

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DO ENDÓFITO *Xylaria* sp.
ISOLADO DA PLANTA TÓXICA CHIBATA (*Arrabidaea
bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.) BIGNONIACEAE**

BOLSISTA: MARIA CECÍLIA DE CARVALHO CHAVES, CNPQ

**MANAUS
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0029/2009**

**CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DO ENDÓFITO *Xylaria* sp.
ISOLADO DA PLANTA TÓXICA CHIBATA (*Arrabidaea
bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.) BIGNONIACEAE**

BOLSISTA: MARIA CECÍLIA DE CARVALHO CHAVES, FAPEAM

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ROZANA DE MEDEIROS SOUSA GALVÃO

**MANAUS
2009**

RESUMO

Na região Norte, a intoxicação por plantas é a principal causa de mortes em bovinos adultos; a grande maioria dessas mortandades de bovinos na Amazônia é determinada por *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandw, nas várzeas do rio Amazonas e seus afluentes, e por *Paulicourea marcgravii* St. Hil. na terra firme. Enquanto essa última planta tem sido extensivamente estudada, tem-se diversos aspectos a serem estabelecidos em relação a *A. bilabiata*. Medidas agronômicas da formação de pastos, o emprego de espécies de plantas e aplicação correta de técnicas agronômicas são práticas que irão permitir outras espécies potencialmente tóxicas de serem dominantes, além do uso de sementes de qualidade comprovada evitando casos de doenças provenientes por infecção por microrganismos. Os microrganismos endofíticos, sem considerar os fungos micorrízicos arbusculares, estão presentes no interior de órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules, frutos e raízes de várias plantas, aparentemente saudáveis, podendo em alguns casos produzir danos à planta quando as condições ambientais e estado fisiológico do hospedeiro se tornarem favoráveis. Cada microrganismo produz várias enzimas, as quais participam de seus processos metabólicos variando de espécie para espécie, ou até mesmo de linhagens da mesma espécie, e na quantidade de cada uma delas. As enzimas são empregadas em muitas atividades industriais, como na indústria de produtos de limpeza, no processamento de polpa e do papel, na produção têxtil e em aplicações médicas onde, com frequência, substituem compostos ou processos químicos. Linhagens do endófito *Xylaria* sp. isolado de *A. bilabiata*, foram testadas para análise qualitativa das atividades enzimáticas para amilase, celulase e pectinase. Das linhagens testadas, não houve produção de enzima hidrolítica extracelular, analisados pela ausência de halo translúcido ao redor da colônia.

Palavras-Chave: Endófitos, *Xylaria* sp. , *Arrabidaea bilabiata* , planta tóxica , Enzimas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Microrganismos Endofíticos.....	7
2.2 A Importância do Estudo dos Endófitos.....	7
2.3 Plantas Tóxicas.....	8
2.4 Relação dos Endófitos com o Hospedeiro.....	9
2.5 O Hospedeiro - <i>Arrabidaea bilabiata</i> (SPRAGUE) SANDW.....	9
2.6 Importância biotecnológica de enzimas produzidas por fungos.....	10
2.7 Fungo <i>Xyaria</i> sp.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Material Biológico.....	15
3.1.1 Meio BDA (Batata-Dextrose-Agar).....	15
3.2 Recuperação dos Isolados Armazenados.....	16
3.3 Cultivo para a realização dos testes enzimáticos (TEIXEIRA, 1994).....	17
3.3.1 Inóculos.....	17
3.3.2 Meio para Crescimento da Linhagem e Indução de Enzimas (BUZZINI & MARTINI, 2002 modificado)	18
3.3.2.1 Meio específico para a Atividade Amilolítica	18
3.3.2.2 Meio específico para a Atividade Celulolítica.....	19
3.3.2.3 Meio específico para a Atividade Fenololítica - Ágar Ácido-tânico	21
3.3.2.4 Meio específico para a Atividade Pectinolítica.....	21
3.3.3 Determinação Enzimática Qualitativa.....	23
3.3.3.1 Soluções Reveladoras.....	23
3.3.3.1.1 Solução reveladora para amilase.....	24
3.3.3.1.2 Solução reveladora para celulase.....	25
3.3.3.1.3 Solução reveladora para pectinase.....	26
3.3.3.4 Verificação das reações enzimáticas.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Atividade enzimática para Amilase.....	28
4.2 Atividade enzimática para Celulase	29
4.3 Atividade enzimática para Fenoloxidase.....	30
4.4 Atividade enzimática para Pectinase.....	30
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS	33
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	38

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Arrabidaea*, da família Bignoniaceae, ocorre na América tropical, do sul do México ao Brasil central (COSTA E LIMA, 1989) e inclui algumas espécies tóxicas para bovinos, dentre as quais se destaca *Arrabidaea bilabiata* (Sprague) Sandw, conhecida pelos nomes populares de “chibata” ou “gibata”, classificada no grupo das que causam “morte súbita”. As interações entre microrganismos endofíticos e as plantas ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. (PEREIRA *et al.*, 1993). Cada microrganismo produz várias enzimas, as quais participam de seus processos metabólicos variando de espécie para espécie, ou até mesmo de linhagens da mesma espécie, e na quantidade de cada uma delas (MELO *et al.*, 2002).

