

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Fabiana do Nascimento Pedrozo¹, Roseli Aparecida de Mello².

1 Acadêmico do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná; (Curitiba, PR)

2 Bióloga, Prof^a. Dra. Universidade Tuiuti .

Endereço para correspondência: Roseli Aparecida de Mello, roseli.mello@utp.br

RESUMO: O presente projeto visa o isolamento de microrganismos endofíticos de folhas sadias da planta erva mate com possíveis propriedades farmacológicas, entre elas podemos destacar as atividades antimicrobianas contra patógenos humanos. O objetivo principal foi o isolamento de microrganismos endofíticos de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) de acordo com metodologias clássicas com potencial antibacteriano.

Foram realizados testes para avaliar a atividade de antibiose dos metabolitos secundários dos microrganismos isolados. Esta pesquisa faz-se necessária para determinar quais microrganismos (bactérias) que possuíam atividade antimicrobiana e contra quais microrganismos patogênicos estas propriedades farmacológicas agem causado um efeito inibidor.

Palavras-chave: Potencial Antimicrobiano¹, Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.)², Isolamento de Microrganismos Endofíticos³.

ABSTRACT This project aims at the isolation of endophytic microorganisms from healthy leaves of the plant can mate with pharmacological properties, and they can highlight the antimicrobial activities against human pathogens. The main objective was the isolation of endophytic microorganisms from leaves of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) according to conventional methods with potential antibacterial.

Tests were performed to assess the antibiosis activity of the secondary metabolites of microorganisms isolated. This research is necessary to determine which microorganisms (bacteria) that has antimicrobial activity against pathogenic microorganisms that these pharmacological properties act caused an inhibitory effect.

Keywords: Potential Antimicrobiano ¹, Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) ², Isolation of Microorganisms Endofíticos ³.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo à base da medicina popular e, atualmente, cerca de 30% dos fármacos utilizados são de origem vegetal. Isto se deve, em parte, à grande variedade de espécies de plantas com propriedades biológicas. Nos últimos anos, tem-se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins. Acredita-se que cerca de 80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (SILVA; FILHO, 2002).

Os efeitos farmacológicos benéficos oriundos das plantas medicinais resultam da produção de metabolitos primários e secundários. Estes compostos tais como alcalóides, terpenóides, quinonas,

taninos, cumarinas, flavonóides, polipeptídeos, entre outros, podem estar presentes em todos os tecidos vegetais. Estas substâncias são muito complexas e são encontradas em níveis variados em diferentes famílias, gêneros e espécies de plantas brasileiras. (MAZUCHOWSKI, 1996,1997,1998; ATTISERAFINI et. al., 2002).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) é uma planta pertencente à família Aquifoliaceae. Essa família é considerada cosmopolita, ocorrendo em quase todas as regiões do planeta, totalizando um total de 600 espécies (GILBERT, 1995). A erva-mate é a principal espécie comercial plantada e explorada no Cone Sul, em países como Argentina, Brasil e Paraguai. É um importante produto natural no contexto socioeconômico e cultural na América do Sul e, principalmente, no Brasil. A região sul do País é a maior produtora de erva mate (ESMELINDRO et al., 2002) e sua importância concentra-se principalmente na área de bebidas por infusão, como chás, chimarrão, tererê e sucos (CARVALHO, 1994). A planta *I. paraguariensis* é uma espécie umbrófila, de clima temperado subtropical, com chuvas regularmente distribuídas ao longo do ano (CARVALHO, 1994). Ocorre naturalmente em solos profundos, bem drenados, ligeiramente ácidos, mas não tolera solos alagados e muito compactados.

O consumo do chá descende de um costume indígena, que o utilizava como estimulante. Muitos estudos têm sido feitos a respeito da utilização de produtos e subprodutos da erva-mate em outras aplicações. Dentre as já existentes, temos a utilização como conservante e corante natural, estimulante do sistema nervoso e no tratamento de hipertensão, bronquite e pneumonia, bactericida, como esterilizante natural e na fabricação de cosméticos (BASSANI; CAMPOS, 1997). Como o ambiente típico da erva-mate é a Mata Atlântica, floresta com grande biodiversidade, isso pode explicar as diferenças morfológicas visíveis nas plantas.

