalmente utiliza as plantas medicinais para tratamentos das enfermidades e políticas governamentais têm incentivado o isolamento e a determinação da atividade biológica das substâncias produzidas pelos fungos endofíticos dessas plantas. Na Tailândia, Wiyakrutta *et al.* (2004), isolaram fungos endofíticos de plantas medicinais capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, anticancerígena e antimalárica.

Yandry *et al.* (2006) observaram a atividade antagônica dos fungos endofíticos de plantas medicinais do Equador frente a várias bactérias patogênicas. E, ainda, outros autores ressaltam o grande potencial dos fungos endofíticos na síntese de metabólitos bioativos (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2005; PHONGPAICHIT *et al.*, 2006; KUMALA *et al.*, 2006).

Na Figura 3 é possível observar uma comparação entre o percentual de novas estruturas isoladas de fungos endofíticos e de fungos de solo, o primeiro apresenta 51%, enquanto que os fungos de solo apresentam somente 38% (SCHULZ *et al.*, 2002). A diversidade de metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos estimulam ao isolamento e caracterização de substâncias que possam ter aplicabilidade farmacêutica.

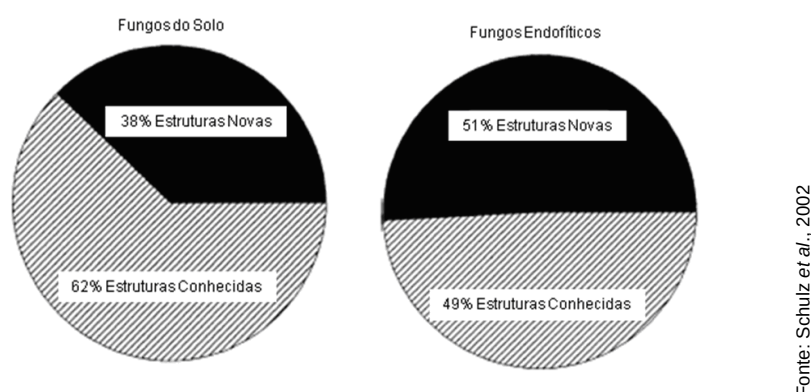


Figura 3. Proporção de novos metabólitos entre os fungos endofíticos e do solo.

2.2 O ECOSSISTEMA MANGUEZAL

O termo manguezal é empregado para descrever um ecossistema costeiro, de transição entre o ambiente terrestre e zona entre marés (água doce e marinha), característicos de regiões tropicais e subtropicais onde as populações de plantas interagem entre si em uma determinada área geográfica (BARROS *et al.*, 2000; SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000).

A palavra mangue é usada para designar um grupo de espécies vegetais arbóreas ou arbustivas que compartilham características fisiológicas e adaptações especiais, permitindo suportarem longos períodos de exposição em água, alta salinidade, baixo teor de oxigênio e substratos inconsolidados (SCHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 2000).

Os mangues são conhecidos desde os tempos antigos em que se relatam a ocorrência de *Rhizophora* em manguezais do mar Vermelho e no golfo Pérsico. Kathiresan e Bingham (2001) citam que *Avicennia* e *Rhizophora* foram provavelmente os primeiros gêneros encontrados em áreas estuarinas.

Tomlinson (1986) na sua obra *The Botany of Mangroves* reconhece dois principais grupos de mangues: as espécies de mangue propriamente dita e as espécies associadas ao manguezal. No primeiro grupo é possível verificar algumas características fundamentais para o estabelecimento e a sobrevivência dessas espécies vegetais ao ambiente estuarino tais como ocorrem exclusivamente nos manguezais, desempenham papel fundamental na estrutura da comunidade, possuem especializações morfológicas como raízes aéreas, mecanismos de troca gasosa e glândulas de excreção de sal, além de terem reprodução vivípara. O segundo grupo compreende espécies

vegetais que habitam as proximidades dos manguezais, porém não possuem estruturas especializadas que lhes dão suporte e condições de sobrevivência.

O ecossistema manguezal, segundo Valiela *et al.* (2001), ocupa $1,7 \times 10^3 \text{ Km}^2$ da costa mundial. Entretanto, estima-se que a perda desse território é de aproximadamente 35% desde 1980, e que a taxa de perda por ano seja de 2,1% para a maioria dos continentes e de 3,6% para as Américas, em consequência do aumento da ação antrópica. O interessante é que esta perda excede o que se observa para os recifes de corais e as florestas temperadas, dois ambientes considerados altamente ameaçados nos dias de hoje. E referem que o Brasil abriga 10% dos manguezais do planeta, numa área que corresponde aproximadamente a 13.400 Km^2 . Estende-se desde o Cabo Orange, ao norte até o estado de Santa Catarina, ao sul. No entanto, a vegetação apresenta uma maior concentração ao longo da costa do Amapá, Pará e Maranhão, constituindo 85% dos manguezais brasileiros (HERTZ, 1991; BARROS *et al.*, 2000).

As florestas dos manguezais brasileiros são compostas basicamente por três gêneros: *Avicennia* (Avicenniaceae), *Laguncularia* (Combretaceae) e *Rhizophora* (Rhizophoraceae), podendo existir ainda representantes do gênero *Conocarpus* (Combretaceae) encontrados nas bordas das florestas, em ambiente denominado restinga (BARROS *et al.*, 2000).

O estado de Pernambuco, devido a sua posição geográfica, apresenta uma das menores faixas litorâneas da costa brasileira. Uma área de 23.973 há é ocupada por florestas de mangues e a maioria encontra-se localizadas nos municípios de Goiânia, Igarassu, Itamaracá e Itapissuma, nas margens do canal de Santa Cruz (Tabela 1) (BARROS *et al.*, 2000).

Tabela 1. Distribuição das áreas de manguezal no litoral de Pernambuco.

Denominação	Área (ha)	Rios Principais	Municípios
Estuário dos rios Goiana e Megaó	4.776	Goiana/Megaó	Goiana
Estuário do rio Itapessoca	3.998	Itapessoca	Goiana
Estuário Jaguaribe	212	Jaguaribe	Itamaracá
Complexo Estuarino do Canal de Santa Cruz	5.292	Igarassu-Botafogo-Maniquara-Arataka	Itamaracá-Itapissuma-Igarassu-Goiana
Estuário do rio Timbó	1.397	Timbó-Aroio Desterro	Paulista-Abreu e Lima-Igarassu
Estuário do rio Paratibe	-	Paratibe-Fragoso	Pulista-Olinda
Estuário do rio Beberibe	-	Beberibe	Olinda-Recife
Estuário do rio Capibaribe	-	Capibaribe-Pina-Jordão-Tejipió-Jiquiá	Recife
Estuário dos rios Jaboatão e Pirapama	1.284	Jaboatão e Pirapama	Cabo e Jaboatão
Estuário dos rios Sirinhaém e Maracaípe	3.335	Sirinhaém-Maracaípe	Ipojuca - Sirinhaém
Estuário do rio Formoso	2.724	Formoso-Dos Passos-Ariquindá	Sirinhaém - Rio Formoso
Estuário do rio Mamucabas e Ilhetas	402	Mamucabas e Ilhetas	Tamandaré e Barreiros
Estuário do rio Una	553	Una	Barreiros - São José da Coroa Grande
Total	23.973*	-	-

*Fonte: Proteção de Áreas Estuarinas - FIDEM (1996).

O complexo estuarino do canal de Santa Cruz é do tipo ribeirinho e recobre uma área de aproximadamente 5.292 ha, a vegetação em constituída em sua maioria por três espécies: *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* (SILVA, 1995). Segundo Medeiros (1996), a floresta de mangue do estuário do rio Paripe (Figura 4), um dos mais

expressivos da área, tem uma densidade média-alta de 3.487 ind. ha⁻¹, sendo *R. mangle* a espécie mais representativa (74,3%), seguida por *L. racemosa* (19,9%) e *Avicennia schaueriana* (5,8%) e uma pequena participação de *Conocarpus erectus*, *Dalbergia ecastophyllum*, *Annona glabra* e, ainda, várias espécies pertencente as famílias Poaceae e Cyperaceae (LACERDA, 1994; COSTA, 2003).



Fonte: Michelle O. Silva, 2005

Figura 4. Estuário do rio Paripe.

O estuário do canal de Santa Cruz enfrenta graves problemas ambientais decorrentes da poluição industrial e ainda convive com grandes cargas de dejetos lançadas pelas indústrias da região. Atualmente, a poluição por esgotos domésticos, a pesca predatória e a ocupação desordenada do solo contribuem para um maior nível de degradação da área (Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos - CPRH).

Os manguezais são ecossistemas de grande importância no equilíbrio das regiões tropicais. Sua principal importância é servir de berçário para várias espécies de animal, incluindo crustáceos, peixes e moluscos, bem como ser responsável pelo fornecimento de matéria orgânica para o ambiente marinho.

Além disso, representam uma área de grande interesse para população, em virtude da sua importância sócio-econômica, principalmente pelos seguintes aspectos: 1) exclusividade da sua flora; 2) beleza estética e potencial como atrativo turístico; 3) produção pesqueira; 4) fornecimento de madeira e combustível e 5) uso na medicina popular no combate a várias enfermidades (BARROS *et al.*, 2000). A destruição dos manguezais pode ocasionar mudanças globais como o aumento do nível do mar e da erosão, dificultando a estabilidade dos sedimentos (VALIELA *et al.*, 2001).

2.2.1 O MANGUE *LAGUNCULARIA RACEMOSA* (L.) GAERTN.

Pertencente à família Combretaceae, *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. é conhecida vulgarmente como mangue-branco (Figura 5). Sua distribuição dá-se principalmente ao longo da costa tropical e subtropical das Américas do Norte e do Sul e com menor frequência na África Ocidental (TOMLINSON, 1986; BARROS *et al.*, 2000).

Conforme citado no item 2.2, *L. racemosa* é a segunda espécie vegetal mais representativa nos manguezais brasileiros. No geral, é possível encontrá-la no interior dos manguezais bem como ao longo dos estuários, principalmente na interface entre a terra firme e o manguezal, e nas margens dos rios e ilhotas. É possível, ainda, localizá-la em solos elevados onde as inundações pelas marés são menos frequentes. Nestas áreas *L. racemosa* geralmente está associada com o mangue-preto *Avicennia* (JIMÉNEZ, 1981; BARROS *et al.*, 2000).



Figura 5. Folhas e flores de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.

Dentre todas as espécies de mangue, *L. racemosa* é a que apresenta menor tolerância a baixas temperaturas, ao contrário das espécies de *Rhizophora* e de *Avicennia*. Entretanto, suporta uma ampla faixa de salinidade, porém prefere ambientes com baixa concentração de sal (15 a 20‰) e apresenta crescimento reduzido em locais de salinidade acima de 50‰ (LUGO e SNEKADER, 1974; JIMÉNEZ, 1981).

De forma a contornar as características inóspitas do ambiente estuarino, *L. racemosa* possui adaptações morfofisiológicas que garantem a sua sobrevivência e reprodução nos manguezais. As suas raízes, denominadas pneumatóforos, possuem geotropismo negativo em função do fluxo de marés, promovendo a oxigenação dos tecidos no solo alagado. Além disso, têm lenticelas que auxiliam na troca gasosa entre a planta e o meio externo (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

As folhas apresentam pecíolos curtos e avermelhados e uma estrutura especializada em eliminar o excesso de sal, denominadas glândulas de sal (Figura 6). As folhas e as cascas de *L. racemosa* possuem de 10 a 24% de seu peso seco constituídos por taninos hidrolisáveis sendo utilizados principalmente

como pigmento e na indústria de curtume. O caule, devido às propriedades adstringentes e tônicas é utilizado na medicina popular para fazer infusões no combate à disenteria, além de fornecer madeira para construção de casas pela população local e utilização como combustível (CORREA, 1978; DUKE e WAIN, 1981).



Figura 6. Pecíolo e glândulas de sal em *L. racemosa* (detalhe da glândula ←).

2.3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM AMBIENTE ESTUARINO

O ambiente determina a habilidade de sobrevivência, a adaptabilidade e o estabelecimento de microrganismos ao local que habita. Fatores bióticos e abióticos influenciam isoladamente ou em combinação para sobrevivência da microbiota. A temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e diversidade de substratos são fatores que também podem influenciar a composição de fungos no ambiente (JAITLEY, 1987; JONES e ALIAS, 1997).

Os mangues apresentam adaptações em resposta a um habitat com alta salinidade, solo anaeróbico, fluxo de marés e alta competição microbiana. A associação dos fungos endofíticos com as plantas do manguezal confere proteção ao ambiente adverso e permite a competitividade dos mesmos com os fungos decompositores (KUMARESAN e SURYANARAYANAN, 2002).

Na Índia, Rai *et al.* (1981) isolaram 87 fungos endofíticos da casca de plantas de manguezais e observaram a predominância dos *Deuteromycetes*. Dentro deste grupo, o gênero *Aspergillus* foi o mais freqüente, seguido por *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Estudos com 25 fungos endofíticos de mangues na Índia demonstraram que *Chaetomium termophilum* var. *coprophilum* e *Rhizomucor pusillus* apresentaram um alto grau de tolerância ao pH, enquanto *Aspergillus niveus*, *A. terreus* e *Emericella nidulans* var. *lata* foram poucos tolerantes (JAITLEY e RAÍ, 1982; JAITLEY, 1987).

No relato de Suryanarayanan e Kumerasan (2000), os gêneros *Colletotrichum*, *Phomopsis* e *Phyllosticta* foram os mais comuns isolados das plantas associadas ao manguezal, *Acanthus ilicifolius*, *Arthrocnemum indicum*, *Suaeda maritima* e *Sesuvium portucalastrum*. Os gêneros *Phomopsis* sp. e *Phyllosticta* sp. foram comuns em todas as plantas, mas alguns gêneros mostraram especificidade de hospedeiro, como *Acremonium* sp. para *S. portucalastrum*; *Cladosporium* sp. para *S. maritima*; *Guignardia* sp. e *Fusarium* sp. para *Arthrocnemum indicum* e *Ampullifera* sp. para *Acanthus ilicifolius*.

A freqüência de fungos endofíticos pode, ainda, ser influenciada pela altitude, umidade, densidade, precipitação, especificidade e susceptibilidade do hospedeiro. A colonização pelos fungos endofíticos nas plantas do manguezal

Aegiceras corniculatum, *Avicennia marina*, *Avicennia officinalis*, *Bruguiera cylindrica*, *Ceriops decandra*, *Excoecaria agallocha* e *Lumnitzera racemosa* mostrou que várias espécies de endofíticos foram comuns, como *Acremonium* sp., *Alternaria* sp. e *Cladosporium cladosporioides* não apresentaram especificidade de hospedeiro e que, ainda, *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *Colletotrichum* sp. e *Paecilomyces* sp. foram os gêneros mais frequentes (Kumerasan e Suryanarayanan, 2001).

O isolamento de fungos endofíticos das folhas de *Bruguiera gymnorhiza* demonstrou a maior ocorrência e variedade destes microrganismos no período de chuva. Tal fato pode ser explicado devido à temperatura, à umidade, e a pouca incidência de raios solares neste período, enquanto que no verão, estes fatores possivelmente afetam a esporulação, germinação e disseminação destes microrganismos nas folhas (OKANE *et al.*, 2001).