Desde a introdução da penicilina como primeiro antibiótico, milhares de metabólitos produzidos principalmente por fungos e actinomicetos tem sido estudados em busca de compostos com atividade antimicrobiana. Antibióticos originados de fungos que são utilizados atualmente na medicina são: penicilina, cefalosporina e ácido fusídico, os quais são antibacterianos, além do agente antifúngico griseofulvina (LOWE E ELANDER, 1983).

Extratos de *A. bilabiata* no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp e *Candida albicans* mostraram-se resistentes com exceção a *C. albicans*, sugerindo uma possível atividade antifúngica.

De *Palicourea marcgravii* St. Hil., uma Rubiaceae de larga ocorrência no Cerrado, e conhecida popularmente como “erva de rato” ou “café bravo”, foram isolados vários fungos endofíticos por Cafêu *et al.*, (2005). Dentre os já identificados, *Xylaria* sp. foi selecionado para estudo devido a atividade apresentada por seu extrato bruto frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, indicando a produção de metabólitos com atividade antifúngica em potencial. Segundo Petrini *et al.*, (1992) o fungo *Xylaria* sp tem sido identificados em condições tropicais como controladores de patógenos de solo.

Espécies de *Xylaria* são naturalmente encontradas em árvores mortas como saprófitas (HALIN E MENEZES, 1996). O gênero *Xylaria* é um fungo sapróbio de madeira, desenvolve seu peritécio embutido num estroma bem desenvolvido, sendo ereto, clavado ou ramificado. Causa cancro em árvores e podridão da madeira (BERGAMIN *et al.*, 1995; AGRIOS, 1997).

Enzimas de origem animal e vegetal obtêm preferência no mercado mundial, existe também na indústria a tendência de substituir certas fontes enzimáticas pelas de origem microbiana. Esta preferência fundamenta-se os seguintes pontos; a) facilidade de se obter grandes populações produtoras de enzimas; b) facilidade de se selecionar as linhagens com alta produtividade por meio de manipulações genéticas; c) pelos procedimentos envolvidos em extração enzimática que são mais simples e econômicas e d) a não sazonalidade do produto (FUNGARO E MACCHERONI, 2002). Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares (CARROLL E PETRINI, 1983)

Neste contexto, pretende-se com este trabalho, contribuir para a compreensão das interações planta e endófitos além de abrir novas perspectivas sobre a diversidade do potencial biotecnológico dos fungos endofíticos de plantas da Amazônia, em especial dos fungos endofíticos isolados de planta tóxica *Arrabidaea bilabiata*. Sendo assim, pretende-se detectar qualitativamente a atividade enzimática para amilase, celulase, fenoxidase e pectinase do endófito *Xylaria* sp. isolado da planta tóxica chibata (*Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW) BIGNONIACEAE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos Endofíticos

Microrganismos que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros são denominados microrganismos endofíticos ou simplesmente endófitos. Acredita-se que esses microrganismos evoluíram com os seus hospedeiros, apresentando, assim, uma íntima interação mutualística onde os microrganismos recebem nutrientes e proteção e conferem ao hospedeiro maior resistência em ambientes com intenso estresse, causado por fatores climáticos ou biológicos. Essa resistência, geralmente, está associada à produção, por parte dos endófitos, de compostos tóxicos aos herbívoros ou aos patógenos (SERAFINI *et al.*, 2002).

Estudos de microrganismos endofíticos se intensificaram a partir dos anos 80 mostrando sua importância em estudos biotecnológicos, principalmente onde poderiam ser utilizados como vetores para a produção de caracteres de interesse em plantas ou melhoramento genético para utilização como antagonista à fitopatógenos. Microrganismos que apresentam propriedades antagônicas à fitopatógenos podem ser isolados do interior de tecidos ou órgãos da parte aérea de plantas (ARAÚJO, 1996).

2.2 A Importância do Estudo dos Endófitos

Diversos microrganismos têm sido identificados como potenciais agentes de controle biológico, incluindo fungos endofíticos presentes nos tecidos das plantas cultivadas (YATES *et al.*, 1997).

Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (FAHEY, 1988; MURRAY *et al.*, 1992); como agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN E SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD *et al.*, 1998) e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno (STIERLE *et al.*, 1993; WANG *et al.*,

2000), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico (STROBEL *et al.*, 1999) e diversos outros antibióticos. Relatos como o do taxol, inicialmente isolado de *Taxus brevifolia* e, em seguida, de diversos endófitos desta e de outras plantas que o produzem, sugerem um relacionamento entre planta e microrganismo que deve ser melhor explorado.

Os fungos endofíticos incidem em condições específicas e se encontram em microclimas e condições fisiológicas distintas. Os seguintes gêneros têm sido identificados em condições tropicais como controladores de patógenos de solo: *Acremonium* sp, *Anthostomella* sp, *Chrysosporium* sp, *Cladoporium* sp, *Clypeopycni* sp, *Colletotricum* sp, *Coniothyrium* sp, *Cryptocline* sp, *Lasioidiplodia* sp, *Libertella* sp, *Nodilosporium* sp, *Phaeosphaeria* sp, *Phialophora* sp, *Phoma* sp, *Phomatospora* sp, *Phomopsis* sp, *Xylaria* sp (PETRINI *et al.*, 1991).

Os fungos filamentosos, onde os endofíticos estão incluídos, constituem um grupo de microrganismos que biossintetizam uma quantidade fantástica de metabólitos secundários, chegando, em casos especiais, a uma produção 73% superior a de outras classes de microrganismos (DREYFUSS E CHAPELA, 1994).

2.3 Plantas Tóxicas

Entende-se por planta tóxica de interesse pecuário, aquela que quando ingerida pelos animais, sob condições naturais, causam danos à saúde ou até mesmo a morte (TOKARNIA *et al.*, 2000). Muitas destas plantas ocorrem nas áreas de periferia da floresta, porém quando a floresta é derrubada ou queimada para a implantação das pastagens passam a colonizar estas áreas (HABERMEHL, 1994).

A importância das plantas tóxicas varia de acordo com a região. Em estudos feitos por Riet-Correa & Medeiros (2001), em primeiro lugar está o Norte do Brasil, seguido do Nordeste, Centro-Oeste, com um menor número de plantas encontradas nas regiões Sudeste e Sul.

Em toda a Região Amazônica são conhecidas até o momento, três plantas responsáveis pela maioria das mortes de bovinos na terra firme: *P. marcgravii* (cafezinho), na várzea do Rio Amazonas *A. bilabiata* (chibata) e na várzea do Rio Branco e seus afluentes *A. japurensis*, Existem ainda outras plantas conhecidas que

causam intoxicação nos animais da Amazônia como: *L. camara* e *I. asarifolia* (TOKARNIA *et al.*, 2000).

2.4 Relação dos Endófitos com o Hospedeiro

A relação dos endófitos com o hospedeiro ainda não foi completamente elucidada. Há duas hipóteses principais: a primeira diz respeito ao equilíbrio antagônico e a segunda à simbiose mutualística (FAETH, 2002; RUDGERS *et al.*, 2004; SCHULZ E BOYLE, 2005; KOGEL *et al.*, 2006).

A ocorrência de endófitos e a frequência de infecção variam grandemente de acordo com a espécie hospedeira e a origem geográfica da mesma. Penna (2000) isolou endófitos do interior de sementes de erva-mate, porém a maioria das plantas investigadas não possuía sementes infectadas por microrganismos endofíticos.

A frequência e composição de espécies das comunidades microbianas são dependentes das interações entre os fatores bióticos e abióticos inerentes aos seus habitats, uma vez que o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico. Há variação espacial nas comunidades endofíticas em diferenças e especificidades da microbiota entre os isolados vegetais: raízes, caules, folhas e frutos. (NALINI *et al.*, 2005; TEJESVI *et al.*, 2005; GOND *et al.*, 2007); dependem das interações com outros microrganismos como patógenos e epifíticos (OSONO, 2007; SANTAMARIA E BAYMAN, 2005).

2.5 O Hospedeiro - *Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.

Arrabidaea bilabiata (Sprague) Sandw. pertencente à família Bignoniaceae é uma trepadeira escandente abundante em muitas áreas da Bacia Amazônica, somente nas partes baixas (várzeas e restingas) que são inundadas periodicamente durante a “cheia”; sua toxicidade foi descoberta na Venezuela (CORTES, 1969/1971) onde ocorre às margens do rio Orinoco e alguns de seus afluentes.