Além, das aplicações citadas acima a erva-mate possui inúmeras propriedades farmacológicas decorrentes da composição química de suas folhas, entre elas pode-se destacar as atividades anti-inflamatória, oxidantes e diuréticas.

As características biológicas da erva mate são decorrentes de vários fatores como, por exemplo, os fatores climáticos, características do solo, variações genéticas (COELHO et al., 2002), ou ainda pela presença ou ausência de microrganismos endofíticos (MELO; AZEVEDO, 1998).

Segundo Petrini (1991), microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas pelo menos durante um período do ciclo de vida da mesma sem lhes causar danos ou doença. Essa interação microrganismo-planta é tão íntima que tem sido sugerido como um processo coevolutivo entre plantas e patógenos. Muitas espécies destes microrganismos apresentam a capacidade de sintetizar compostos que inibem ou são antagônicos a insetos e a microrganismos patogênicos.(MACCHERONI et al., 2004). A produção de metabolitos primários e secundários pelos microrganismos é conhecida há muito tempo e explorado do ponto de vista biotecnológico. Os exemplos mais conhecidos são os antibióticos. Do ponto de vista biológico, a produção deste princípio

ativo pode estar associada com a interação entre os microrganismos e seu habitat (MACCHERONI et al., 2004).

Nas plantas medicinais a presença de microrganismos endofíticos não é diferente, podendo ser facilmente isolados em meios de cultivo simples. Os endófitos têm sido descritos como protetores contra o ataque de outros microrganismos, insetos, e animais herbívoros, devido à produção de toxinas (PILEGGI, 2002). Podem, ainda, produzir fitormônios, enzimas e outros compostos químicos como antimicrobianos, oferecendo vantagens à planta hospedeira, enquanto se desenvolvem em seu interior. O princípio ativo antimicrobiano poderia ser produzido pelo microrganismo e não propriamente pelo vegetal, ou então seus efeitos terapêuticos somente seriam constatados devido à estreita associação planta-hospedeiro (PILEGGI, 2002).

Na literatura encontram-se algumas referências de estudos envolvendo microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais, mas poucas utilizando erva mate, a qual apresenta alto potencial farmacológico. Segundo Pimentel et al. (2006), os fungos endofíticos encontrados em plantas de erva mate podem agir de maneira antagônica, neutra ou até benéfica para o vegetal hospedeiro, exibindo vários graus de interdependência fisiológica e ecológica. Muitas vezes, os metabólitos produzidos por fungos endofíticos podem ser neutros ou terem ação antagônica para o hospedeiro. Em outros casos, são de grande importância para a farmacologia.

Desta forma, justifica-se o interesse em elucidar aspectos da biologia destes microrganismos, para compreender melhor a sua relação com a planta hospedeira e seu papel na produção de novos fármacos.

A planta erva mate possui no seu interior um série de microrganismos endofíticos com propriedades farmacológicas, entre elas podemos destacar as atividades antimicrobianas contra patógenos humanos. Esta pesquisa faz-se necessária para determinar quais fungos possuem atividade antimicrobiana e contra quais microrganismos patogênicos estas propriedades farmacológicas agem causado um efeito inibidor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico

Foram coletadas amostras de erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (CNPQ) da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), no município de Colombo, PR, entre março e abril de 2009. Para a coleta do material foi realizada uma seleção aleatória de cinco diferentes plantas adultas e sendo escolhidos os ramos das árvores de aspecto sadio.

Microrganismos teste

Os microrganismos utilizados foram as bactérias Gram-negativas (tabela 1), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (figura 2), *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 (figura 6), *Shigella Flexneri* ATCC 12022 (figura 1), *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 (figura 5), *Escherichia Coli* ATCC

25922 (figura 30) e *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 (figura 4). Estas, foram reativadas por hidratação em tubos de ensaio que continham 10 ml de solução de TBA, cada. Após a primeira hidratação, as bactérias ficaram por 1 *over night* de 12 horas em estufa a 37°C, sendo transferidas com uma alçada para um novo tubo contendo o TBA e novo *over night* de 12 horas. Este processo repetiu-se por 3 vezes. As culturas estoque foram mantidas a 8°C para conservação.

Tabela 1. Microrganismos padrão ATCC.