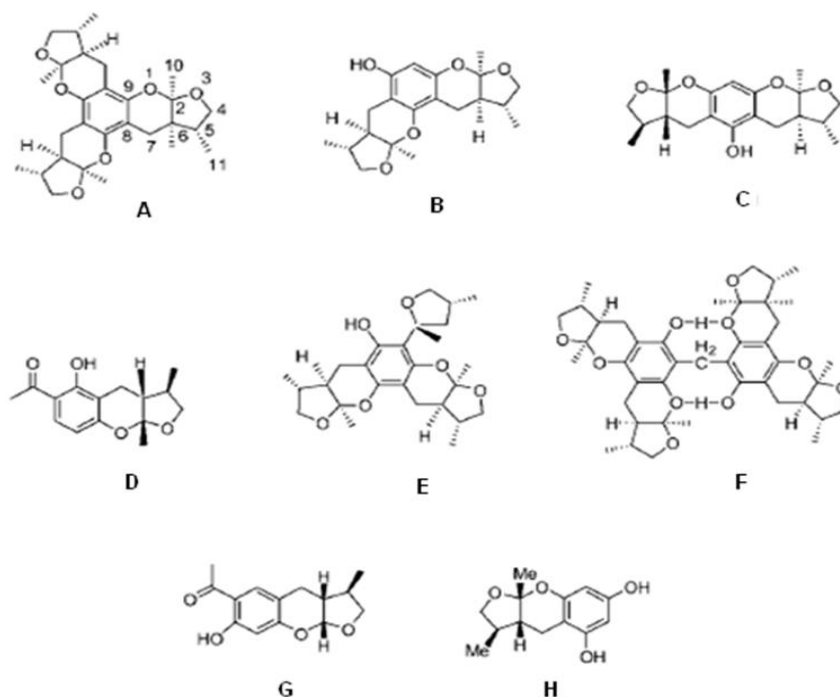
Ananda e Sridhar (2002) isolaram fungos endofíticos das raízes das plantas do manguezal na Índia, *Acanthus ilicifolius*, *Avicennia officinalis*, *Rhizophora mucronata* e *Sonneratia caseolaris*. Espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Zygosporium* foram os isolados mais comuns, bem como *Mycelia Sterilia*. Contudo, *Cladosporium* sp. foi específico para *S. caseolaris*; *Paecilomyces variotii* para *R. mucronata* e *Phoma* sp. para *A. ilicifolius*.

A observação de fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de *Rhizophora apiculata* constatou a presença dominante de *Pestalotiopsis* sp. em sementes; *Sporormiella minima* nos pecíolos e *Phialophora* sp. nas cascas, sugerindo especificidade destes fungos nos

diferentes tecidos e redução da competição entre estes microrganismos (KUMARESAN *et al.*, 2002).

2.4 METABÓLITOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE AMBIENTE ESTUARINO

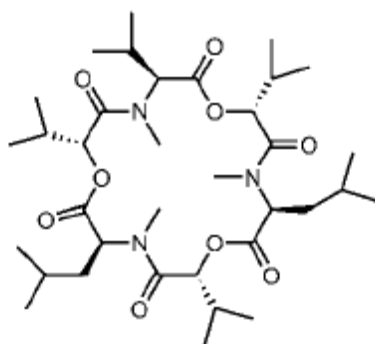
Alguns autores relatam o grande potencial dos fungos endofíticos de ambiente estuarino na síntese de novas substâncias. As xilocetales com as diferentes variações de A-H (Figura 7), compreende uma família de compostos contendo um grupo cetral obtidos do fungo *Xylaria* sp. 2508 isolado de uma planta do manguezal em Hong Kong (LIN *et al.*, 2001; KROHN e RIAZ, 2004; WU *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006). Xilocetal A mostrou ser um potente inibidor da acetilcolinesterase e xilocetal B bloqueia os canais de cálcio sendo, portanto, uma alternativa no tratamento da doença de Alzheimer (LIU *et al.*, 2006; ROMERO *et al.*, 2003).



Fonte: Pan, *et al.*, 2008

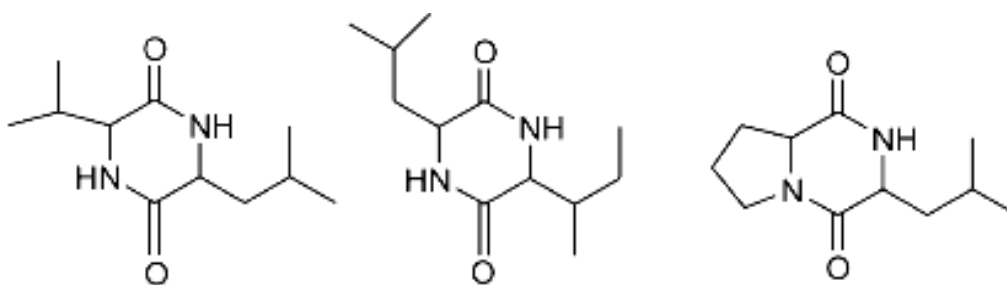
Figura 7. Estrutura química das xilocetales e as diferentes variações de A – H.

Os peptídeos cíclicos tais como o depsipeptídeo eniatina G (Figura 8) do fungo *Halosarpheia ratnagiriensis* 732 isolado do mangue na Tailândia, os ciclodipeptídeos de *Verruculina enalia* 2606 (Figura 9) (LIN *et al.*, 2002) e os pentapeptídeos (Figura 10) de uma linhagem não-identificada 2524 isolada das sementes de *Avicennia marina* que apresentam atividade citotóxica contra celular cancerígenas Bel-7402 (LI *et al.*, 2004).



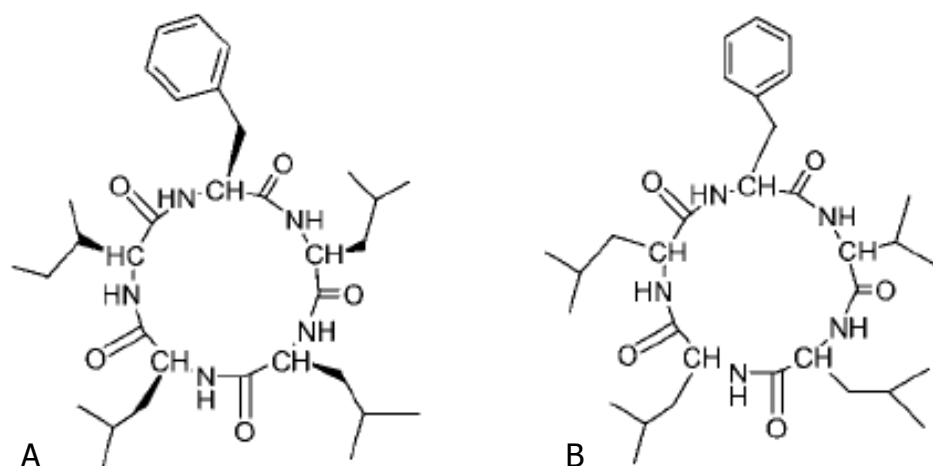
Fonte: Pan, *et al.*, 2008

Figura 8. Eniatina G de *Halosarpheia ratnagiriensis* 732.



Fonte: Lin, *et al.*, 2002

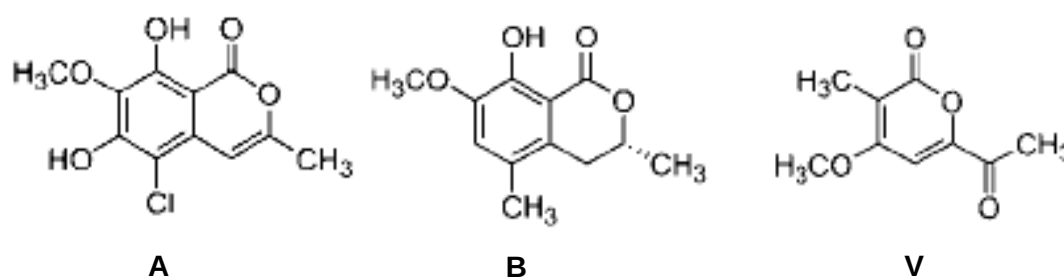
Figura 9. Dipeptídeos de *Verruculina enalia* 2606.



Fonte: Pan, et al., 2008

Figura 10. Estrutura dos pentapeptídeos (A e B) do fungo não-identificado 2524.

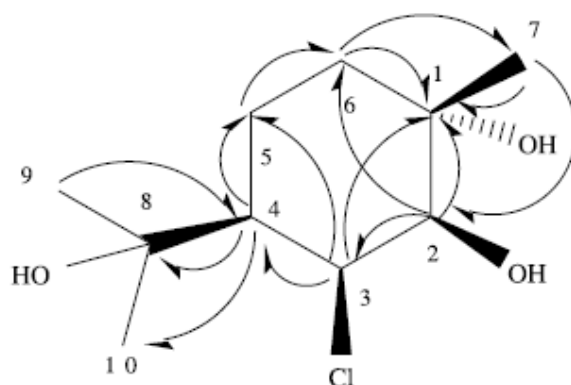
As isocumarinas possuem muitas propriedades biológicas, incluindo antifúngica, antitumoral, anti-alérgica, anti-inflamatória (BARRY, 1964). O fungo endofítico 2533 isolado por Lin *et al.* (2001) das folhas de *Avicennia marina* é um excelente produtor de isocoumarinas tais como avicennina A e B e, ainda, vermipirona (Figura 11).



Fonte: Pan, et al., 2008

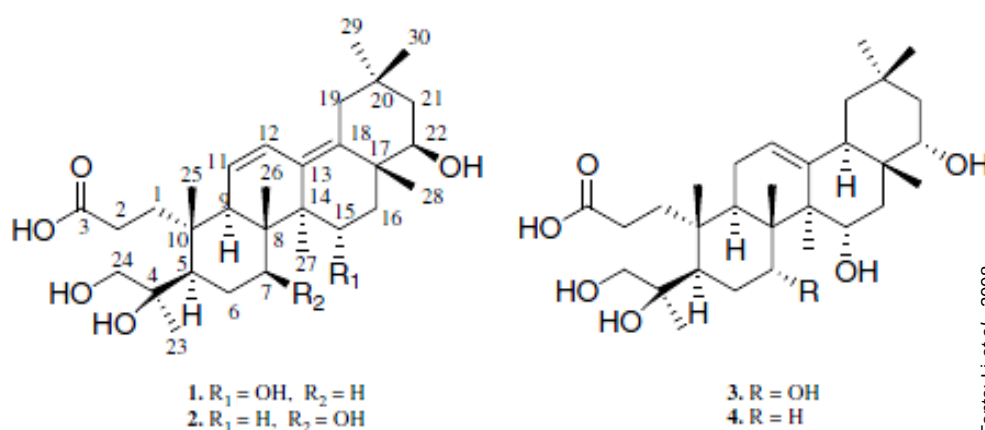
Figura 11. Estrutura química das isocumarinas avicennina A e B e vermipirona (V).

Na classe dos terpenos, foi obtido o cloro-monoterpeno (Figura 12) do fungo *Tryblidiopycnis* sp. 4275 isolado do tronco de *Kandelia candel* (HUANG *et al.*, 2006), os triterpenos (Figura 13) de *Phomopsis* sp. HKI0458 isolado de *Hibiscus tiliaceus* (LI *et al.*, 2008). De acordo com Li *et al.* (2008) os terpenos desempenham papel importante na proteção da planta hospedeira contra as infecções microbianas.



Fonte: Huang, *et al.*, 2006

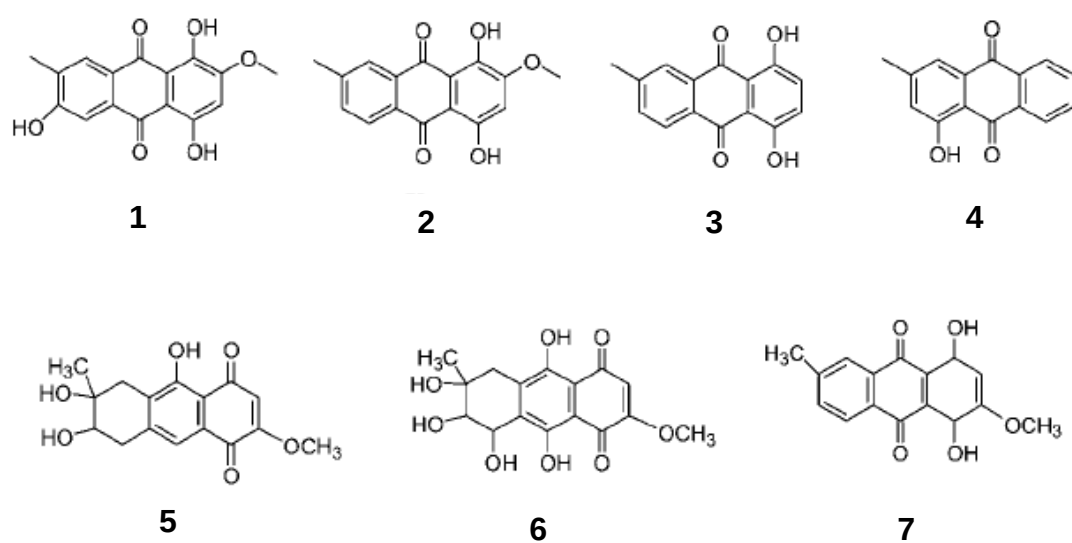
Figura 12. Cloro-monoterpeno do fungo *Tryblidiopycnis* sp. 4275.



Fonte: Li *et al.*, 2008

Figura 13. Triterpenos do fungo *Phomopsis* sp. HKI0458.

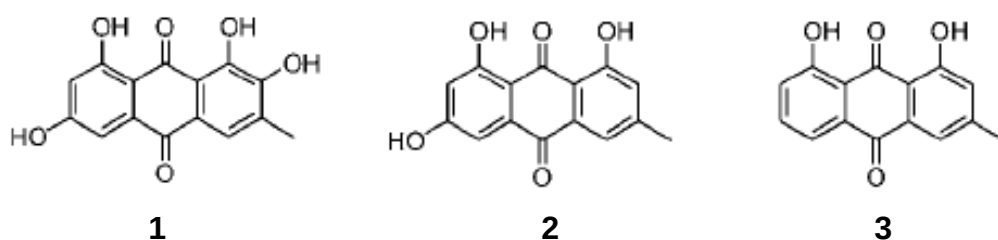
Em 2006, Li *et al.* isolaram quinonas de *Penicillium* sp. e antraquinonas (Figura 14) do fungo *Halorosellinia* sp. 1403 isolado do tronco de *Kandelia candel* apresentaram atividade antimicrobiana para *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*. Segundo Xia *et al.* (2007) o composto 4 também mostrou atividade citotóxica para células Kb e KBv-200.



Fonte: Pan, et al., 2008

Figura 14. Antraquinonas (1-7) isoladas do fungo *Halorosellinia* sp. 1403.

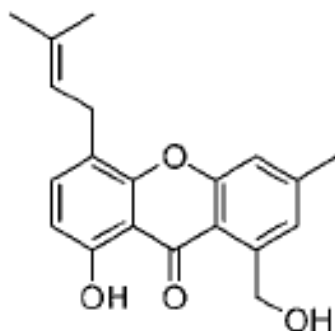
Do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. isolado da casca do mangue em Taiwan foram obtidas 3 antraquinonas (Figura 15), o composto 1 apresentou forte atividade antitumoral e atividade *in vitro* contra acetilcolinesterase (WEN *et al.*, 2007; WEN *et al.*, 2008).



Fonte: Pan, et al., 2008

Figura 15. Antraquinonas do fungo *Paecilomyces* sp.

As xantonas ocorrem comumente nos vegetais superiores, líquens e, ainda, são produzidas por alguns fungos. São compostos que possuem atividade broncodilatadora, anti-alérgica, antitumoral, antifúngica, anti-inflamatória e antituberculose (PERES *et al.*, 2000). Paeciloxantona (Figura 16) é um novo metabólito produzido por *Paecilomyces* sp. com significativa atividade citotóxica contra células hepG2 (WEN *et al.*, 2006).

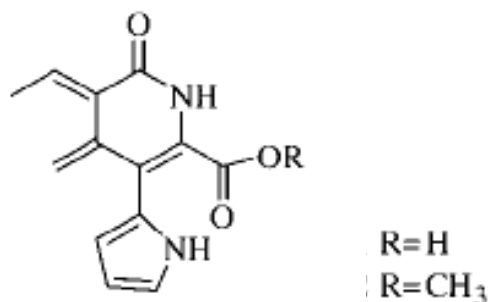


Fonte: Pan, et al., 2008

Figura 16. Paeciloxantona do fungo *Paecilomyces* sp.