Arrabidaea bilabiata (SPRAGUE) SANDW. também conhecida por outros nomes populares como; chibata, gibata, gibata-branca, gibata-roxa, jurará bucha, jurará

branco dentre outros, é uma planta arbustiva de hábito lianescente, robusta com folhas lisas, face superior verde lustrosa e inferior verde clara, trifolioladas ou bifoliadas com um folíolo terminal transformado em gavinhas simples. É uma planta invasora resistente, adaptada a várias condições ambientais. Cresce em solos argilosos ou arenosos tolerando o encharcamento periódico do terreno, locais inundados e raramente, em solos de terra firme em florestas secundárias. Há registros desta planta na região norte nos estados do Amazonas, Pará, Roraima e Acre (TOKARNIA *et al.*, 2000).

A maioria das intoxicações ocorre durante a mudança do gado para a várzea ou da várzea para a terra firme, isto porque o gado só consome esta espécie em época de fome, condição que ocorre neste período (TOKARNIA *et al.* 2000).

Trata-se de espécie que possui grande variação na toxidez. Estudos realizados denotam variação de até seis vezes para a dose letal experimental em coelhos (DOBEREINER *et al.*, 1984). Esta dose pode variar com a época do ano, cuja evolução é superaguda variando de 5 minutos a 4 horas após a ingestão para o óbito (TOKARNIA *et al.*, 2000).

Trata-se de planta que afeta o coração causando morte súbita, seus compostos tóxicos são glicosídeos do tipo esteróides cardioativos (CORTES, 1969/1971). Estas plantas, que causam morte súbita, são responsáveis pela metade das mortes causadas por planta tóxicas (TOKARNIA *et al.*, 2002).

Cipó ou arbusto escandente conhecido como “gibata” ou “chibata” é a planta tóxica mais importante para herbívoros nas regiões de várzea da Bacia Amazônica e a segunda em importância em toda a região (TOKARNIA, *et al.*, 1979). Sob condições naturais, a intoxicação ocorre somente em bovinos (DÔBEREINER *et al.*, 1983) e, experimentalmente, por via oral também em coelhos (DÔBEREINER *et al.*, 1984).

2.6 Importância biotecnológica de enzimas produzidas por fungos

Os fungos endofíticos são microrganismos capazes de produzir metabólitos potencialmente bioativos (AZEVEDO *et al.*, 1998).

Cada microrganismo produz várias enzimas, as quais participam de seus processos metabólicos variando de espécie para espécie, ou até mesmo de linhagens da mesma espécie, e na quantidade de cada uma delas (MELO *et al.*, 2002).

As enzimas são substâncias naturais protéicas, envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorre nas células vivas, possuindo atividade intracelular e extracelular com função canalizadora, de reações químicas. Sendo consideradas proteínas, consistem em cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas e articulados em estruturas tridimensionais (LEHNINGER, 1995).

Muitos fungos produzem enzimas extracelulares de importância na degradação e transporte de nutrientes para a célula e no processo de patogênese (BATEMAN E BASHAM, 1976), podendo a produção de enzimas extracelulares ser indicativa da característica patogênica desses fungos. Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares (CARROLL E PETRINI, 1983).

Para que as enzimas funcionem corretamente, precisam de condições específicas, sendo ativadas a faixas estreitas de pH e sensíveis a mudança de acidez ou alcalinidade ao meio ambiente (LEHNINGER, 1995). As enzimas também são empregadas em muitas atividades industriais, como na indústria de produtos de limpeza, no processamento de polpa e do papel, na produção têxtil e em aplicações médicas onde, com frequência, substituem compostos ou processos químicos (EUFIC, 2002).

O amido é uma fonte de carbono abundante na natureza e as enzimas como α -amilase podem hidrolisar as ligações α -1,4 em moléculas relacionadas com o amido (SHIH E LABBÉ, 1995). As α -amilases são enzimas endoativas que hidrolisam o amido por clivagem randômica das ligações α -1,4. Numerosas α -amilases originadas de bactérias, fungos, plantas e animais têm sido caracterizadas e seus genes têm sido clonados para futuros trabalhos (DONG *et al.*, 1997; IGARASHI *et al.*, 1998). As enzimas α -amilases são de importância industrial, particularmente nas indústrias de alimentos (produção de pães, geléias e glicose), detergentes (utilizados em lavanderias e em preparados para máquinas de lavar louças), na indústria têxtil e na produção de etanol a partir de amido (SHIH E LABBÉ, 1995; IGARASHI *et al.*, 1998)

A celulose é um polímero linear, não ramificado de glicose com ligação β -1,4 e perfaz mais de 40% da biomassa das plantas. A celulose natural é estruturalmente heterogênea e contém regiões amorfas e regiões cristalinas altamente ordenadas. O grau de cristalização varia com fonte da celulose. As regiões mais cristalinas são resistentes á hidrólise enzimática (BOK *et al.*,1998).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, e são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON E CHAMBLISS,1989).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente na extração de: componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes. Essas enzimas participam ainda, dos processos de produção de vinagre de laranja e do Ágar e na extração e classificação de sucos de frutas cítricas (ORBERG, 1981).