MIICROORGANISMO	ATCC
<i>Salmonella Typhimurium</i>	14028
<i>Escherichia Coli</i>	25922
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	27853
<i>Shigella Flexneri</i>	12022
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	13883
<i>Enterobacter Clocae</i>	13047

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas. Após a coleta foram lavados abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos, matéria orgânica e resíduos sólidos. Antes do processo de desinfecção externa, os pecíolos foram vedados com parafina, a fim de evitar que os agentes de desinfecção penetrem por essa abertura, alterando o resultado real do isolamento. Em seguida, em câmara asséptica, as folhas foram lavadas em água destilada esterilizada por duas vezes e posteriormente o material foram imerso em álcool 70% por 1 minuto, em seguida em hipoclorito 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, para retirar o excesso de hipoclorito. Então o material foram lavado três vezes em água destilada estéril da qual foram retirado 50 µL para fazer o controle da assepsia (SOUZA et. al., 2004).

As folhas cortadas em fragmentos circulares de aproximadamente 6 mm. Estes fragmentos transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo Agar sabouraud (AS) acrescido de tetraciclina (100mg/L) para isolamento de fungos. As placas com os fragmentos foram incubadas a 28°C por 13 dias. Para conservar as colônias fúngicas isoladas, utilizou-se meio inclinado Agar sabouraud.

O crescimento das colônias fúngicas foram acompanhado diariamente. À medida que surgirem, transferidas para tubos de ensaio contendo AS inclinado para fungos e tubos de ensaio contendo TSA inclinado para bactérias, e cultivados a temperatura ambiente (28 ± 2 °C), e depois armazenadas a 4°C.

Screening de Atividade Antimicrobiana

Para observar a atividade antibacteriana das amostras de microrganismos endofíticos, empregadas duas metodologias descritas por Mariano (1993). As linhagens referência, provenientes da ATCC (American Type Culture Collection), cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná. Estas linhagens de fungos, foram escolhidas aleatoriamente. Após cultivados por treze dias em placas de Petri com meio AS retirados fragmentos do meio com 6 x 6 mm para fermentação em 10 mL de caldo Sabouraud (acrescido de 0,2% de extrato de levedura) a 28 °C, a 120 r.p.m., por oito dias. Decorrido este tempo, o micélio foi separado do meio metabólico por filtração em papel. O líquido foi novamente filtrado em membrana millipore (0,22 µm ou 0,45 µm) e armazenado a 4 °C para realização dos ensaios antimicrobianos.

Realizados testes semi-quantitativos, em duplicata, *in vitro*, para avaliar a antibiose dos metabólitos extracelulares presentes nos meios fermentados contra as linhagens-teste. A metodologia utilizada foi a do líquido metabólico, também conhecido como método do filtrado ou para detecção de antibióticos (KAWAMOTO; LORBEER, 1976). As linhagens dos microrganismos-teste, cultivadas em meios líquidos, semeadas com alça de Drigalski (50 µL) em placas de Petri contendo o meio específico para cada uma (cup plate). aplicados 100 µL do líquido metabólico em poços de 8 mm seguindo-se a incubação por 24-72 horas. Os resultados registrados considerando-se os valores médios das três repetições.

O filtrado obtido foi centrifugado e a partir do filtrado livre de células procedeu-se a verificação antimicrobiana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho foram divididos em duas etapas. A primeira, foi o isolamento dos fungos endofitos através da incubação de 350 fragmentos de folhas sadias de erva mate, cujo 90% dos fragmentos representando uma alta frequência de isolamento, superior aos fungos isolados por Rodrigues (1994). Onde estes, conseguiram um média de 30% de isolados endofíticos .

Segundo MUSSON (1994), o total de bactérias endofíticas que invadem os tecidos das plantas é provavelmente controlado pela planta e condições ambientais.

A estreita relação entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros faz com que sejam candidatos naturais a serem usados como agentes de controle de doenças. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante aqueles ocupados por patógenos os microrganismos endofíticos apresentam potencial para o controle biológico (HALLMANN et al. 1997a)

A maior diversidade de fungos endofíticos nas folhas adultas, em ambos os tratamentos, está provavelmente relacionada com o maior tempo de colonização do endofito do que o das folhas jovens. (PEREIRA et al., 1993; PETRINI, 1991; RODRIGUES; SAMUELS, 1994).