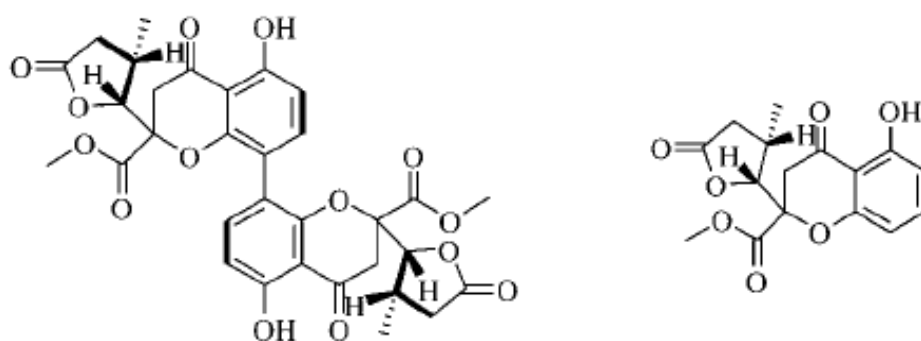
Outros metabólitos pertencentes aos mais diversos grupos químicos também são sintetizados pelos fungos endofíticos de ambiente estuarino, como os alcalóides (Figura 17) produzidos por dois fungos endofíticos não-

identificados 1924 e 3893 que mostrou atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (LONG e AZAM, 2001); as cromonas paecilina A e B (Figura 18) isoladas do fungo *Paecilomyces* sp. e bacilosporinas C e D (Figura 19) obtidas do fungo não-identificados SBE-14 isolados da casca de mangue em Hong Kong (GUO *et al.*, 2007).



Fonte: Pan, *et al.*, 2008

Figura 17. Alcalóides dos fungos endofíticos não-identificados 1924 e 3893.



Fonte: Pan, *et al.*, 2008

Figura 18. Cromonas do fungo *Paecilomyces* sp.

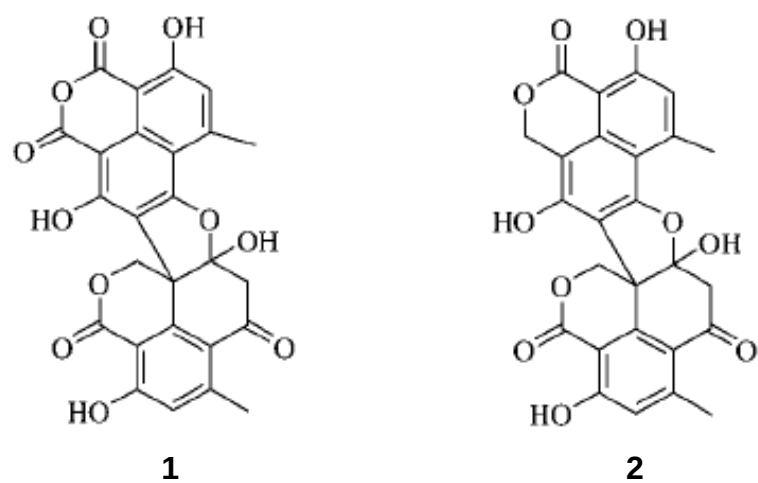


Figura 19. Bacilosporinas C (2) e D (1) do fungo *Paecilomyces* sp.

REFERÊNCIAS



AGÊNCIA ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (CPRH). **Perfis ambientais:** áreas estuarinas. Disponível em <http://www.cprh.pe.gov.br>. Acesso em 16 de junho de 2008.

ANANDA, K. e SRIDHAR, K.R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of Índia. **Canadian Journal of Microbiology**, 48:871-878, 2002.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de *Citrus***.1996. 111f. Dissertação (Mestrado), ESALQ, São Paulo, 1996.

ARAÚJO, W. L. *et al.* Variability and interaction on between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, 47:229-236, 2001.

ARNOLD, A. E. *et al.* Are tropical endophytes fungi hyperdiverse? **Ecology Letters**, 3:267-274, 2000.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: MELO I.S. e AZEVEDO. J.L. Ecologia Microbiana. São Paulo: Editora da EMBRAPA, 1998.

BACON, C.W. e WHITE Jr., J.F. **Microbial endophytes**, New York: Marcel Dekker, 2000.

BARROS, H. M. *et al.* **Gerenciamento participativo de estuários e manguezais**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2000.

BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Mycomycetum** Engelman, Leipzig, 1866.

BARRY, R.D. Isocoumarins. Developments since 1950. **Chemical Review**. 64: 229–260, 1964.

CHEN, G. *et al.* Two new metabolites of a marine endophytic fungus (Nº1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. **Tetrahedron**, 59:1907-4909, 2003.

CLAY, K. e SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequence of endophyte symbiosi, **The American Naturalist**, 160:99-127, 2002.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, IBDF, 1978.

COSTA, I. P. M. W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil**. 2003, 72f. Dissertação (Mestrado). UFPE, Recife, 2003.

DUKE, J.A. e WAIN, K.K. **Medicinal plants of the world**. Computer index with more than 85,000 entries, 1981.

FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE (FIDEM). **Plano de desenvolvimento integrado de Itamaracá: estudos preliminares**. Recife, 1996.

GUO, Z. *et al.* ^1H and ^{13}C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). **Magnetic Resonance in Chemistry**, 45:777-780, 2007.

HERTZ, R. **Manguezais do Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1991.

HUANG, Y. J. *et al.* Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 31:163–167, 2001.

HUANG, H. R. *et al.* A new chloro-monoterpene from the mangrove endophytic fungus *Tryblidiopycnis* sp. (4275). **Journal of Asian Natural Products Research**, 8:609-612, 2006.

JAITLEY, A.K. e RAI, J.N. Thermophilic and thermotolerant fungi isolated from mangrove swamps. **Mycologia**, 6:1021-1022, 1982.

JAITLEY, A. K. Ph optima of the fungi isolated from mangrove soils in Indias. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, 28:137-143, 1987.

JIMÉNEZ, J. A. **The mangroves of Costa Rica: a physionomic characterization**. 130 p, Thesis de M.S., University of Miami, 1981.

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

JONES, E. B. G. e ALIAS, S. A. **Biodiversity of mangrove fungi**. In: Biodiversity of Tropical Microfungi. Hong Kong University Press, 1997.

KATHIRESAN, K. e BINGHAM, B. L. Biology of mangrove and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, 48:81-251, 2001.

KOBAYASHI, D. Y. e PALUMBO, J. D. **Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture**. In: Bacon, C.W. e White Jr., J.F. (Ed.) Microbial Endophytes, New York: Marcel Dekker, 2000.

KROHN, K. e RIAZ, M. Total synthesis of (+)-xyloketal D, a secondary metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. **Tetrahedron Letters**, 45:293-294, 2004.

KUMALA, S. *et al.* Isolation of endophytic fungi from *Brucea javanica* L. (Merr.) and cytotoxic evaluation on their n-butanol extract from fermentation broth. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 9:825-832, 2006.

KUMERASAN, V. e SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, 105:1388-1391, 2001.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. **Fungal Diversity**, 9:81-91, 2002.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. e JOHNSON, J. A. **Ecology of mangrove endophytes**. In: Hyde, K.D. (Ed) Fungi of Marine Environments, Fungal Diversity Research Series, 2002.

LACERDA, S. R. **Variação diurna e sazonal do fitoplâncton do estuário do rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil**. 1994, 146 f. Dissertação (Mestrado). UFPE, 1994.

LI, H. J. *et al.* Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus N°2524. **Journal of Asian Natural Products Research**, 6:185-191, 2004.

LI, L. *et al.* A seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HLI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Phytochemistry**, 69:511-517, 2008.

LIN, Y. *et al.* Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the south China sea coast. **Journal of Organic Chemistry**, 66:6252-6256, 2001.

LIN, Y. *et al.* The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* n° 2606 from a salt lake in the Bahamas. **Phytochemistry**, 59:469-471, 2002.

LIU, X. H. *et al.* Xylketal H from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. 2508. **Russian Chemical Bulletin International**. 55:1–2, 2006.

LONG, R. A. e AZAM, F. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 67:4975–4983, 2001.

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

LUGO, A. E. e SNEKADER, S. C. The ecology of mangrove. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 5:39-64, 1974.

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. Brazilian Chemical Society**. 16:280-283, 2005.

MEDEIROS, T. C. C. Produtividade e biomassa das espécies arbóreas do manguezal do estuário do rio Paripe, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil. 1996,191f. Dissertação (Mestrado). UFRPE, 1996.

MELNROY, J. A. e KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, 173:337-342, 1995.

NEJAD, P. e JOHNSON, P. A. Endophytic bactéria induce growth promotion and wild suppresion in oilseed rape and tomato. **Biological Control**,18:208-215, 2000.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A. e ITO, T. Assemblages of endophytic fungi on *Bruguiera gymnorrhiza* in the Shiira River Basin, Iriomote Is. **IFO Research Communications**, 20:41-49, 2001.

OMACINE, M. *et al.* Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, 409:78-81, 2001.

OWEN, N. e HUDLEY, N. Endophytes- the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, 87:79-99, 2004.

PAN, J. H. *et al.* Review of bioactive compounds from fungi in the south China sea. **Botanica Marina**, 51:179-190, 2008.

PARNISKE, M. Intracellular accomodation of microbes by plants: a commom developmental program for symbiosis and disease. **Current Opinion in Plant Biology**, 3:320-328, 2000.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L. e ARAÚJO, W. L. **Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico**. Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento, 2002.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, 71:981-990, 2006.

PEREIRA, J. O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais**. 104f, Tese de Doutorado, ESALQ, São Paulo, 1993.

PERES, V.; NAGEM, T. J. e OLIVEIRA, F. F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, 55: 683, 2000.

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

PETRINI, O. **Ecological and physiological aspects of host specific and endophytic fungi**. In: Redlin, S.C. e Caris, L.M. (Ed.) Endophytic fungi and grasses and woody plants, American Phytopathological Society Press, 1996

PHONGPAICHIT, S. *et al.* Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 48:367-372, 2006.

PIMENTEL, I. C. *et al.* Fungos endofíticos em folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, 36:123-128, 2006.

RAI, J. N.; GARG, K. L. e JAITLEY, A. K. Saprophytic fungi isolated from woods in mangrove swamps and their wood-decaying capability. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, 22:65-74, 1981.

REDMAN, R. S. *et al.* Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, 298:1581, 2002.

RODRIGUES, K. F. e PETRINI, O. **Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions**. In: **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong University Press, Hong Kong, 1997.

ROMERO, M.; SANCHEZ, I. e PUJOL, M. D. New advances in the field of calcium channel antagonists: cardiovascular effects and structure-activity relationships. **Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents**, 1:113–141, 2003.

SAIKKONEN, K. *et al.* Evolution of endophyte-plants symbioses. **TRENDS in Plant Science**, 9, 2004.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo, 1995.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; CÍNTRON-MOLERO, G. e SOARES, M. L. G. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, 3:561-570, 2000.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *et al.* Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21:27-32, 2005.

SCHULZ, B. *et al.* Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, 106:996-1004, 2002.

SCHULZ, B. e BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, 106:661-686, 2005.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. e AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Editora da Universidade de Caxias do Sul: Caxias do Sul, 2002.

SILVA, J. D. V. **Parâmetros oceanográficos e distribuição das espécies e bosques de mangues no estuário do rio Paripe, PE**. 1995, 98f. Dissertação (Mestrado). UFRPE, 1995.

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

SRIDHAR, K. R. Mangrove fungi in India. **Current Science**, 86:1586-1587, 2004.

STIERLE, A. *et al.* The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, 58:1315-1324, 1995.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D. e WHITE Jr., F. **Endophytic fungi**. In: Mueller, J.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. (Ed.) Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, 2004.

STROBEL, G. *et al.* Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 17:417-423, 1996.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22:315-333, 2002.

SURYANARAYANAN, T. S. e KUMERASAN, V. Endophytic fungi from an estuarine mangrove forest. **Mycological Research**, 104:1465-1467, 2000.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F. e LUMYONG, S. Isolation of endophytic fungi actinomycetes from selected plants and their antifungal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 19:381-385, 2003.

TOMLINSON, P. B. **The botany of mangroves**. Cambridge University Press, New York, 1986.

VALIELA, I.; BOWEN, J. L. e YORK, J. Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments, **BioScience**, 51:807-815, 2001.

WEN, L. *et al.* Metabolites of marine fungus *Paecilomyces* sp. tree 1-7 from the South China Sea. **Zhong Yao Cai Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 29:782-785, 2006.

WEN, L. *et al.* Studies on the secondary metabolites of a marine mangrove fungus *Paecilomyces* sp. tree 1-7. **J. Sun Yat-sen Univ. (Nat. Sci.)**, 46:105-107, 2007.

WEN, L. *et al.* Paeciloxanthone, a new cytotoxic xanthone from the marine mangrove fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). **Journal of Asian Natural Products Research**, 10: 133-137, 2008.

WHITE, J. F.; MORROW, C. J. e MORGAN-JONES, G. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, 82:218-226, 1990.

WILSON, D. Fungal endophytes which invade insect gall: insect pathogens, benign saprophytes or fungal inquilines? **Oecologia**, 103:255-260, 1995.

WIYAKRUTTA, S. *et al.* Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer, anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20:265-272, 2004.

WU, X. *et al.* Xyloketal G, a novel metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. 2508. **Chemistry of Natural Compounds**, 41: 27-29, 2005.

XIA X. K. *et al.* ^1H and ^{13}C NMR assignments for five anthraquinones from the mangrove endophytic fungus *Halorosellinia* sp. (No.1403). **Magnetic Resonance Chemical**, 45:1006–1009, 2007.

YANDRY, R. R. J. *et al.* Actividad antagônica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. **Boletín Micológico**, 21:49-53, 2006.

ZHANG, L. *et al.* Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Current Opinion in Microbiology**, 8:276-281, 2005.

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

CAPÍTULO I



Diversidade de Fungos Endofíticos em *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Mangue-Branco, Combretaceae)

Autores: Michelle R. O. Silva¹, Flávia V. F. Arruda¹, Aliny C. Almeida¹ e Norma B. Gusmão¹

Endereço: ¹Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A riqueza e a diversidade dos fungos endofíticos das folhas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. das partes superior, média, inferior e, ainda folhas jovens foram analisadas através da frequência de colonização, teste G e índice de Shannon-Wiener (H'). A similaridade das espécies entre as partes estudadas foram avaliadas pelo índice de Jaccard (J) e coeficiente de Morisita-Horn (C_{mh}). Um total de 70 linhagens endofíticas pertencentes a 10 táxons foram isoladas dos 140 fragmentos das folhas coletadas, resultando numa frequência de colonização de 50%. Dentre os fungos endofíticos isolados 75,70% são fungos anamórficos, 17,15% *Mycelia Sterilia*, 4,30% *Ascomycetes* e 2,85% *Basidiomycetes*. O fungo *Paecilomyces variotii* teve a mais alta frequência de colonização (19,3%) seguido por *Mycelia Sterilia* (8,6%), *Penicillium* sp. (7,2%), *Trichoderma* sp. (5%), *Aspergillus niger* (4,3%) e ainda por espécies menos representativas como *Fusarium* sp., *Guignardia bidwellii* e *Basidiomycota* com 1,4% e *Curvularia pallescens* e *Periconia* sp. com 0,7 %. Não houve diferença significativa ($P=0,42$) para a riqueza e abundância das espécies. Entretanto, as folhas coletadas da parte média apresentaram uma maior diversidade ($H'=2,80$ bits\ind.) e esta foi significativa quando comparada com as folhas das partes superior, inferior e, ainda, as folhas jovens. Em contraste, as folhas da parte superior tiveram o menor índice de Shannon-Wiener ($H'=1,39$ bits\ind). Pelo índice de similaridade de Jaccard, as folhas da parte inferior e as folhas jovens permaneceram agrupadas ($J=0,50$), havendo 4 espécies de fungos endofíticos comuns entre as duas parcelas. Em contraste, os fungos endofíticos da parte superior quase não apresentam similaridade com as outras parcelas ($J< 0,25$). Já para o coeficiente de Morisete-Horn os fungos endofíticos da parte média e das folhas jovens foram agrupados atingindo um coeficiente de similaridade de 75% ($C_{mh}=0,75$).

Palavras-chave: Diversidade; Fungos Endofíticos; Manguezal; *Laguncularia racemosa*

Autor para Correspondência: Michelle R. O. Silva, Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, s/n, 50670-901, + 55 81 21268346
mroseosilva@hotmail.com; michelle.rosilva@ufpe.br

1. Introdução

O ambiente estuarino é a área de transição entre o ambiente terrestre e marinho caracterizado por grande variação dos parâmetros físicos e químicos e apresentando uma comunidade vegetal de aspecto peculiar. O desenvolvimento da cobertura vegetal é condicionado por fatores como pluviometria, sedimento, temperatura, salinidade e hidrodinâmica. O fluxo das marés exerce grande influência sobre a composição e a distribuição dos organismos nas áreas de manguezal (Kathiresan e Bingham, 2001).