As fenoloxidades têm sido detectadas extracelularmente na maioria dos fungos de decomposição branca e numa ação cooperativa com outras enzimas fúngicas, como também podem participar da decomposição da lignina. Existem três tipos de fenoloxidases: peroxidases, tirosinase e lacases (HERRERA, 1991).

As peroxidases realizam fragmentações iniciais do polímero de lignina, contém ferro e catalisam a oxidação de o⁻ e p-difenóis na presença de H₂O₂.

A Tirosinase e a Lacase, contém cobre e não requerem H₂O₂, diferenciam-se na especificidade do substrato. A Tirosinase é produzida intracelularmente. Enquanto que as lacases são produzidas por fungos e por plantas, pertencem ao grupo de oxidases que complexam o cobre e catalisam a oxidação de monofenóis, o⁻ e p-difenóis, aminofenóis e compostos diaminoaromático usando oxigênio (HERRERA, 1991). As peroxidases são produzidas por fungos e bactérias, em função de suas características, principalmente relacionadas à baixa especificidade e conseqüentemente largo espectro de ação catalítica, vem sendo trabalhada com seu complexo enzimático no tratamento de resíduos industriais (KING, 1987).

As pectinases são utilizadas na indústria de panificação juntamente com as amilases, sendo responsáveis pela hidrolise do glutem, aumentando assim as propriedades viscoelásticas da farinha de trigo. São usadas na produção de extrato de

levedura, gelatina de colágeno, na preparação de peptonas, queijos e também na produção de concentrado de peixe (PEPLER E REED, 1988; NOORDERVLIET E TOET, 1988).

2.7 Fungo *Xylaria* sp.

Espécies de *Xylaria* são naturalmente encontradas em árvores mortas como saprófitas (Hanlin & Menezes, 1996). Pereira (1993) relata com base nos trabalhos de Rodrigues & Samuels (1990) e Rodrigues & Samuels (1992) que espécies de *Xylaria* são isoladas de plantas tropicais com maior frequência que de plantas de clima temperado, sendo capazes de sintetizar celulases e ligninases e podendo atuar como patógenos latentes ou como decompositores. Em trabalho recente na Alemanha, Stadler *et al.* (2001) isolaram do estroma de *Daldinia concentrica*, ascomiceto da família Xylariaceae (mesma família de *Xylaria*), o triterpenoide concentricol. Eles ainda relatam que, recentemente, um grupo de pesquisadores japoneses descobriu mais de 20 novos metabólitos, produzidos por duas espécies de *Daldinia* no Japão. Os metabólitos secundários de espécies européias e americanas deste grupo têm sido muito bem investigados.

Estudos feitos por Cafêu *et al.*, (2005), dando continuidade às pesquisas de bioprospecção, selecionaram várias espécies vegetais de Cerrado e Mata Atlântica para isolamento e cultivo de fungos endofíticos. De *Palicourea marcgravii* St. Hil., uma Rubiaceae de larga ocorrência no Cerrado, e conhecida popularmente como “erva de rato” ou “café bravo”, foram isolados vários fungos endofíticos. Dentre os já identificados, *Xylaria* sp. foi selecionado para estudo devido a atividade apresentada por seu extrato bruto frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, indicando a produção de metabólitos com atividade antifúngica em potencial. *Xylaria* sp. foi submetido aos procedimentos usuais de cultivo em larga escala para fornecimento dos extratos brutos que após fracionamento bioguiado, levou ao isolamento de 5 substâncias: ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico, citocalasina D, 7-declorogriseofulvina, citocalasina B e griseofulvina.

Outro importante trabalho realizado com *Xylaria* sp. envolve a descoberta de um novo sesquiterpenóide que inibe a enzima integrase do vírus HIV-1, uma das três responsáveis por sua replicação. Esta enzima está ausente no homem, parecendo ser muito específica do HIV-1 sendo, portanto, um alvo potencial para o desenvolvimento de agentes anti-HIV de alta seletividade (Singh *et al.*, 1999).

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 1000 mL de água destilada . Filtrou-se o caldo em proveta, para que fosse avaliado a quantidade de água restante, desprezou-se a massa e completou-se com água destilada para 1000 mL. A dextrose foi adicionada ao caldo . O pH foi ajustado para 6,8 antes de adicionar o Ágar e em seguida foi autoclavado por 15 minutos a 1 atm.

3.2 Recuperação dos Isolados Armazenados

Os isolados foram recuperados do estoque armazenado, onde fragmentos de endófitos foram inoculados em meio BDA, em placa de Petri e incubados a temperatura ambiente até esporulação (Figura 2). Quando necessário, as colônias eram submetidas a fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente, visando estimular a esporulação.