Os fungos endofíticos podem agir de maneira antagônica, neutra ou até benéfica para o vegetal hospedeiro, exibindo vários graus de interdependência fisiológica e ecológica.

Existem pesquisas que comprovam a ação antioxidante, de grande importância para a indústria de cosméticos (STROBEL et al.,2002), e antitumorais, que podem parar o desenvolvimento ou até impedir a formação de tumores (STROBEL et al., 1997), visto que a aplicação desses microrganismos na serão benéficos para o crescimento de plantas, na fixação biológica de nitrogênio, no controle biológico e como vetores de genes de resistência.

Os microrganismos podem produzir uma variedade muito grande de metabólitos, tanto primários quanto secundários, entre eles podemos citar: incluindo enzimas; aminoácidos; vitaminas, antibióticos, pigmentos; agentes moduladores de respostas imunológicas; toxinas; fatores de crescimento de plantas antiparasitários (ALEXOPOULOS, 1996).

Dos líquidos metabólicos das folhas da *I. paraguariensis* linhagens de fungos endofíticos foram selecionadas para os ensaios de antagonismo “in vitro”, (90 %) de acordo com a tabela 2 apresentaram atividades antagônicas frente a um ou mais microrganismo-teste utilizados nestes ensaios .

Das bactérias isoladas, a *Pseudomonas Aeruginosa* (figura 4) não apresentou halo de inibição como também não obtendo atividade antimicrobiana.

No isolamento de bactérias *Salmonella Typhimurium* (figura 5), *Escherichia Coli* (figura 3), *Shigella Flexneri* (figura 1), *Klebsiella Pneumoniae* (figura 2) e *Enterobacter Clocae* (figura 6), apresentaram atividade antimicrobiana e houve formação de halos de inibição (tabela 2), foi observada uma comunidade bacteriana constituída basicamente de dois grupos: amarelas e brancas. O grupo morfológico das bactérias amarelas apresentou menos freqüência de isolamento em relação ao grupo morfológico das brancas de incidência maior.



Figura 1 - *Shigella Flexneri*



Figura 2 - *Klebsiella Pneumoniae*

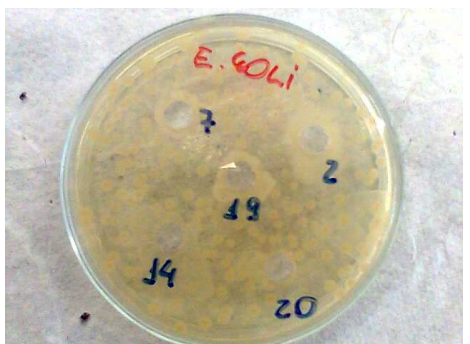


Figura 3 - *Escherichia Coli*



Figura 4- *Pseudomonas Aeruginosa*

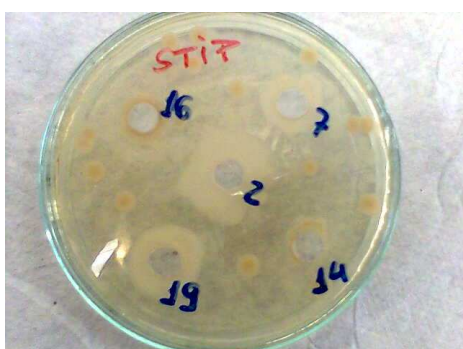


Figura 5 - *Salmonella Typhimurium*



Figura 6 - *Enterobacter Clocae*

Neste trabalho, não foi possível fazer a identificação dos fungos endolíticos isolados, para tanto os isolados foram denominados de fungos endofíticos selvagens e desta forma classificamos em B (branco contendo álcool 70%), F1, F2, F5, F7, F8, F11, F14, F16, F19, F20, F21 e F24 (tabela 1). Segundo SOUZA (2004) a identificação completa dos fungos endofíticos não é fácil, devido à carência de especialistas em taxonomia das diferentes espécies e de conhecimento sobre seus micro *habitat*, podendo haver, entre eles muitas espécies inéditas.

Tabela 2. Fungos endolíticos isolados e os microrganismos teste com sua atividade antagonista.