Os manguezais brasileiros são constituídos basicamente por três gêneros de angiospermas: *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia*. Sendo o gênero *Laguncularia* representado por uma única espécie em toda costa brasileira: *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.. Nessa espécie é possível encontrarmos adaptações tais como pneumatóforos (raízes aéreas) e glândulas de excreção de sal (Barros *et al.*, 2000).

Os manguezais são reconhecidos por sua alta produtividade e participação na ciclagem de nutrientes devido à grande concentração de matéria orgânica. Os microrganismos desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica, contribuindo para o fluxo de energia nos níveis tróficos mais altos. Dentre os benefícios ecológicos que esse ecossistema proporciona podemos citar: proteção contra a erosão da linha costeira, retenção de poluentes provenientes dos rios, berçário natural para a procriação de diversas espécies, etc. (Schaeffer-Novelli *et al.*, 2001). Por ser um ecossistema tão especial, faz-se necessário compreender as interações tróficas entre os organismos adaptados a este ambiente.

Os fungos de ambiente estuarino constituem o segundo maior grupo ecológico de fungos marinhos (Sridhar, 2004). Atualmente, a estimativa é de que existam cerca de 1.500 espécies de fungos marinhos, sendo a maioria pertencente à divisão *Ascomycota*. Embora o número de trabalhos relacionados com fungos marinhos tenha aumentado significativamente nos últimos anos, o conhecimento a respeito dos mesmos ainda é pequeno. E basicamente estão focados na função ecológica e composição taxonômica; poucos trabalhos relatam a interação fungo/planta.

Os fungos endofíticos podem modificar as plantas ao nível genético, fisiológico e ecológico (Weishampel e Bedford, 2006). Estas modificações induzem profundas alterações em como as plantas respondem aos fatores ambientais, com conseqüente alteração na variação espacial na dinâmica da vegetação. Estudos recentes têm demonstrado que os fungos endofíticos são importantes principalmente na adaptação das plantas a ambientes extremos, tornando-as competitivas e resistentes ao ataque de insetos e fitopatógenos e, ainda, são organismos promissores na busca de novos produtos de interesse industrial (Arnold *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Arnold e Lewis, 2005). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos endofíticos das folhas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. e coletar informações sobre a composição, riqueza e diversidade fúngica dessa espécie vegetal.

2. Material e Métodos

2.1 Local de Coleta

O estuário do rio Paripe está localizado em Vila Velha, município da ilha de Itamaracá, localizado no litoral norte do estado de Pernambuco (7°34'00" – 7°55'16" latitude sul e 34°48'48" – 34°52'24" longitude oeste). Folhas de *Laguncularia racemosa* (L). Gaertn. (Mangue-branco, Combretaceae) foram coletadas, de um único indivíduo, das partes superior, média, inferior e, ainda, folhas jovens no mês de Junho/2005. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e levadas ao laboratório para serem processadas no prazo de 24 horas.

2.2 Isolamento dos Fungos Endofíticos

Para o isolamento dos fungos endofíticos foram selecionadas folhas saudáveis, ou seja, sem danos ou sintoma de doença aparente e, então, submetida ao processo de desinfecção. Posteriormente, em câmara asséptica, as folhas foram imersas em álcool 70% por 1 minuto, depois em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos de acordo com Pereira (1993). Em seguida, as folhas foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada e 100 µL da última lavada foi utilizado para o controle da assepsia (Schulz *et al.*, 1998). Com o auxílio de uma lâmina esterilizada, 04 fragmentos aleatórios de 1,0 cm² foram cortados e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (150 mg/mL) para inibir o crescimento bacteriano. As placas de Petri foram incubadas em estufa tipo

BOD a temperatura de 30°C durante 15 dias. Periodicamente, as placas de Petri foram examinadas a fim de acompanhar o crescimento fúngico nos fragmentos das folhas. Ao ser constatado o crescimento, os fungos foram transferidos novamente para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA para posterior purificação e identificação dos mesmos. Os fungos foram agrupados de acordo com suas características morfológicas, tais como coloração, aspecto na colônia, textura, pigmentação, entre outros (Suryanarayanan *et al.*, 1998).

2.3 Identificação dos Fungos Endofíticos

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada a partir do microcultivo usando os meios de cultura BDA e Czapeck e observando-se os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas tendo como base literatura específica (Raper e Thom, 1949; Rifai, 1969; Booth, 1971; Samson, 1974; Raper e Fennell, 1977; Pitt, 1988; Samson e Frisvard, 2004). Os fungos que não esporularam quando cultivados nos meios citados acima foram, ainda, crescidos nos meios de cultura Malte e V8 Juice a fim de induzir a esporulação.

2.4 Análise Estatística dos Dados

A frequência de colonização dos fungos endofíticos foi calculada através do número de isolados obtidos (N_i) pelo número total de fragmentos (N_f) $\times 100$ ($FC = N_i/N_f \times 100$) (Fisher e Petrini, 1987). A riqueza e a abundância das espécies foram analisadas através do teste G e a diversidade pelo índice de Shannon-Wiener (H') com log na base 2 e os resultados comparados pelo

teste t de Hutcheson (ZAR, 1996). A similaridade das espécies entre as partes coletadas foi avaliada pelo índice de Jaccard (J) e pelo coeficiente de Morisita-Horn (Cmh). As permutas foram realizadas com o uso do software NTSYSpc 2.01 (Applied Biostatistics Inc., 2000-2001) para Windows.

3. Resultados e Discussão

Um total de 70 linhagens endofíticas pertencentes a 10 táxons foram isoladas dos 140 fragmentos das folhas coletadas, resultando numa frequência de colonização de 50%. Essa frequência é considerada baixa quando comparada com outros trabalhos de fungos endofíticos de ambiente estuarino (Suryanarayanan e Kumerasan, 2000; Kumerasan e Suryanarayanan, 2001; Maria e Sridhar, 2003; Ananda e Sridhar, 2004). Contudo, as folhas de *L. racemosa* quando mergulhadas no hipoclorito de sódio sofreram uma rápida oxidação, ocasionando uma redução na quantidade de fungos isolados. Essa mesma observação é relatada no trabalho de Souza *et al.* (2004), salientando que para as folhas jovens a oxidação foi bem mais acentuada, reduzindo ainda mais o número de microrganismos endofíticos isolados. Outro ponto a ser relacionado com o baixo número de isolados foi à alta taxa de herbivoria sofrida por *L. racemosa* durante o período da coleta. Grande parte das folhas estava com sinais de ataques por herbívoros, dificultando a seleção de folhas intactas e saudáveis. A literatura cita que *L. racemosa* é frequentemente acometida por insetos fitófagos e a presença de galhas ocasionadas por esses insetos principalmente na estação chuvosa (García-Guzman e Dirzo, 2001; Gilbert *et al.*, 2002; Santos-Mendonça e Almeida-Cortéz, 2007; Gonçalves, 2008).

Dentre os fungos endofíticos isolados 75,70% são fungos anamórficos, 17,15% *Mycelia Sterilia*, 4,30% *Ascomycetes* e 2,85% *Basidiomycetes*. Segundo Jones e Hyde (1988), fungos anamórficos são muito comuns em ambiente estuarino, enquanto que os *Ascomycetes* estão predominantemente presentes em condições marinhas. O nosso resultado também está de acordo

com Maria e Sridhar (2004), cujo número de fungos anamórficos foi superior aos *Ascomycetes* na estação chuvosa e com Tejesvi *et al.* (2006) onde a frequência dos fungos mitospóricos foi de 61% contra 21% dos *Ascomycetes*. Suryanarayanan *et al.* (1998) verificaram uma maior prevalência dos *Hyphomycetes* e *Mycelia Sterilia* do que para os *Ascomycetes* e *Coelomycetes* entre os fungos endofíticos isolados das folhas dos mangues *Rhizophora apiculata* e *R. mucronata*.

As folhas coletadas da parte superior apresentaram uma frequência de colonização de 77,5%. A espécie *Paecilomyces variotii* foi a mais representativa com 52,5% de colonização, seguida por *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. ambas com 10% e *Fusarium* sp. com 2%. Para as folhas da parte média a frequência de colonização foi de 50%, entretanto observou-se uma maior diversidade de táxons e uma melhor distribuição do número de isolados nessa região. Entre as espécies isoladas com maior frequência destacaram-se *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. e *Mycelia Sterilia*. Em contraste, as folhas coletadas da parte inferior tiveram uma baixa frequência de colonização (22,5%) e com predomínio de *Mycelia Sterilia* (15%). As folhas jovens de *L. racemosa* apresentaram uma frequência de colonização de 50%, com destaque para *Aspergillus niger*, *Paecilomyces variotii* e *Mycelia Sterilia* (Tabela 1).

Analisando a colonização das folhas de *L. racemosa* (superior, média, inferior e jovem) verifica-se que de modo geral o fungo *Paecilomyces variotii* teve a mais alta frequência de ocorrência (19,3%) seguido por *Mycelia Sterilia* (8,6%), *Penicillium* sp. (7,2%), *Trichoderma* sp. (5%), *Aspergillus niger* (4,3%) e ainda por espécies menos representativas como *Fusarium* sp., *Guignardia*

bidwellii e *Basidiomycota* com 1,4% e *Curvularia pallescens* e *Periconia* sp. com 0,7 % (Tabela 1). A presença do fungo entomopatogênico *Paecilomyces variotii* como endofítico de mangue também foi relatada por Ananda e Sridhar (2002) nas raízes de *Rhizophora mucronata*. Vários gêneros de fungos entomopatogênicos têm sido isolados como endofíticos em diversas partes das plantas. Segundo Vega (2008), alguns desses fungos ocorrem naturalmente como endofíticos, enquanto outros são introduzidos nas plantas por diferentes técnicas. Então, como explicar a presença dos fungos entomopatogênicos em mangues? Vega *et al.* (2008) aponta a possibilidade de que esses fungos exercem algum efeito sobre a performance da planta hospedeira ao passo que outros encontram-se ali acidentalmente, sem nenhuma função específica. Em nosso caso, é importante recordar a alta taxa de herbivoria em *L. racemosa* tornando os insetos hipoteticamente como vetores dos esporos desse fungo.

No estudo realizado por Yang *et al.* (2006), entre as 209 linhagens de fungos endofíticos isolados do mangue *Kandelia candel*, destacaram-se os gêneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Dothiorella* e *Mycelia Sterilia*, enquanto que para o mangue *Bruguiera gymnorhiza* os gêneros dominantes foram *Cephalosporium*, *Alternaria* e *Penicillium*.

Segundo Liu *et al.* (2007) existem mais de 200 espécies de fungos endofíticos isolados e identificados das plantas dos manguezais pertencentes principalmente aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* e *Trichoderma*.

Em nosso trabalho foram obtidas duas linhagens de *Guignardia bidwellii*, contudo a sua forma anamórfica *Phyllosticta* é freqüentemente isolada

das folhas de diversas espécies vegetais, sugerindo que este fungo está mais adaptado a um modo de vida endofítico. Ao passo que as linhagens de *Fusarium* e *Trichoderma* além de serem endofíticos são conhecidas também pelas suas formas patogênicas e saprófitas (Toofanee e Dulyamamode, 2002; Souza *et al.*, 2004).

Em relação aos fungos endofíticos em *Laguncularia racemosa* não houve diferença significativa ($P=0,42$) para a riqueza e abundância das espécies, de acordo com o teste G. Entretanto, as folhas coletadas da parte média apresentaram uma maior diversidade ($H'=2,80$ bits\ind.) e esta foi significativa quando comparada com as folhas das partes superior ($t=5,29$; $v=49,59$; $p<0,05$), inferior ($t=3,14$; $v=11,47$; $p<0,05$) e, ainda, as folhas jovens ($t=2,59$; $v=21,30$; $p<0,05$). As folhas da parte inferior não apresentaram diferença significativa quanto à diversidade ($H'=1,44$ bits\ind.) em relação às folhas da parte superior ($t=0,10$; $v=14,76$; $p<0,05$) e as folhas jovens ($t=1,60$; $v=13,02$; $p<0,05$). Contudo, a diversidade para as folhas jovens ($H'=2,14$ bits\ind.) foi significativa comparada com as folhas da parte superior ($t=2,61$; $v=34,03$; $p<0,05$). As folhas da parte superior tiveram o menor índice de Shannon-Wiener ($H'=1,39$ bits\ind.) apesar de ter a maior frequência de colonização (77,5%). A composição e as espécies dominantes em cada mangue estão diretamente relacionadas com a parte da planta estudada, a idade, o hospedeiro e a sazonalidade.

O dendograma mostrado na figura 1 expressa o índice de similaridade de Jaccard, sendo uma das ferramentas mais utilizadas para comparações qualitativas, ou seja, leva em consideração a presença ou ausência das espécies de fungos endofíticos entre as partes coletadas. As folhas da parte

inferior e as folhas jovens apresentaram similaridade e ficam agrupadas ($J=0,50$), havendo 4 espécies de fungos endofíticos comuns entre as duas parcelas. Em contraste, os fungos endofíticos da parte superior quase não apresentam similaridade com as outras parcelas ($J < 0,25$). Já o dendograma da figura 2 mostra os valores do coeficiente de Morisete-Horn que agrega as parcelas em função da espécie e do número de isolados. Nesse caso, os fungos endofíticos da parte média e das folhas jovens foram agrupados atingindo um coeficiente de similaridade de 75% ($C_{mh}=0,75$).

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro, a Dra. Luciana Gonçalves de Oliveira, a MSc. Isabella Wanderley Costa pela ajuda na identificação dos fungos e ao Prof. André Maurício Melo Santos pela análise estatística dos dados.

4. Referências

- Ananda, K e Sridhar, KR (2004) Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and Woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India. *Curr. Sci.* 87: 1431-1437.
- Arnold, AE e Lewis, LC (2005) *Evolution of fungal endophytes and their roles against insects*. In: *Tropical Ecosystem: structure, diversity and human welfare*. Oxford Publishing Co. 739-743.
- Arnold, AE; Mejia, LC; Kylo, D; Maynard, Z; Robbins, R e Herre, EA (2003) Fungal endophyte limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 15649-15654.
- Barros, HMB; Macedo, SJ e Leça, EE (2000) *Gerenciamento participativo de estuários e manguezais*. Editora Universitária do Recife/UFPE.
- Booth, C (1971) *The genus Fusarium*. Commonwealth Institute, Kew, Surrey.
- Fisher, PJ e Petrini, O (1987) Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study, *Trans. Br. Mycol.* 89: 246-249.
- García-Guzman, G e Dirzo, R (2001) Patterns of leaf-pathogen infection in the understory of a Mexican rain forest: incidence, spatiotemporal variation and mechanisms of infection. *Am. J. Bot.* 88: 634-645.
- Gilbert, GS; Mejia-Chang, M e Rojas, E (2002) Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia*. 132: 278-285.
- Gonçalves, AZ (2008) Influência da maré na herbivoria de *Laguncularia racemosa* (Combretaceae). *Práticas de Pesquisa em Ecologia da Mata Atlântica*, 1-3.
- Jones, EBG. e Hyde, KD (1988) *Methods for the study of marine mangrove fungi*: In: *Mangrove Microbiology: Role of Microorganisms in Nutrient Cycling Mangrove Soils and Water*. UNDP/UNESCO. 9-27.
- Kathiresan, K e Bingham, BL (2001) Biology of mangrove and mangrove ecosystem. *Adva. Mar. Biol.* 40: 81-251.
- Kumerasan, V e Suryanarayanan, TS (2001) Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycol. Res.* 105: 1388-1391.

Liu, A; Wu, X e Xu, T (2007) Research advances in endophytic fungi of mangrove. *Chin. J. Appl. Ecol.* 18: 912-918.

Maria, GL e Sridhar, KR (2004) Fungal colonization in immersed wood in mangroves of the southwest coast of India. *Can. J. Bot.* 82: 1409-1418

Maria, GL e Sridhar, KR (2003) Endophytic fungi assemblage of two halophytes from west coast mangrove habitats, India. *Czech Mycol.* 55: 241-151.

Pereira, JO; Azevedo, JL e Petrini, O (1993) Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. *Mycologia.* 85: 362-364.