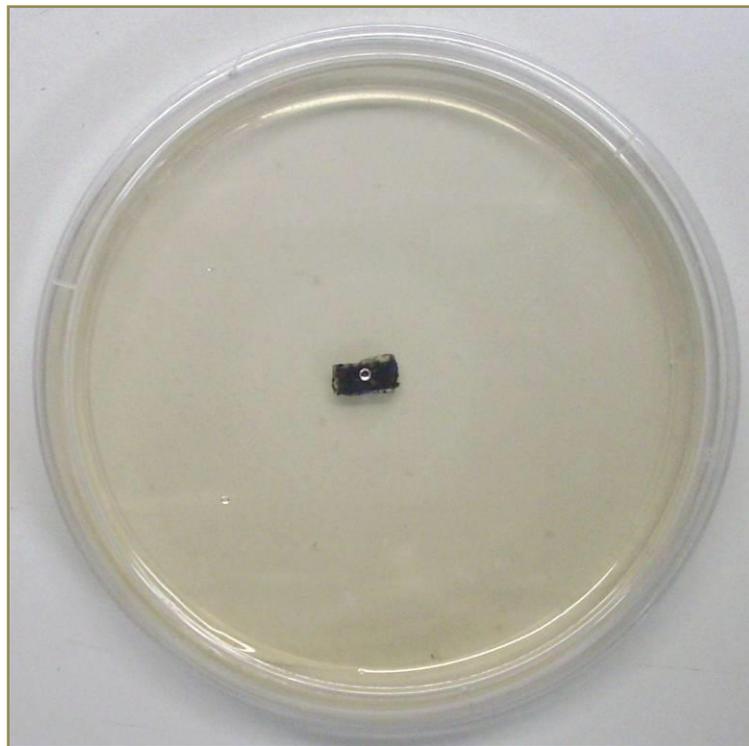


Figura 2: Fragmento do fungo *Xylaria* sp. inoculado em placa de Petri com meio BDA.

A partir das colônias confirmadas pela identificação microscópica, como sendo do gênero *Xylaria*, foram obtidas culturas monospóricas por meio de diluição seriada. Em câmara de fluxo laminar, estruturas reprodutivas dos isolados foram raspadas com alça de platina e preparada uma suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5mL de solução Tween-80 0,1%. Os tubos foram submetidos à agitação, por 1min, em agitador Vortex e transferidos 1mL para tubos contendo 0,9% de solução salina. A nova suspensão foi agitada por alguns segundos, em agitador Vortex, visando a homogeneização. Foram realizadas quatro diluições seriadas.

De cada uma das duas últimas diluições, alíquotas de 100µL foram distribuídas em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após a germinação dos conídios, foi transferido, de cada placa de Petri, um fragmento do meio contendo hifas produzidas a partir da germinação de um único conídio. Este fragmento foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA, a qual foi mantida no escuro, a temperatura ambiente, pelo tempo necessário para o crescimento da colônia.

3.3 Cultivo para a realização dos testes enzimáticos (TEIXEIRA, 1994)

Após a confirmação da viabilidade das culturas obtidas, estas foram submetidas a cultivo em meio sólido específico para a realização dos testes enzimáticos, seguindo a metodologia descrita a seguir.

3.3.1 Inóculos

A partir da colônia obtida em meio de cultura seletivo, fragmentos destes foram transferidos, para placas de Petri contendo meio de cultura sólido, acrescido do substrato indutor de acordo com a enzima a ser testada.

3.3.2 Meio para Crescimento da Linhagem e Indução de Enzimas (BUZZINI & MARTINI, 2002 modificado)

A análise qualitativa das enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por fungos, foi avaliada em placas de Petri contendo meio de cultura específico para cada enzima e o pH ajustado conforme a metodologia descrita a seguir. O fungo foi cultivado em meio BDA por oito dias a 28^o C. Após este período, um fragmento de meio BDA contendo micélio foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura com substrato específico para cada enzima a ser testada. As placas de Petri inoculadas foram incubadas à temperatura de 28^o C. A avaliação da atividade foi realizada continuamente após 3-10 dias, quanto a presença ou ausência de halo de degradação com medição dos halos formados para a análise enzimática.

Substrato	Enzima	pH (ajustado)
Amido	Amilase	6,8
Carboximetilcelulase	Celulase	6,8
Serragem de Cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.)	Fenoloxidase	6,0
Pectina	Pectinase	6,8

3.3.2.1 Meio específico para a Atividade Amilolítica

Em um Erlenmeyer, os compostos foram dissolvidos no tampão e homogeneizados em agitador magnético.