Fungos Selvagens	Microrganismos teste					
	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Shigella Flexneri</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Enterobacter Clocae</i>
Branco	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
F1	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
F2	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
F5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
F7	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
F8	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
F11	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
F14	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
F16	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
F19	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

F20	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
F21	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
F24	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo

O presente projeto selecionou as bactérias (tabela 1) devido seu potencial microbiano em bactérias gram negativas levando a este o isolamento, caracterização, de biodiversidade e conservação da microbiota endofítica podendo levar a obtenção de linhagens de interesse biotecnológico.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados da atividade antimicrobiana dos extratos metabólicos dos fungos isolados com os microorganismos *Enterobacter Clocae*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae* e *Shigella Flexneri* apresentaram, atividade microbiana e *Pseudomonas Aeruginosa* foi verificado a ausência de antagonismo microbiano.

Por ser um trabalho de grande extensão e com inúmeros detalhes, não houve tempo hábil para identificar os fungos endofíticos selvagens, mas poderá ser feito futuramente em outros estudos detalhados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTISERAFINI, L.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2002.

BASSANI, V. L.; CAMPOS, A. M. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae (erva mate) visando a exploração do potencial do vegetal como fonte de produtos. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA MATE, 1., REUNIÃO TÉCNICA DA ERVA MATE, 2., 1997, Curitiba, **Anais...** Colombo: EMBRAPA/CNPF, 1997, p.69-87. (EMBRAPA/CNPF, Documentos, 33).

BRUIJN, F.J.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M.;ROSSBACH, U.; LOUWS, F.J. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analysis. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTION, 8., 1996, Knoxville. **Biology of Plant-microbe Interaction-** proceedings. St. Paul: APS Press, 1996. p.497-502.

CANHOS, V. P. MANFIO G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. Disponível em: < <http://www.mct.gov.br/temas/biotec/Tendencias%20html> >. Acesso em 17/12/2008.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer I of the *Sclerotiniaceae*. **Mycologia**, New York, v. 85, p. 415-42, 1993.

CARVALHO, P. E. R. *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire; erva-mate. In: **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ; Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 280-287.

COELHO, G. C.; MARIATH, J. E. de A.; SCHENKEL, E. P. Populational diversity on leaf morphology of Maté (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil., Aquifoliaceae), **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 47-51, 2002.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.de. Caracterização físico-química da erva mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Ciência Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 193-204, Maio/Agosto, 2002.

GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, n.2, p.150-163, 2004.

MAZUCHOWSKI J. Z.. **Indicadores de erva-mate na realidade municipal**. Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER - Paraná). Curitiba, 1998.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RUCKER, N. G. de A. **Erva-Mate – Prospecção Tecnológica da Cadeia Produtiva**. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural, 1996. 130 p.

MACCHERONI J.; ARAUJO. W. L.; LIMA. A. O. S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In. ESPOSITO. E.;AZEVEDO J.L (Orgs).**Fungos; uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

MAZUCHOWSKI, J.Z.; RUCKER, N. G. de A. **Erva-Mate – Prospecção Tecnológica da Cadeia Produtiva**. Documento Executivo. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural, 1997. 27 p.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. v.1.

MURRAY, Patrick R. **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.179-197.

PILEGGI, M.; RAIMAM, P.M.; MICHELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V. Ação antimicrobiana e Interação Endofítica e, *Symphytum officinale* L. **Biological and Health Sciences**, v. 8 n.1 p.47-55, 2002.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Fungos Endofíticos em Folhas de Erva-Mate** (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). FLORESTA, Curitiba, PR, v. 36, n. 1, jan./abr. 2006.

RODRIGUES, K.F. & SAMUELS, G.J. *Letendracopsis palmarum*, a new genus and species of Loculoascomycetes. **Mycologia**, 86: 254-258. 1994.

SILVA, K. L.; FILHO V.C. PLANTAS DO GÊNERO *Bauhinia*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL FARMACOLÓGICO. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

STADEN, R, JUDGE D P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods Biochem. Analys.**, v.43, p.303-322, 2001.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA A. D. L., ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.
SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (AUBL.) RICH E *Strychnos cogens* BENTHAM. **ACTA AMAZONICA**, v. 34 n. 2 p. 185 – 195, 2004.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8a. ed. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR Protocols**, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. 172f. Tese (Doutorado em Genética de Microrganismos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.