Pitt, JIA (1988) *A laboratory guide to commons Penicillium species*. Commonwealth, England.

Raper, KB e Fennell, DI (1977) *The genus Aspergillus*. Robert e Krieger, Florida.

Raper, KB e Thom, C (1949) *A manual of the Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Rifai, MA (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers.* 116: 1-56.

Samson, RA (1974) *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology.* 6: 1- 119.

Sammson, RA e Frisvad, JC (2004) *Penicillium* subgenus *Penicillium* new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology.* 49: 1-240.

Santos-Mendonça, IV e Almeida-Cortéz, J (2007) Characterization of a mite induced gall in *Laguncularia racemosa* (L.) Gaerten (Combretaceae). *Biota Neotrop.* 7: 163-170.

Schaeffer-Novelli, Y; Coelho Júnior, C e Tognella-de-Rosa, M (2001) *Manguezais*. Editora Ática, São Paulo.

Schulz, B; Guske, S; Dammann, U e Boyle, C (1998) Endophyte-host interactions: II. Defining symbiosis of the endophyte-host interation. *Symbiosis.* 25:213-227.

Souza, AQL; Souza, ADL; Astolfi Filho, S; Pinheiro, MLB; Sarquis, MIM e Pereira, JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de

plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*. 34:185-195.

Sridhar, KR (2004) Mangrove fungi in India, *Curr. Sci.* 86: 1586-1587.

Strobel, GA; Daisy, B; Castillo, U e Harper, J (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67: 257-268.

Suryanarayanan, TS e Kumerasan, V (2000) Endophytic fungi of some halophytes from a estuarine mangrove forest. *Mycol. Res.* 104:1465-1467.

Suryanarayanan, TS; Kumerasan, V e Johnson, JA (1998) Foliar fungal endophytes from two species of mangrove *Rhizophora*. *Can. J. Microbiol.* 44: 1003-1006.

Tejesvi, MV; Mahesh, B; Nalini, MS; Prakash, HS; Kini, KR; Subbiah, V e Shetty, HS (2006) Fungal endophyte assemblages from ethnopharmaceutically important medicinal tree. *Can. J. Microbiol.* 52: 427-435.

Toofanee, SB e Dulymamode, R (2002) Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrefolia*. *Fungal Div.* 11: 169-175.

Vega, FE (2008) Insect pathology and fungal endophytes. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 277-279.

Vega, FE; Posada. F; Aime, MC; Pava-Ripoll, M; Infante, F e Rehner, AS (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*. 46: 72-82.

Weishampel, PA e Bedford, BL (2006) Wetland dicots and monocots differ in colonization by arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Mycorrhiza*. 16: 495-502.

Yang, L; Huang, Y; Zheng, Z; Song, S; Su, W e Sheng, Y (2006) The population fluctuation and bioactivity of endophytic fungi from mangrove plants in different seasons. *Journal of Xiamen University*. 45: 95-99.

Tabela 1. Frequência de colonização dos fungos endofíticos de *Laguncularia racemosa*.

Fungo Endofítico	Superior		Media		Inferior		Jovem		FC Total %
	NI	FC %	NI	FC %	NI	FC %	NI	FC %	
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	-	-	3	7,5	-	-	3	15	4,3
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	-	-	1	2,5	-	-	-	-	0,7
<i>Fusarium</i> sp.	2	5	-	-	-	-	-	-	1,4
<i>Guignardia bidwellii</i> (Ellis) Viala & Ravaz	-	-	-	-	1	2,5	1	5	1,4
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	21	52,5	3	7,5	-	-	3	15	19,3
<i>Penicillium</i> sp.	4	10	4	10	1	2,5	1	5	7,2
<i>Periconia</i> sp.	-	-	1	2,5	-	-	-	-	0,7
<i>Trichoderma</i> sp.	4	10	3	7,5	-	-	-	-	5
Basidiomycota	-	-	1	2,5	1	2,5	-	-	1,4
<i>Mycelia Sterilia</i>	-	-	4	10	6	15	2	10	8,6

FC: Frequência de colonização parcial**FC Total:** Frequência de colonização total

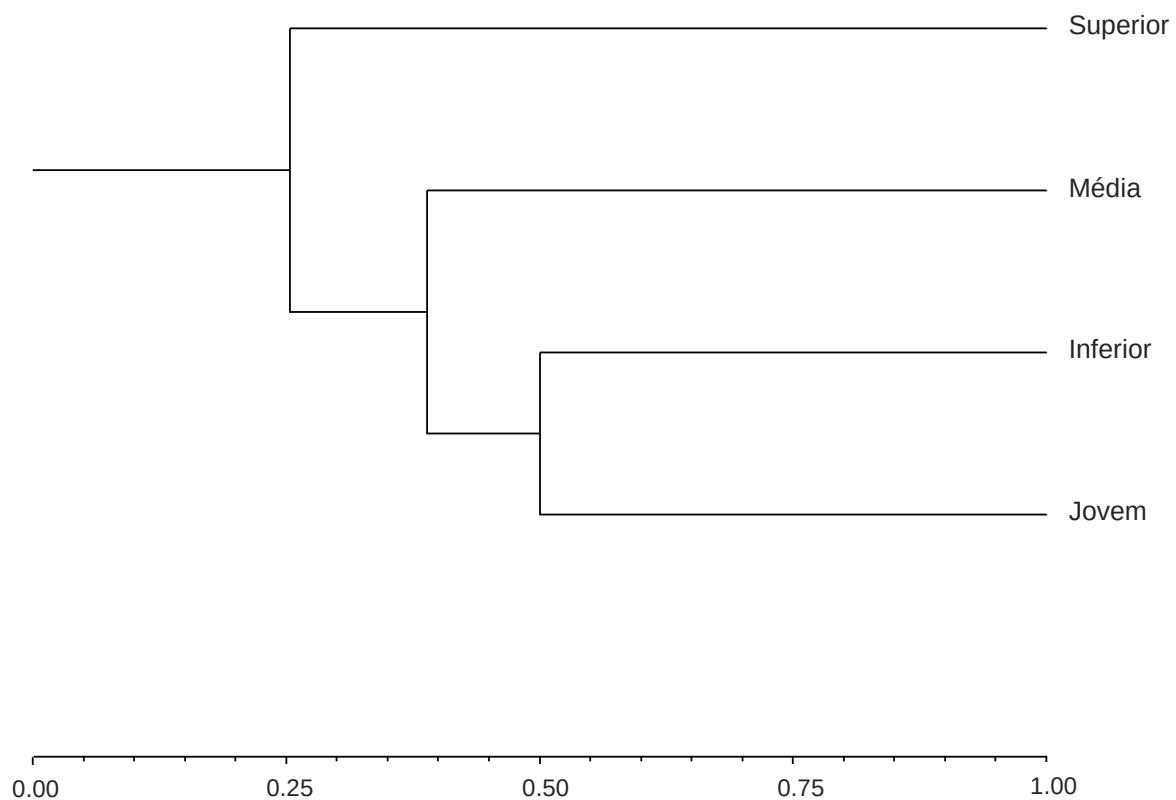


Figura 1. Dendrograma de similaridade pelo índice de Jaccard.

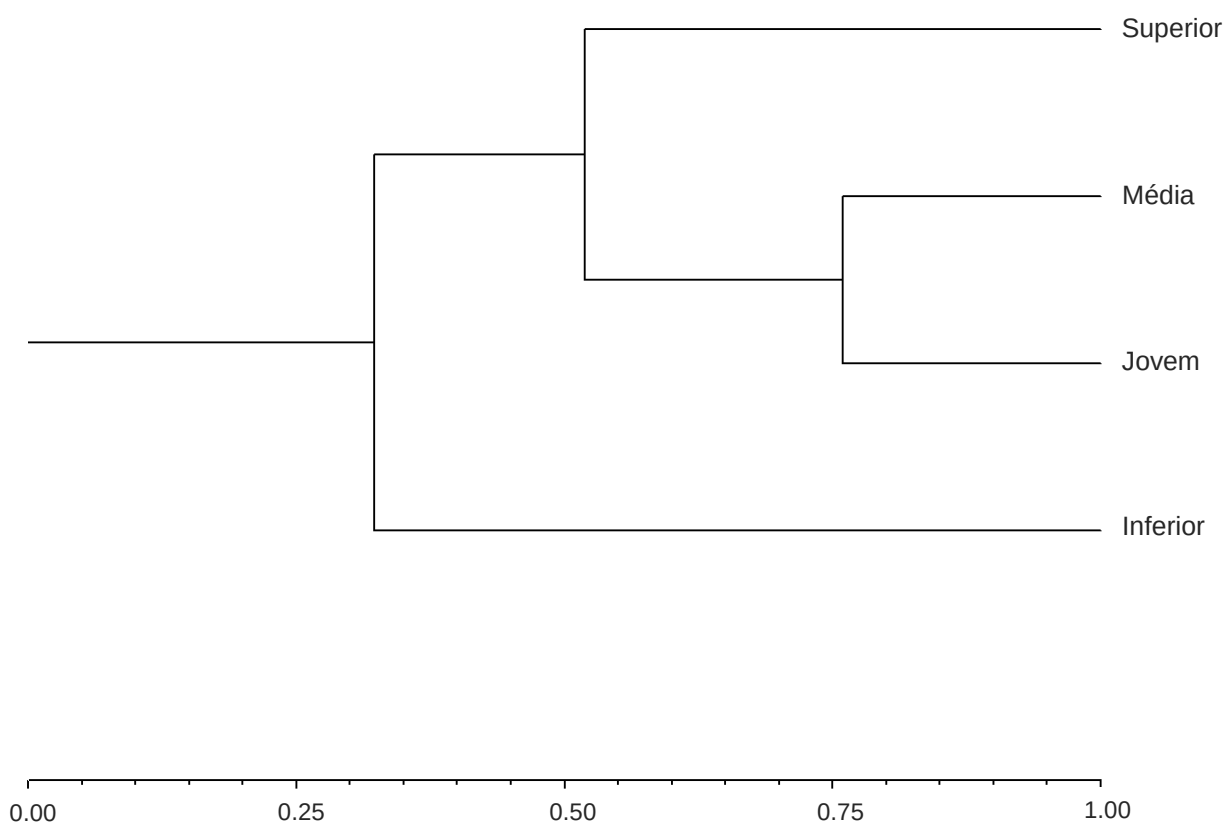


Figura 2. Dendrograma de similaridade pelo coeficiente de Morisita-Horn.

CAPÍTULO II



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Brutos dos Fungos Endofíticos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Mangue-Branco, Combretaceae)

Autores: M.R.O. Silva¹, A.C. Almeida¹, F.V. F. Arruda¹ e N.B. Gusmão¹

Endereço: ¹Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

O potencial antimicrobiano dos extratos de 70 linhagens de fungos endofíticos, isoladas das folhas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn., foi avaliado pelo método de difusão em disco de papel frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre as 70 linhagens de fungos endofíticos, 34 (48,6%) foram capazes de produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Os extratos das linhagens de *Aspergillus niger*, *Curvularia pallescens*, *Guignardia bidwellii*, *Paecilomyces variotii*, *Periconia* sp. e *Mycelia Sterilia* apresentaram os melhores resultados. A bactéria *M. luteus* e *B. subtilis* mostraram-se mais sensíveis enquanto que *P. aeruginosa* foi a mais resistente, sendo apenas inibida pelos extratos de duas linhagens de *Aspergillus niger*. O extrato da linhagem de *Paecilomyces variotii* FEL32 foi complementarmente submetido à cromatografia em camada delgada e revelou manchas de Rf 0,48 e 0,70. A biocromatografia foi realizada frente a *B. subtilis* e a atividade antimicrobiana pôde ser observada ao redor das manchas, sugerindo que esta linhagem produz mais de uma substância responsável pela atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Mangue; Atividade antimicrobiana; Biocromatografia

Autor para Correspondência: Michelle R. O. Silva, Laboratório de Fármacos e Ensaio Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, s/n, 50670-901, + 55 81 21268346
mroseosilva@hotmail.com; michelle.rosilva@ufpe.br

1. Introdução

Os microrganismos têm a habilidade de utilizar vários substratos em consequência da sua diversidade biológica e metabólica, possibilitando-os viverem em diferentes habitats. Tanto as bactérias quanto os fungos são conhecidos por formar associações mutualísticas com as plantas. Este tipo de associação, conhecida como endofítica, refere-se aos microrganismos capazes de colonizar o interior dos tecidos e órgãos das plantas sem causar nenhum dano ou sintoma de doença no hospedeiro (Petrini, 1991). Nessa relação simbiótica, a planta hospedeira protege e fornece nutrientes ao endofítico, que, em troca, produz diversos metabólitos secundários que melhoram o crescimento e a competitividade do hospedeiro na presença de herbívoros e outros patógenos (Dreyfuss e Chapela, 1994).

O aumento da resistência bacteriana é o principal motivo para que novas alternativas sejam empregadas a fim de aumentar a probabilidade de sucesso na busca por antibióticos de origem natural (Clardy e Walsh, 2004; Peláez, 2006). Desde a descoberta do taxol com atividade antitumoral, primeiramente na planta *Taxus brevifolia* e depois produzida pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (Stierle *et al.*, 1993), grupos de pesquisas têm investigado os fungos endofíticos por considerá-los uma rica fonte de metabólitos secundários com atividade biológica (Liu *et al.*, 2004; Strobel, 2002).

Os fungos endofíticos tornaram-se objetos de estudos após a descoberta da sua relevância ecológica, capacidade em sintetizar metabólitos com estruturas químicas diferentes e ampla aplicação biotecnológica. A

variedade de substâncias produzidas pelos fungos endofíticos ainda não foi estimada, mas a expectativa é de que seja alta devido à conhecida versatilidade adaptativa desses microrganismos. Eles podem ser encontrados em diversas plantas que habitam regiões de clima temperado, tropical e, ainda, ambientes inóspitos tais como desertos, pântanos e estuários (Gunatilaka, 2006).

Entretanto, de acordo com Bugni e Ireland (2004), os fungos endofíticos de origem marinha, em função das condições de pH, salinidade, oxigênio, pressão e nutrientes, são capazes de sintetizar inúmeras substâncias com estruturas químicas diferenciadas e com grande potencial biotecnológico.

Devido às variações físico-químicas do ambiente estuarino, as plantas dos manguezais possuem adaptações para proteção e auxílio à sobrevivência neste habitat. Fatores como baixo teor de oxigênio, umidade, fluxo de marés e salinidade contribuem para selecionar espécies de microrganismos capazes de suportar tais adversidades. Vários autores descrevem a descoberta de compostos, com ações diversas, produzidos por fungos endofíticos de ambiente estuarino (Lin *et al.*, 2002; Krohn e Riaz, 2004; Wu *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007a,b). Alguns desses compostos possuem atividade citotóxica e antimicrobiana promissora (Chen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2008a,b; Huang *et al.*, 2008).

O Brasil abriga 10% de todos os manguezais do planeta, mas pouco se conhece a respeito do potencial biotecnológico dos fungos endofíticos dos mangues. *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. é a segunda espécie vegetal mais representativa nos manguezais brasileiros, ocorrendo ao longo dos

estuários, principalmente na interface entre a terra firme e o manguezal, e nas margens dos rios e ilhotas (Barros *et al.*, 2000).

Diante da carência de trabalhos na literatura avaliando a atividade biológica de fungos endofíticos isolados dos mangues do Brasil, a proposta deste trabalho foi conhecer a microbiota endofítica de *L. racemosa*, além de avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos isolados visando à prospecção de metabólitos secundários biologicamente ativos.

2. Material e Métodos

2.1 Fungos Endofíticos

O potencial antimicrobiano foi avaliado em 70 linhagens de fungos endofíticos, sendo 27 *Paecilomyces variotii*, 10 *Penicillium* sp., 07 *Trichoderma* sp., 06 *Aspergillus niger*, 02 *Fusarium* sp., 02 *Guignardia bidwellii*, 02 Basidiomycota, 01 *Curvularia pallescens*, 01 *Periconia* sp. e 12 *Mycelia Sterilia*, isoladas de folhas sadias de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Mangue-branco, Combretaceae) coletadas no estuário do rio Paripe, Vila Velha, Ilha de Itamaracá, Pernambuco, Brasil. Os fungos endofíticos foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ na Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

2.2 Condições de Cultivo

As linhagens dos fungos endofíticos foram crescidas em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA a temperatura de 30°C por 3 ou 5 dias em função do crescimento. Após este período, blocos de gelose (10 mm) das culturas crescidas foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do caldo malte (Extrato de Malte 1,5%; pH $6,9 \pm 0,1$) e incubados sob agitação de 200 rpm, a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ durante o mesmo período citado acima (Kaouadji *et al.*, 1993).