NaNO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,001 g
FeSO ₄	0,001 g
Extrato de Levedura.....	0,001 g

Amido solúvel	10,0 g
H ₂ O destilada	1000
mL	
Ágar	15,0 g
Tampão Citrato-Fosfato 0,1M, pH 5,0.....	500mL

O pH foi ajustado para 6,8 antes de adicionar o ágar. O meio foi esterilizado a 120°C, durante 15 minutos.

Os fungos endofíticos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28° C foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico para atividade amilolítica (Figura 3).

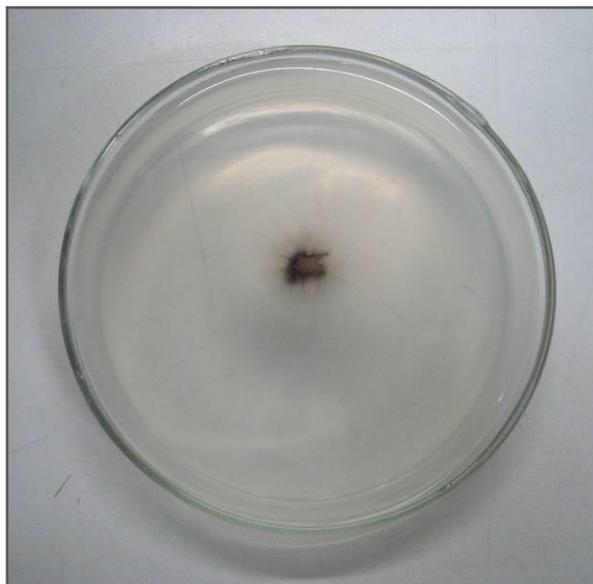


Figura 3: Fungo em crescimento em meio para atividade amilolítica.

3.3.2.2 Meio específico para a Atividade Celulolítica

Em um Erlenmeyer, foi feita a homogeneização das substâncias, em agitador magnético:

NaNO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g

KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
FeSO ₄	0,01 g
Carboxi-metil-celulose.....	10,0 g
Extrato de Levedura.....	0,1 g
H ₂ O destilada	1000 mL
Ágar	15,0 g

O pH foi ajustado para 6,8 antes de adicionar o ágar. O meio foi esterilizado a 120°C, durante 15 minutos.

Os fungos endofíticos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28 °C foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico para atividade celulolítica (Figura 4). Após crescimento (5-8 dias a 28 °C) as placas de Petri foram analisadas para verificação e medição do halo de degradação.



Figura 4: Fungo em crescimento em meio para atividade celulolítica.

3.3.2.3 Meio específico para a Atividade Fenolítica - Ágar Ácido-tânico

Ágar.....	9,0 g
Serragem.....	0,5 g
Tampão Acetato de Na 0,1 M, pH 5,0.....	500 mL

Em um Erlenmeyer, a serragem é peneirada e colocada junto com o tampão, o pH, ajustado para 6,0 e em seguida, acrescentado o Ágar até a homogeneização, em agitador magnético. O meio é esterilizado a 120°C, durante 15 minutos.

Os fungos endofíticos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28° C são transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico para atividade fenolítica.

3.3.2.4 Meio específico para a Atividade Pectinolítica

Os compostos foram homogeneizados com bastão de vidro. O conjunto foi submetido à aquecimento até a completa dissolução do Ágar.

NaNO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
FeSO ₄	0,01 g
Pectina cítrica.....	10,0 g
Extrato de Levedura.....	0,1 g
H ₂ O destilada	1000

mL

Ágar15,0 g
Tampão Acetato Na, 0,1M, pH 5,0.....500mL

O pH foi ajustado para 6,8 antes de adicionar o ágar. O meio foi autoclavado a 120°C, durante 15 minutos.

A Pectina Cítrica foi dissolvida em banho-maria separadamente do meio de cultura, e acrescentada ao meio, ainda quente, após a autoclavagem.

Os fungos endofíticos selecionados, após crescimento em meio BDA por oito dias a 28° C foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura específico para atividade pectinolítica (Figura 5). Após crescimento (5-8 dias a 28° C) as placas de Petri foram analisadas para verificação e medição do halo de degradação.