2.3 Obtenção dos Extratos Brutos

Ao final da fermentação, o líquido metabólico foi separado do micélio por filtração utilizando papel de filtro Whatman 1 e, então, submetido à extrações sucessivas com acetato de etila (2 x 50 mL) sob agitação de 200 rpm durante 30 minutos. A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotatório à $\pm 45^{\circ}\text{C}$ e, finalmente, o extrato bruto concentrado foi armazenado em dessecador até peso constante (Guiraud *et al.*, 1999).

2.4 Microrganismos-teste

Os microrganismos utilizados para o teste de atividade antimicrobiana foram: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Bacillus subtilis* UFPEDA 16, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Micrococcus luteus* UFPEDA 100 como bactérias Gram-positivas; *Escherichia coli* UFPEDA 224 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39 como bactérias Gram-negativas. Todas as bactérias foram obtidas da Coleção de Cultura Microbiana, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil e mantidas em tubos de ensaios contendo o meio de cultura ágar nutritivo – AN (Peptona 0,5%; Extrato de Carne, 0,15%; Extrato de Levedura 0,15%; NaCl 0,5%; Ágar 1,5%) a temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$. O perfil de susceptibilidade dos microrganismos-teste foi determinado através de um antibiograma com os seguintes discos dos antibióticos de referência: amicacina (30 μg), cefoxitina (30 μg), ciprofloxacino (05 μg), eritromicina (15 μg), penicillina G (10 UI) e tetraciclina (30 μg).

2.5 Teste de Atividade Antimicrobiana

O teste de atividade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em disco de papel (Bauer *et al.*, 1966). Os microrganismos-teste foram crescidos em tubos de ensaios contendo o meio ágar nutritivo e incubados a temperatura de 37°C por 24 horas. Após este período, suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina 0,9 % e padronizadas de acordo com a escala 0,5 McFarland. Os extratos brutos foram solubilizados em 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Discos de papel impregnados com 20 µL dos extratos brutos foram depositados nas superfícies das placas Petri contendo o meio de cultura ágar Müller-Hinton previamente semeado com as suspensões bacterianas. As placas de Petri foram incubadas a temperatura de 37°C por 24 horas e, então, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e expressos em milímetros. Todos os resultados foram analisados usando Microsoft Excel para Windows.

2.6 Biocromatografia

Para a análise cromatográfica, o extrato da linhagem de *Paecilomyces variotii* FEL32 foi solubilizado em acetato de etila:metanol (9:1, v/v), aplicado em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel Polygram®SILG/UV₂₅₄ (40x80 mm) utilizando acetato de etila como eluente e, posteriormente, a revelação das manchas foi feita através de UV e Iodo. As manchas fluorescentes foram marcadas e submetidas à revelação biológica de acordo com Falcão *et al.* (2004). O cromatograma foi depositado em placa de Petri e, em seguida, coberto com 15 mL do meio de cultura Müller-Hinton pré-

inoculado com 100 µL da suspensão bacteriana de *Bacillus subtilis*. A placa de Petri foi incubada a 37°C por 24 horas e, então, as manchas que apresentaram atividade antimicrobiana foram detectadas através da visualização dos halos de inibição ao seu redor.

3. Resultados e Discussão

O pH do líquido metabólico foi avaliado em todos os ensaios e variou de 1,7 a 8,6 ao final das fermentações. A média do pH foi de 5,4; revelando um caráter ácido da substância produzida. Entretanto, pôde ser observado que alguns grupos de fungos endofíticos apresentaram especificidade no pH, como as linhagens de *Aspergillus* sp.: média do pH foi de 1,8 (fortemente ácido) e as linhagens de *Trichoderma* sp.: média do pH foi de 7,4 (neutro). Os rendimentos dos extratos brutos apresentaram valores entre 05 e 190 mg (Tabela 1).

Das 70 linhagens de fungos endofíticos, 34 (48,6%) foram capazes de produzir uma ou mais substâncias com atividade antimicrobiana, com halos de inibição variando de 10 a 35 mm de diâmetro, conforme a tabela 1. A bactéria *M. luteus* foi a mais sensível aos extratos, com halos de inibição entre 13,5 e 35 mm; seguida por *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E.coli*. A sensibilidade de *B. subtilis* aos extratos de fungos endofíticos também foi verificada nos trabalhos de Radu e Kqueen (2002) e Li *et al.* (2005).

Em contrapartida, a bactéria *P. aeruginosa* foi a mais resistente, sendo sensível apenas aos extratos das linhagens de *Aspergillus niger* FEL04 e FEL05, com 11 mm e 12,5 mm de diâmetros de inibição, respectivamente. Os extratos dessas linhagens de endofíticos foram, ainda, ativos para *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* e *E. faecalis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Maria *et al.* (2005) estudando o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos isolados de *Acanthus ilicifolius* e *Acrostichum aureum*, plantas associadas ao manguezal. Nesse trabalho, os extratos obtidos de duas espécies de

Aspergillus também foram ativos para *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

Dentre as 27 linhagens de *Paecilomyces variotii* apenas 10 (37%) foram produtoras de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas. O extrato da linhagem FEL24 destacou-se por apresentar halos de 21 mm para *S. aureus*, 22 mm para *B. subtilis*, 35 mm para *M. luteus* e 19 mm para *E. faecalis*. Assim como o extrato da linhagem FEL32, com halos de inibição de 20,5 mm para *S. aureus*, 21,75 mm para *B. subtilis*, 33 mm para *M. luteus* e 16,5 mm para *E. faecalis*. Ambos os extratos foram de baixo rendimento (05 mg), sugerindo a presença de alta concentração do princípio ativo nos extratos destas linhagens ou mesmo de um potente antimicrobiano. O gênero *Paecilomyces* é conhecido por suas espécies produtoras de diversos metabólitos biologicamente ativos (Huang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002).

Os extratos brutos da linhagem de *Curvularia pallescens* FEL07 e de *Guignardia bidwellii* FEL11 foram ativos tanto para as bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativa *E. coli*, apresentando, para esta última, halos de inibição de 14,25 mm e 16,75 mm, respectivamente. Em 2008, Guimarães *et al.* descrevem duas linhagens de *Guignardia* sp. isoladas de *Viguiera arenaria* também produziram substâncias que inibiram as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Espécies de *Guignardia* e sua forma anamórfica *Phyllosticta* são freqüentemente isoladas como endofíticos e representam uma fonte de vários metabólitos secundários (Rodrigues-Heerklotz *et al.*, 2001).

Apenas um extrato das linhagens de *Penicillium* sp. foi ativo para as bactérias testadas, entretanto, sua atividade antimicrobiana foi pouco expressiva e somente para as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*. Um resultado interessante, tendo em vista que este gênero é reconhecido por produzir vários metabólitos com atividade biológica (Nam *et al.*, 2000; Maskey *et al.*, 2003; Marinho *et al.*, 2005; Rančić *et al.*, 2006). Do mesmo modo, os extratos das linhagens de *Trichoderma* sp. apresentaram baixa atividade antimicrobiana, sendo ativa apenas para a bactéria *M. luteus*, com halos de inibição variando de 13,5 mm a 17,5 mm.

A linhagem de *Periconia* sp. FEL56 também apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus* e *E. coli*. Resultados semelhantes foram obtidos de uma linhagem de *Periconia* sp. isolada de *Taxus cuspidata*. Os metabólitos secundários produzidos por este fungo endofítico foram ativos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, entre elas *S. aures*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Samonella typhimurium* (Kim *et al.*, 2004). O potencial antimicrobiano de espécies de *Periconia* tem sido verificado em vários trabalhos, inclusive com potencial antifúngico contra dermatófitos e fitopatogênicos (Shin *et al.*, 2005; Bhilabutra *et al.*, 2007).

A linhagem endofítica FEL63 pertencente à divisão Basidiomycota também foi capaz de produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, apresentando halos de inibição de 15,75 mm para *S. aureus*, 17,25 mm para *B. subtilis*, 21,25 mm para *M. luteus* e 12,25 mm para *E. coli*. Existem poucos dados na literatura relacionando basidiomicetos endofíticos e

atividade antimicrobiana, entretanto, sabe-se que este grupo de fungos é reconhecido pelos seus metabólitos secundários com atividade biológica.

Em nosso trabalho, muitos fungos endofíticos isolados de *L. racemosa* não esporularam quando cultivados em *in vitro*, dificultando a sua classificação e foram, portanto, denominados de *Mycelia Sterilia*. No entanto, o grande potencial biotecnológico desses fungos torna esse grupo tão importante quanto os outros na prospecção por substâncias antimicrobianas. Neste trabalho, das 12 linhagens de *Mycelia Sterilia*, 07 (58%) produziram substâncias com atividade inibitória frente às bactérias testadas. O extrato da linhagem *Mycelia Sterilia* FEL66 apresentou os melhores resultados, com halos de 19,5 mm para *S. aureus*, 21,5 mm para *B. subtilis*, 28,75 mm para *M. luteus* e 16,25 mm para *E. coli*.

O extrato da linhagem de *Paecilomyces variotii* FEL32 submetido à CCD apresentou manchas de Rf 0,48 e 0,70 quando reveladas em UV e Iodo. A atividade antimicrobiana para *B. subtilis* foi visualizada ao redor dessas manchas, o que nos leva a concluir que o extrato provavelmente possui mais de uma substância, em pequenas quantidades, com atividade antimicrobiana (Figura 1).

Os fungos endofíticos participam de uma complexa interação com a planta “hospedeira” e a manipulação dos mesmos em laboratório pode afetar sua capacidade metabólica. As condições de cultivo, nutrientes, temperatura, bem como o tipo de extração influenciam no crescimento e, sobretudo, a produção de metabólitos secundários. Este trabalho ressalta o grande potencial dos fungos endofíticos de ambiente estuarino e, ainda, a presença de várias substâncias antimicrobianas nos extratos desses fungos.

4. Conclusão

Diante dos nossos resultados, pode-se concluir que os fungos endofíticos isolados de *L. racemosa* produzem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. O isolamento e a caracterização dessas substâncias podem conduzir a descoberta de novos compostos de interesse farmacêutico, em especial no tratamento das infecções causadas por bactérias.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro e a Dra. Luciana Gonçalves de Oliveira e MSc. Isabella Wanderley Costa pelo auxílio na identificação dos fungos endofíticos.

5. Referências

- Barros, H. M.; Eskinnazi-Leça, E.; Macedo, S. J. e Lima, T. 2000. Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais. Editora Universitária da UFPE: Recife.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. e Turck, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45:493-496, 1966.
- Bhilabutra, W.; Techowisan, T.; Peberdy, J. F. e Lumyong, S. Antimicrobial activity of bioactive compounds from *Periconia siamensis* CMUGE015. Research Journal of Microbiology, 2:749-755, 2007.
- Bugni, T. S. e Ireland, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. Natural Products Reports, 21:143-163, 2004.
- Chen, G.; Lin, Y.; Wen, L.; Vrijmoed, L. L. P. e Gareth Jones, E. B. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (nº1893) from a estuarine mangrove on the south China sea coast. Tetrahedron, 59:4907-4909, 2003.
- Clardy, J. e Walsh, C. Lessons from natural molecules. Nature, 432:829–837, 2004.
- Dreyfuss, M. M. e Chapela, I. H. 1994. Fungi as producers of secondary metabolites. In Gullo, V. P. (ed.) Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential, Butterworth-Heinemann: Boston, pp: 49-79.
- Falcão, E. P. S.; Silva, N. H.; Gusmão, N. B.; Ribeiro, S. M. e Pereira, E. C. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina solediosa* (B. de Lesd.) Laundron. Acta Botanica Brasilica, 18:913-920, 2004.
- Guimarães, D. O.; Borges, W. S.; Kawano, C. Y.; Ribeiro, P. H.; Goldman, G. H.; Nomizo, A.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Lopes, N. P. e Pupo, M; T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 52:138–144, 2008.
- Guiraud, P.; Steiman, R.; Seigle-Murandi, F. e Gusmão, N.B. Antimicrobial and antitumoral activities of Mycosporulone. Journal of Natural Products 62(9): 1222-1224. 1999.

Gunatilaka, A. A. L. Natural products from plant-microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69:509-526, 2006.

Guo, Z.; Shao, C.; She, Z.; Cai, X.; Liu, F.; Vrijmoed, L. L. P. e Lin, Y. ^1H and ^{13}C NMR assignments for two oxaphenalenones bacillosporin C and D from the mangrove endophytic fungus SBE-14. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45:439-441, 2007a.

Guo, Z.; She, Z.; Shao, C.; Wen, L.; Liu, F.; Zheng, Z. e Lin, Y. ^1H and ^{13}C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45:777-780, 2007b.

Huang, Y. J.; Wang, J. F.; Li, G. L.; Zheng, Z. H. e Su, W. J. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31: 163–167, 2001.

Huang, Z.; Cai, X.; Shao, C.; She, Z.; Xia, X.; Chen, Y.; Yang, J.; Zhou, S. e Lin, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry*, 69:1604-1608, 2008.

Kaouadji, M.; Gusmão, N.B.; Steiman e Seigle-Murandi, F. Mycosporulone, a metabolite from *Coniothyrium sporulosum*. *Journal of Natural Products* 56(12): 2189-2192. 1993

Kim, S.; Shin, D.; Lee, T. e Oh, K. Periconicins, tow new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antimicrobial activity. *Journal of Natural Products*, 67:448-450, 2004.

Krohn, K. e Riaz, M. Total synthesis of (+)-xyloketal D, a secondary metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. *Tetrahedron Letters*, 45:293-294, 2004.

Li, H.; Lin, Y.; Yao, J.; Vrijmoed, L. L. P. e Gareth Jones, E. B. Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus nº 2524. *Journal of Asian Natural Products Research*, 6:185-191, 2004.

Li, Y.; Song, Y. C.; Liu, J. Y.; Ma, Y. M e Tan, R. X. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:553-558, 2005.

Lin, Y.; Wu, X.; Deng, Z.; Wang, J.; Zhou, S.; Vrijimoed, L. L. P. e Gareth Jones, E. B. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* n^o 2606 from a salt lake in the Bahamas. *Phytochemistry*, 59:469-471, 2002.

Lin, Z. J.; Lu, Z. Y.; Zhu, T. J.; Fang, Y. C.; Gu, Q. Q. e Zhu, W. M. Penicillenols from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56:217-221, 2008a.

Lin, Z.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q. e Zhu, W. Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, 69:1273-1278, 2008b.

Liu, J. Y.; Song, Y. C.; Zhang, Z.; Wang, L.; Guo, Z. J.; Zou, W. X. e Tan, R. X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, 114:279-287, 2004.

Maria, G. L.; Sridhar, K. R.; Raviraja, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, 1:67-80, 2005.

Marinho, A. M. R.; Rodrigues-Filho, E.; Moitinho, M. L. R.; Santos, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16:280-283, 2005.

Maskey, P. R.; Grun-Wollny, I. e Laatsch, H. Isolation and structure elucidation and biological activity of 8-O-methylaverufin and 1, 8-O-dimethylaverantin as new antifungal agents from *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Antibiotics*, 56:488-491, 2003.

Nam, Y. J.; Kim, K. H.; Know, Y. J.; Han, Y. N.; Son, H. K.; Lee, C. U.; Choi, D. J. e Know, M. B. 8-O-methylsclerotiorinamine antagonist of the Grb2-SH2 domain isolation from *Penicillium multicolor*. *Journal of Natural Products*, 63:1303-1305, 2000.

Peláez, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products- can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71:981-990, 2006.

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

Radu, S. e Kqueen, C. Y. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medicinal Sciences*, 9:23-33, 2002.

Rančić, A.; Sokovic, M.; Karioti, A.; Vukojevic, J. e Skaltsa, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22:80-84, 2006.

Rodrigues-Heerklotz, K. E.; Drandarov, K.; Heerklotz, J.; Hesse, M. e Werner, C. Guignardic acid, a novel type of secondary metabolites produced by the endophytic fungus *Guignardia* sp.: isolation, structure elucidation and asymmetric synthesis. *Helvetica Chimica Acta*, 84:3766-3772, 2001.

Shao, C.; She, Z.; Guo, Z.; Peng, H.; Cai, X.; Zhou, S.; Gu, Y. e Lin, Y. ¹H and ¹³C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus (ZSUH-36). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45:434-438, 2007.

Shin, D.; Oh, M.; Yang, H e Oh, K. Biological characterization of periconicins, bioactive secondary metabolites, produced by *Periconia* sp. OBW-15. *Journal of Microbiology and Biotechnonology*, 15:216-220,2005.

Stierle, A.; Strobel, G. e Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260:214–216, 1993.

Strobel, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22:315-333, 2002.

Wang, J.; Huang, Y.; Fang, M.; Zhang, Y.; Zheng, Z.; Zhao, Y. e Su, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34:51–57, 2002.

Wu, X.; Liu, X.; Jiang, G.; Lin Y. ; Chan, W. e Vrijimoed, L. L. P. Xyloketal G, a novel metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. 2508. *Chemistry of Natural Compounds*, 41: 27-29, 2005.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos de *Laguncularia racemosa*.

Linhagem	Fungo Endofítico	pH Final	Rendimento (mg)	Microrganismos-teste / Halo de Inibição (mm)					
				<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
FEL01	<i>Aspergillus niger</i>	1,8	50	-	-	-	19,75	10,5	-
FEL02	<i>Aspergillus niger</i>	2,1	30	-	-	-	15	-	-
FEL04	<i>Aspergillus niger</i>	1,7	30	14,25	12	12,5	27,5	14	-
FEL05	<i>Aspergillus niger</i>	1,7	30	13,75	11	11	26	10,5	-
FEL06	<i>Aspergillus niger</i>	1,7	10	-	10	-	21,5	-	-
FEL07	<i>Curvularia pallescens</i>	7,4	20	17	19,25	-	26,5	-	14,25
FEL08	<i>Fusarium</i> sp.	7,2	190	10	-	-	13,5	-	-
FEL10	<i>Guignardia bidwellii</i>	6,0	20	19,25	20,75	-	32	-	16,5
FEL11	<i>Guignardia bidwellii</i>	5,9	05	19,5	23,5	-	26,5	-	16,75
FEL14	<i>Paecilomyces variotii</i>	6,1	10	14	14,5	-	23,25	11,75	-
FEL15	<i>Paecilomyces variotii</i>	5,8	50	15,5	16,5	-	23,25	14,25	-
FEL17	<i>Paecilomyces variotii</i>	6,3	05	-	14,5	-	17,25	-	-
FEL18	<i>Paecilomyces variotii</i>	3,0	05	17,5	19,25	-	27,75	16,25	-
FEL19	<i>Paecilomyces variotii</i>	5,4	20	14	15,25	-	21,5	12,25	-
FEL24	<i>Paecilomyces variotii</i>	8,6	05	21	22	-	35	19	-
FEL25	<i>Paecilomyces variotii</i>	3,6	05	10	10,5	-	15	-	-
FEL29	<i>Paecilomyces variotii</i>	4,7	20	19,5	20,75	-	30,75	20	-
FEL30	<i>Paecilomyces variotii</i>	4,5	05	17,5	17,25	-	28,25	15,25	-
FEL32	<i>Paecilomyces variotii</i>	4,7	05	20,5	21,75	-	33	16,5	-
FEL48	<i>Penicillium</i> sp.	4,5	40	12,75	12,5	-	14	-	-
FEL50	<i>Trichoderma</i> sp.	7,6	90	-	-	-	17,75	-	-
FEL51	<i>Trichoderma</i> sp.	7,6	10	-	-	-	14,25	-	-
FEL52	<i>Trichoderma</i> sp.	7,8	05	-	-	-	13,5	-	-
FEL53	<i>Trichoderma</i> sp.	7,3	05	-	-	-	13,5	-	-
FEL54	<i>Trichoderma</i> sp.	7,4	50	-	-	-	17	-	-
FEL56	<i>Periconia</i> sp.	5,6	05	16	17,25	-	24,75	-	13,75
FEL60	<i>Mycelia Sterilia</i>	5,7	20	16,5	16,5	-	21,75	-	10,5
FEL63	Basidiomycota	5,6	20	15,75	17,25	-	21,25	-	12,25

Continuação...

Linhagem	Fungo Endofítico	pH Final	Rendimento (mg)	Microrganismos-teste / Halo de Inibição (mm)					
				<i>S.aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
FEL64	<i>Mycelia Sterilia</i>	6,7	20	12	10,75	-	15,5	-	-
FEL65	<i>Mycelia Sterilia</i>	6,4	10	10,75	10,5	-	15	-	-
FEL66	<i>Mycelia Sterilia</i>	8,1	10	19,5	21,5	-	28,75	-	16,25
FEL68	<i>Mycelia Sterilia</i>	4,7	40	16	18	-	21,25	-	11,75
FEL69	<i>Mycelia Sterilia</i>	5,7	10	12,25	16,5	-	25	-	-
FEL70	<i>Mycelia Sterilia</i>	4,9	20	14,25	15,5	-	20,75	-	10
Antibiograma									
Amicacina				R	S	S	S	R	S
Cefoxitina				S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino				R	S	S	S	R	R
Eritromicina				R	S	R	S	NT	R
Penicillina G				S	S	NT	S	R	NT
Tetraciclina				S	S	R	S	NT	S

-: Sem atividade Antimicrobiana

R- Resistente, I- Intermediário, S- Sensível

NT- Não Testado

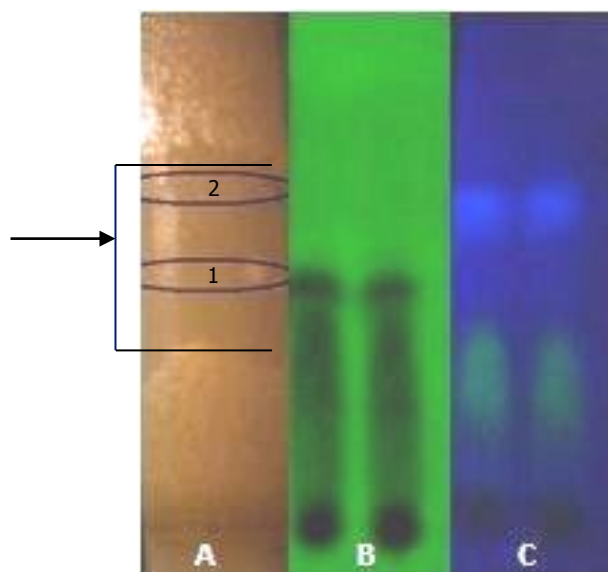


Figura 1. Cromatogramas do extrato bruto obtido da linhagem de *Paecilomyces variotii* FEL32: A) Revelação biológica frente a *B. subtilis*; B) Revelação em Iodo, mancha de Rf 0,48 (1); C) Revelação em UV, mancha de Rf 0,70 (2). → ☐ sem crescimento.

CAPÍTULO III



Isolamento de Viriditoxina de *Paecilomyces variotii*, um Endofítico de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Mangue-Branco, Combretaceae)

Autores: M.R.O. Silva¹; K. Kawai²; T. Hosoe²; G.M.C. Takaki³; N.B. Gusmão¹ e K. Fukushima⁴

Endereços: ¹Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Hoshi, Tóquio, Japão. ³Núcleo de Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. ⁴Universidade de Chiba, Chiba, Japão.

Resumo

O fungo endofítico *Paecilomyces variotii* FEL32 isolado de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. foi submetido à fermentação semi-sólida usando arroz tipo Japonês (Momiji®). O extrato bruto foi tratado com n-hexano a fim de remover a fração apolar e, posteriormente, com AcOEt (fase orgânica) e água (fase aquosa). A fase orgânica, responsável pela atividade antimicrobiana, teve um rendimento de 4 gramas e cromatografado em coluna de sílica gel 60, utilizando o gradiente de polaridade CHCl₃:MeOH (10:0→10:1, v/v). As frações obtidas foram reunidas conforme perfil cromatográfico e testadas frente à bactéria *B. subtilis*. O isolamento e a identificação de viriditoxina (6,6' binafto- α -pirona) foram feitos a partir dos cristais obtidos da fração solúvel em Et₂O (4 mg). Sua estrutura foi elucidada através de ressonância magnética nuclear Bruker AV-400 de alta resolução para ¹H a 400MHz e ¹³C a 100MHz e espectro de massa AccuTOF JMS-T100 acoplado com *Direct Analysis in Real Time* (DART). A concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) de viriditoxina foram avaliadas em bactérias patogênicas de relevância clínica, nas concentrações de 32 - 0,06 μ g/mL. Viriditoxina apresentou valores de CMI entre 0,5 e 2 μ g/mL e CMB entre 1 e 8 μ g/mL. A bactéria *S. aureus* UFPEDA 614 foi a mais sensível com CMI de 0,5 μ g/mL. *Micrococcus* sp. UFPEDA 610 e 611 foram inibidas com CMI de 2 e 1 μ g/mL, respectivamente. A bactéria *Enterococcus* sp. UFPEDA 620 foi inibida com CMI de 2 μ g/mL, contudo sua CMB foi de 8 μ g/mL. Para os isolados clínicos de *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativa UFPEDA 628, 629 e 630 os valores da CMI foram de 1, 2 e 2 μ g/mL e iguais ao da CMB, respectivamente.

Palavras-chave: *Paecilomyces variotii*; Viriditoxina; Naftopironas; Mangue

Autor para Correspondência: Michelle R. O. Silva, Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rêgo, s/n, 50670-901, + 55 81 21268346
mroseosilva@hotmail.com; michelle.rosilva@ufpe.br

1. Introdução

Endofíticos são organismos que passam uma parte ou todo seu ciclo de vida colonizando inter ou intracelularmente os órgãos e tecidos das plantas, dentre eles fungos, bactérias e actinobactérias (Tan e Zou, 2001). São reconhecidos por produzirem uma variedade de metabólitos, alguns dos quais ajudam a planta hospedeira a sobreviver às condições ambientais e outros ajudam a combater e mesmo prevenir infecções por patógenos (Strobel, 2002).

Os fungos endofíticos são excelentes produtores de metabólitos secundários com atividade biológica e desempenham papel fundamental da sustentabilidade dos ecossistemas e na biodiversidade (Huang *et al.*, 2001; Gunatilaka, 2006). Em consequência da sua amplitude metabólica e enzimática, são encontrados colonizando várias plantas vasculares e em diferentes habitats (Schulz *et al.*, 2002).

Os fungos endofíticos são descritos em várias publicações como encontrados em ambiente estuarino, porém esses estudos estão essencialmente relacionados à função ecológica desses microrganismos e a planta hospedeira (Suryanarayanan *et al.*, 1998; Suryanarayanan e Kumerasan, 2000; Kumerasan e Suryanarayanan, 2001; Ananda e Sridhar, 2002; Maria e Sridhar, 2003a; Maria e Sridhar, 2003b) poucos trabalhos investigam o potencial dos mesmos na descoberta de novos compostos e sua aplicação biotecnológica (Li *et al.*, 2004)

Com o surgimento de bactérias multiresistentes aos antibióticos como *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus* spp. torna

a busca por novas e melhores drogas uma necessidade constante, especialmente com o aumento do número de casos de AIDS, pacientes transplantados e imunodeprimidos (Strobel, 2002).

Com base no exposto, este trabalho é pioneiro no isolamento, caracterização e identificação de substância produzida pelo endofítico *Paecilomyces variotii* das folhas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Combretaceae), uma espécie de mangue com distribuição nas Américas e África, bem como sua atividade biológica frente a algumas bactérias patogênicas de importância clínica.

2. Material e Métodos

2.1 Fungo Endofítico

A linhagem do fungo endofítico *Paecilomyces variotii* FEL32 foi isolada das folhas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. (Mangue-branco, Combretaceae) encontrada no estuário do rio Paripe, Vila Velha, Ilha de Itamaracá, Pernambuco. A identificação fúngica foi baseada na observação das características macro e microscópicas segundo literatura específica (Samson, 1974). A manutenção da linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ e depositado na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

2.2 Condições de Cultivo

A linhagem de *P. variotii* FEL32 foi crescida em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA a temperatura de 30°C por 03 dias. Em seguida, 2mL de uma suspensão de 5×10^4 conídios/mL foram transferido para frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL do meio caldo Sabouraud (SAB) e incubados sob agitação de 200 rpm, a temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Em seqüência, o pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 100g de arroz tipo japonês (Momiji®) como substrato sólido e incubados a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ durante 18 dias sob condição estática.

2.3 Extração e Obtenção do Extrato Bruto

Os metabólitos secundários produzidos durante a fermentação semi-sólida foram extraídos utilizando o sistema de solvente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1, v/v). Em cada frasco Erlenmeyer foram adicionados 250 mL do sistema de solvente e levados ao sonificador por 40 min. (2x). O solvente extrator foi separado do substrato sólido por filtração a vácuo e depois, concentrado sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotatório à temperatura de 45°C ($\pm 2^\circ$). O extrato bruto foi tratado com 100 mL de n-hexano a fim de remover a fração apolar, óleos e graxas e então foi solubilizado em AcOEt (500mL) obtendo-se a fase orgânica e, em seguida, adicionado 500mL de água destilada obtendo-se a fase aquosa. Para acompanhar a atividade antibacteriana da substância foi realizado o teste de difusão em disco de papel tanto da fase orgânica quanto da fase aquosa frente à bactéria Gram-positiva *B. subtilis*.

2.4 Pré-Purificação do Extrato Bruto

A fase orgânica, responsável pela atividade antimicrobiana, teve um rendimento de 4 gramas após ser concentrada a vácuo e mantida em dessecador. Em seguida, o extrato AcOEt foi solubilizado em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) e submetido a cromatografia em coluna de sílica gel (Sílica Gel 60 / 70-230 mesh, Macherey-Nagel® Alemanha) utilizando o gradiente de polaridade $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (10:0→10:1, v/v) obtendo-se 9 frações. A biocromatografia frente à *B. subtilis* revelou que apenas a fração 5 (1,4 g) apresentou atividade antimicrobiana e foi, posteriormente, submetida a cromatografia em coluna e eluída com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (10:0→10:3, v/v) obtendo-

se 9 frações das quais as frações 3, 4, 5 e 6 apresentaram atividade antimicrobiana. Essas frações foram combinadas e novamente submetida em coluna de sílica gel utilizando o gradiente de polaridade CHCl_3 :Acetona:MeOH (10:1:0→10:0:3, v/v) obtendo-se 30 frações. Essas últimas foram aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel (Si250F, 20x20 cm) com indicador fluorescente (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, Nova Jersey, USA) utilizando o sistema CHCl_3 :MeOH (10:3, v/v), reunidas conforme perfil cromatográfico e testadas frente a *B. subtilis*. As frações foram agrupadas nas seguintes sub-frações: A (Frações 10-14), B (Frações 15 e 16), C (Frações 17 e 18), D (Frações 19-24) e E (Frações 25-27).

2.5 Isolamento e Identificação de Viriditoxina

As sub-frações A, B, C e D foram concentradas e separadas em dois tipos: solúveis e não-solúveis em Et_2O . As frações solúveis em Et_2O foram denominadas As, Bs, Cs e Ds enquanto que as frações insolúveis foram denominadas Ap, Bp, Cp e Dp. A atividade antimicrobiana frente à *B. subtilis* foi confirmada para todas as frações. O isolamento e a identificação de viriditoxina foram feitos a partir dos cristais obtidos da fração As (4 mg). Sua estrutura foi elucidada através de ressonância magnética nuclear Bruker AV-400 de alta resolução para ^1H a 400MHz e ^{13}C a 100MHz, bem como informações fornecidas pelo espectro de massa AccuTOF JMS-T100 acoplado com *Direct Analysis in Real Time* (DART) (JEOL Ltd., Tóquio, Japão). Os espectros de massa e de ressonância magnética nuclear foram medidos pelos Professores Ken-ichi Kawai e Tomoo Hosoe, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,

Universidade de Hoshi, Tóquio, Japão, sob a supervisão do Professor Kazutaka Fukushima, Universidade de Chiba, Chiba, Japão.

2.6 Ensaio Antimicrobiano

A concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) foram determinadas de acordo com as normas do protocolo M7-A6 recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003) frente às seguintes bactérias *Micrococcus* sp. UFPEDA 610, *Micrococcus* sp. UFPEDA 611, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 614, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 618, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 619, *Enterococcus* sp. UFPEDA 620, *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativa UFPEDA 628, *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativa UFPEDA 629 e *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativa UFPEDA 630 obtidas da Coleção de Cultura Microbiana, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 1). Viriditoxina foi testada nas concentrações de 32 - 0,06 µg/mL, de acordo com Wang *et al.* (2003) e a CMI foi definida como sendo a menor concentração da substância que inibe o crescimento visível da bactéria.

3. Resultados e Discussão

A substância majoritária resultante da fermentação do arroz japonês pelo endofítico *P. variotii* FEL32 e também responsável pela atividade antibacteriana frente a *B. subtilis* foi isolada a partir da fração solúvel em éter etílico na forma de um pó amarelo e, posteriormente, identificada como viriditoxina. Essa substância foi previamente isolada e caracterizada do micélio de *Aspergillus viridi-nutans* NRRL 4365 (Weisleder e Lillehoj, 1971; Lillehoj e Ciegler, 1972) e depois de *A. viridi-nutans* NRRL 576 e *A. brevipes* NRRL 4078 (Lillehoj e Milburn, 1973).

O gênero *Paecilomyces* inclui muitas espécies que são capazes de produzir metabólitos secundários pertencentes a grupos químicos distintos e com ampla atividade biológica, tais como leucinostatinas A, D, H e K (Mori *et al.*, 1982; Rossi *et al.*, 1987; Radies *et al.*, 1987); esfingofunginas E e F (Horn *et al.*, 1992); paecilquinonas (Petersen *et al.*, 1995); ergosterol (Nam *et al.*, 2001); brefeldina A (Wang *et al.*, 2002); paecilosetina (Lang *et al.*, 2005); paecilaminol (Ui *et al.*, 2006); paecilodepsipeptídeo A (Isaka *et al.*, 2007). Recentemente, da linhagem endofítica *Paecilomyces* sp. isolada da casca do mangue na China foram obtidas duas novas substâncias denominadas paecilina A e B, porém sua atividade biológica ainda não foi determinada (Guo *et al.*, 2007).

A determinação estrutural de viriditoxina demonstra que essa substância é um dímero (6,6' binafto- α -pirona) (Figura 1) de fórmula $C_{34}H_{30}O_{14}$ e peso molecular 662. Além disso, os espectros de 1H e ^{13}C -RMN do composto

isolado foram idênticos aos apresentados no trabalho de Weisleder e Lillehoj (1971), confirmando a estrutura de viriditoxina.

Formas mono e diméricas das naftopironas apresentam-se geralmente como pigmentos amarelos e é produto resultante do metabolismo secundário de algumas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e, ainda, algumas plantas (Priestap, 1984; Ernst-Russell *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2000). O fungo *P. variotii* é reconhecido por produzir naftopironas, em especial viriditoxina e seus derivados (Green *et al.*, 1989; Ayer *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 2000; Tan e Donner, 2009). Contudo, este trabalho é o primeiro relato da produção de viriditoxina pelo endofítico *P. variotii* isolado de ambiente estuarino.

A literatura cita que algumas naftopironas possuem propriedades anticâncer, antibacteriana, antifúngica e anti-inseticida (Green *et al.*, 1989; Hatano *et al.*, 1999; Yada *et al.*, 2001). Song *et al.* (2004) isolaram 04 naftopirones do fungo *Aspergillus niger* IBF-E003 das folhas de *Cynodon dactylon* e todos os compostos apresentaram atividade antimicrobiana para *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescense*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*.

Em nosso trabalho, a atividade antimicrobiana de viriditoxina foi avaliada frente a bactérias patogênicas de relevância clínica. Os valores da CMI e CMB são mostrados da tabela 2. Viriditoxina apresentou atividade antibacteriana para todos os isolados clínicos, com valores de CMI entre 0,5 e 2 µg/mL e CMB entre 1 e 8 µg/mL. A bactéria *S. aureus* UFPEDA 614 foi a mais sensível com CMI de 0,5 µg/mL. *Micrococcus* sp. UFPEDA 610 e 611 foram inibidas com CMI de 2 e 1 µg/mL, respectivamente. A bactéria *Enterococcus* sp. UFPEDA 620 foi inibida com CMI de 2 µg/mL, contudo sua

CMB foi de 8 µg/mL. Para os isolados clínicos de *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativa UFPEDA 628, 629 e 630 os valores da CMI foram de 1, 2 e 2 µg/mL e iguais ao da CMB, respectivamente.

Os resultados aqui apresentados apontam valores menores da CMI em relação ao trabalho de Wang *et al.* (2003). Neste trabalho, viriditoxina foi produzida pela linhagem de *Aspergillus* sp. MF6890 e testada contra várias bactérias patogênicas, inclusive multi-resistentes a antibióticos como tetraciclina, quinolonas e macrolídeos. Os valores da CMI foram de 4 e 8 µg/mL para *S. aureus* metilicina sensível e de 8 µg/mL para *S. aureus* metilicina resistente, assim como valores de 2 a 8 µg/mL para *Staphylococcus* sp. coagulase negativa e de 4 a 16 µg/mL para *Enterococcus* sp.

O mecanismo de ação de viriditoxina dá-se através da inibição da polimerização da proteína FtsZ, uma GTPase homóloga a β -tubulina e essencial para o processo de divisão celular bacteriana (Lock e Harry, 2008; Tan e Donner, 2009). FtsZ é a mais abundante de todas as proteínas que participam da divisão celular, com aproximadamente 10.000-20.000 cópias por bactéria. A primeira etapa do processo de duplicação celular consiste na polimerização da FtsZ, todavia a substância viriditoxina bloqueia esta etapa ocasionando a morte da célula bacteriana.

Segundo Wang *et al.* (2003), o amplo espectro de atividade de viriditoxina, incluindo espécies de *S. aureus* metilicina resistente e *Enterococcus* vancomicina resistente indica um alto grau de conservação da proteína FtsZ entre as bactérias, limitando a habilidade de desenvolverem resistência. Dessa forma, FtsZ torna-se um excelente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos com diferente mecanismo de ação.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro, a Profa. Galba Maria Campos-Takaki do Núcleo de Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco e ao Prof. Kasukata Fukushima pelo apoio técnico e intelectual.

4. Referências

- Ananda, K. e Sridhar, K. R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of Índia. *Canadian Journal of Microbiology*, 48:871-878, 2002.
- Ayer, W.A.; Craw, P.A. e Nozaka, K. Two 1H-naphtho[2,3-c] pyran-1-one metabolites from the fungus *Paecilomyces variotii*. *Canadian Journal of Chemistry*, 69:189-191, 1991.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). *Metodologias dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico (M7-A6)*. v 23, 6ªEd., 2003.
- Coelho, R.G.; Vilegas, W.; Devienne, K.F. e Raddi, M.S. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. *Fitoterapia*, 71:497-500, 2000.
- Ernst-Russell, M.A.; Chai, C.L.L.; Wardlaw, J.H. e Elix, J.A. Euplectin and coneuplectin, new naphthopyrones from the lichen *Flavoparmelia euplecta*. *Journal of Natural Products*, 63:129-131, 2000.
- Green, P.E.; Blaney, B.J.; Moore, C.J. e Connole, M.D. Identification and preliminary evaluation of viriditoxin, a metabolite of *Paecilomyces variotii* as a insecticide for sheep blowfly *Lucilia cuprina* Wied. *Genetic and Applied Entomology*, 21:33-37, 1989.
- Gunatilaka, A.A.L. Natural products from plant-microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69:509-526, 2006.
- Guo, Z.; She, Z.; Shao, C.; Wen, L.; Liu, F.; Zheng, Z. e Lin, Y. ¹H and ¹³C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45:777-780, 2007.
- Hatano, T.; Uebayashi, H.; Ito, H.; Shiota, S.; Tuchiya, T e Yoshida, T. Phenolic constituents of *Cassia* seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, 47:1121-1127, 1999.
- Horn, W.S.; Smith, J.L.; Bills, G.F.; Raghoobar, S.L.; Helms, G.L.; Kurtz, M.B.; Marrinan, J.A.; Frommer, B.R.; Thornton, R.A. e Mandala, S.M. Sphingofungins

E and F: novel serinepalmitoyl transferase inhibitors from *Paecilomyces variotii*. *Journal of Antibiotics*, 45:1692–1696, 1992.

Huang, Y.J.; Wang, J.F.; Li, G.L.; Zheng, Z.H. e Su, W.J. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 31: 163–167, 2001.

Isaka, M.; Palasan, S.; Lapanun, S. e Sriklung, K. Paecilodepsipeptide A, na antimalarial and antitumor cyclohexadepsipeptideo from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces cinnamomeus* BCC9616. *Journal of Natural Products*, 70:675-678, 2007.

Kumerasan, V. e Suryanarayanan, T.S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycological Research*. 105: 1388-1391, 2001.

Lang, G.; Blunt, J.W.; Cummings, N.J.; Cole, A.L.J. e Munro, M.H.G. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Natural Products*, 68:810-811, 2005.

Li, H.; Lin, Y.; Yao, J.; Vrijimoed, L.L.P. e Gareth Jones, E.B. Two new metabolites from the mangrove endophytic fungus nº 2524. *Journal of Asian Natural Products Research*, 6:185-191, 2004.

Lillehoj, E.B. e Ciegler, A. A toxic substance from *Aspergillus viridi-nutans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18:193-197, 1972.

Lillehoj, E.B. e Milburn, M.S. Viriditoxin production by *Aspergillus viridi-nutans* and related species. *Applied Microbiology*, 26:202-205, 1973.

Lock, R.L. e Harry, E.J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nature Review*, 7:324-338, 2008.

Maria, G.L. e Sridhar, K.R. Diversity of filamentous fungi on Woody litter of five mangrove plant species from the southwest coast of India. *Fungal Diversity*, 14: 109-126, 2003a.

Maria, G.L. e Sridhar, K.R. Endophytic fungi assemblage of two halophytes from west coast mangrove habitats, India. *Czech Mycology*, 55:241-151, 2003b.

Mori, Y.; Tsuboi, M.; Suzuki, M.; Fukushima, K. e Arai, T. Isolation of leucinostatin A and one of its constituents, the new amino acid, 4-methyl-6-(2-

oxobutyl)-2-piperidinecarboxylic acid, from *Paecilomyces lilacinus* A-267. *Journal of Antibiotics*, 35:543–544, 1982.

Nam, K.S.; Jo, Y.S.; Kim, Y.H.; Hyun, J.W. e Kim, H.W. Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sciences*, 69:229-237, 2001.

Petersen F., Fredenhagen A., Mett H., Lydon N.B., Delmendo R., Jenny H.B. e Peter H.H. Paecilquinones A, B, C, D, E and F: new potent inhibitors of protein tyrosine kinases produced by *Paecilomyces carneus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 48:191–8, 1995.

Priestap, H.A. New naphthopyrones from *Aspergillus fonsecaeus*. *Tetrahendron*, 40:3617-3625, 1984.

Radics, L.; Kajtar-Peredy, M.; Casinovi, C.G.; Rossi, C.; Ricci, M. e Tuttobello, L. Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine-oxide terminal group from *Paecilomyces marquandii* isolation, structure and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 40:714–6, 1987.

Rossi, C.; Tuttobello, L.; Ricci, M.; Casinovi, C.G. e Radics, L. Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paecilomyces marquandii*. *Journal of Antibiotics*, 40:130–133, 1987.

Samson, R.A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1- 119, 1974.

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

Song, Y.C.; Li, H.; Ye, Y.H.; Shan, C.Y.; Yang, Y.M. e Tan, R.X. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xantine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*, 241:67-72, 2004.

Strobel, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22:315-333, 2002.

Suryanarayanan, T.S. e Kumerasan, V. Endophytic fungi of some halophytes from a estuarine mangrove forest. *Mycological Research*, 104:1465-1467, 2000.

Suryanarayanan, T.S.; Kumerasan, V. e Johnson, J.A. Foliar fungal endophytes from two species of mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 1003-1006, 1998.

Tan, N.P.H. e Donner, C.D. Total synthesis and confirmation of the absolute stereochemistry of semiviriditoxin, a naphthopyrone metabolite from the fungus *Paecilomyces variotii*. *Tetrahedron*, 65:4007-4012, 2009.

Tan, R.X. e Zou, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports*, 18:48-459, 2001.

Ui, H.; Shiomi, K.; Suzuki, H.; Hatano, H.; Morimoto, H.; Yamaguchi, Y.; Masuma, R.; Sakamoto, K.; Kita, K.; Miyoshi, H.; Tomoda, H.; Tanaka, H e Omura, S. Paecilaminol, a new NADH-fumarate reductase inhibitor produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. *Journal of Antibiotics*, 59:591-596, 2006.

Wang, J.; Galgoci, A.; Kodali, S.; Herath, K.B.; Jayasuruya, H.; Dorso, K.; Vicente, F.; González, A.; Cully, D.; Bramhill, D. e Singh, S. Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. *The Journal of Biological Chemistry*, 45:44424-44428, 2003.

Wang, J.; Huang, Y.; Fang, M.; Zhang, Y.; Zheng, Z.; Zhao, Y. e Su, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34:51–57, 2002.

Weisleder, D. e Lillehoj, E.B. Structure of viriditoxina, a toxic metabolite of *Aspergillus viridi-nutans*. *Tetrahedron Letters*, 48:4705-4706, 1971.

Yada, H.; Sato, H.; Toshima, H.; Deura, M. e Ichihara, A. Semivioxanthin, a new abscisic active compound against Hinoki cypress leaves isolated from *Cryptosporiopsis abietina*. *Bioscience and Biotechnological Biochemistry*, 65: 484-486, 2001.

Tabela 1. Lista das bactérias usadas para o teste de atividade antimicrobiana.

Microrganismo	Número de Registro	Origem
<i>Micrococcus</i> sp.	UFPEDA 610	Urocultura
<i>Micrococcus</i> sp.	UFPEDA 611	Urocultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA 614	Hemocultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA 618	Hemocultura
<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA 619	Hemocultura
<i>Enterococcus</i> sp.	UFPEDA 620	Úlcera
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativo	UFPEDA 628	Hemocultura
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativo	UFPEDA 629	Urocultura
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativo	UFPEDA 630	Hemocultura

UFPEDA- Coleção de Cultura Microbiana, Departamento de Antibióticos, UFPE.

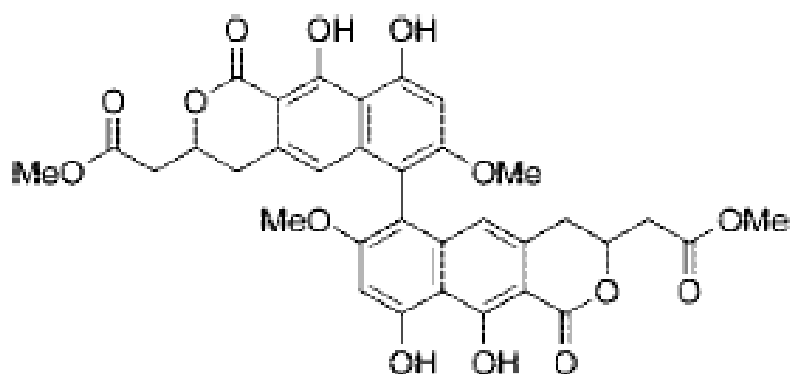


Figura 1. Estrutura molecular de viriditoxina.

Tabela 2. Valores da CMI e da CMB da substância viriditoxina frente às bactérias.

Microrganismo	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	CMB ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Micrococcus</i> sp. UFPEDA 610	2	2
<i>Micrococcus</i> sp. UFPEDA 611	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 614	0,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 618	2	2
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA 619	1	2
<i>Enterococcus</i> sp. UFPEDA 620	2	8
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativo UFPEDA 628	1	1
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativo UFPEDA 629	2	2
<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulase Negativo UFPEDA 630	2	2