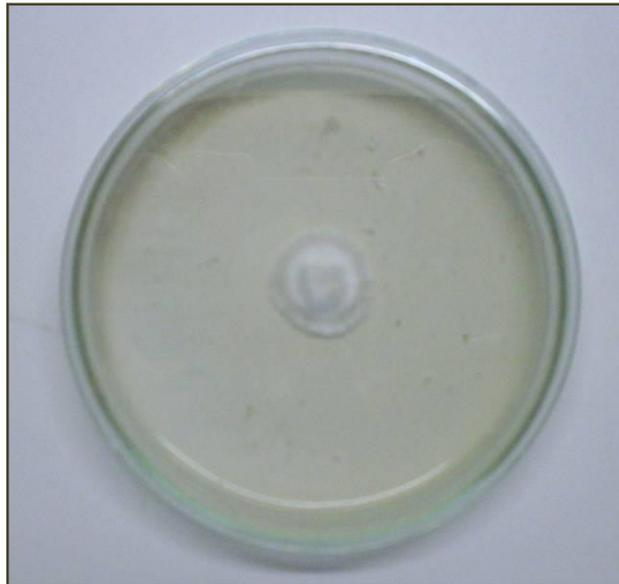


Figura 5: Fungo em crescimento em meio para atividade pectinolítica.

3.3.3 Determinação Enzimática Qualitativa

Após o período de incubação foi pipetado alíquotas em mL sobre superfície do meio com solução reveladora específica para cada enzima, para determinação da atividade enzimática.



Figura 6: Soluções para a determinação da atividade enzimática.

3.3.3.1 Soluções Reveladoras

Solução Reveladora	Enzima
Lugol	Amilase
Vermelho Fenol	Celulase
Não há necessidade de solução	Fenoxidase
Vermelho de Metila	Pectinase

3.3.3.1.1 Solução reveladora para amilase

Após crescimento (5-8 dias a 28° C) as placas de Petri foram coradas com solução de iodo –Lugol, adicionando-se na superfície do meio 10mL de solução. Para verificação e medição do halo de degradação o meio ficou em repouso durante 30 minutos.

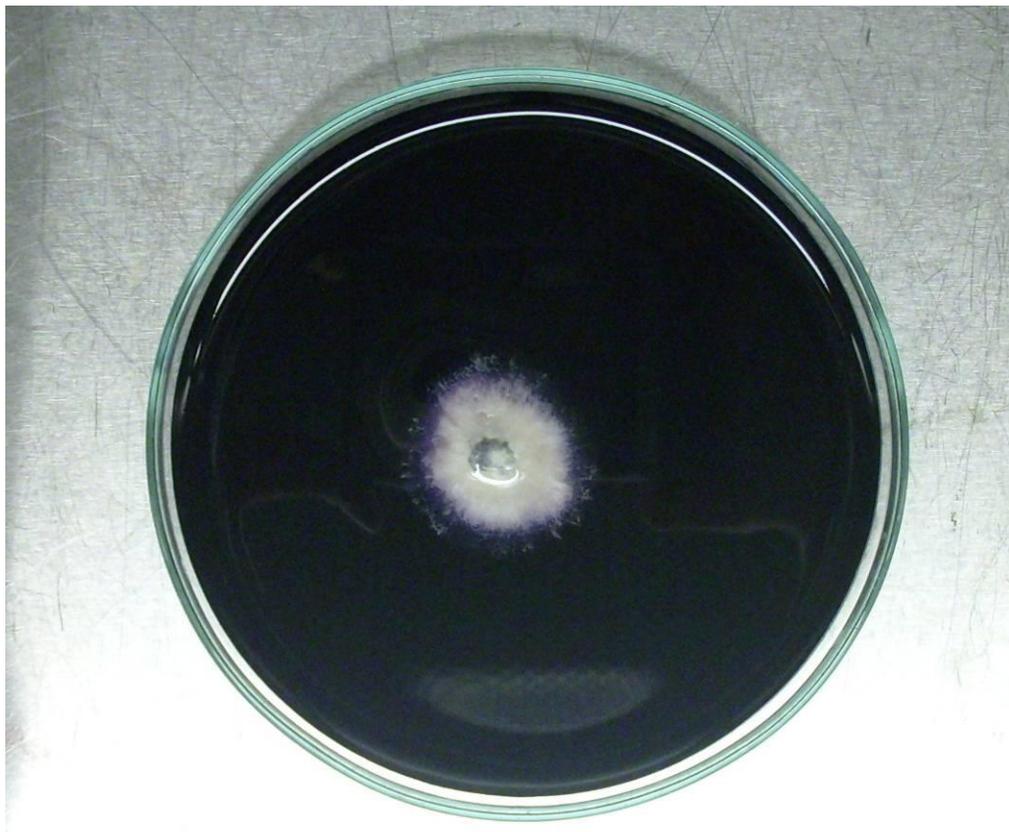


Figura 7: Meio com solução reveladora Lugol para verificação do halo de degradação.

3.3.3.1.2 Solução reveladora para celulase

Após 5 dias de incubação, em cada isolado, foi adicionados 10 mL da solução vermelho fenol (0,025%) em tampão Tris-HCl, pH 8. O meio ficou em repouso por 30 minutos para a reação.

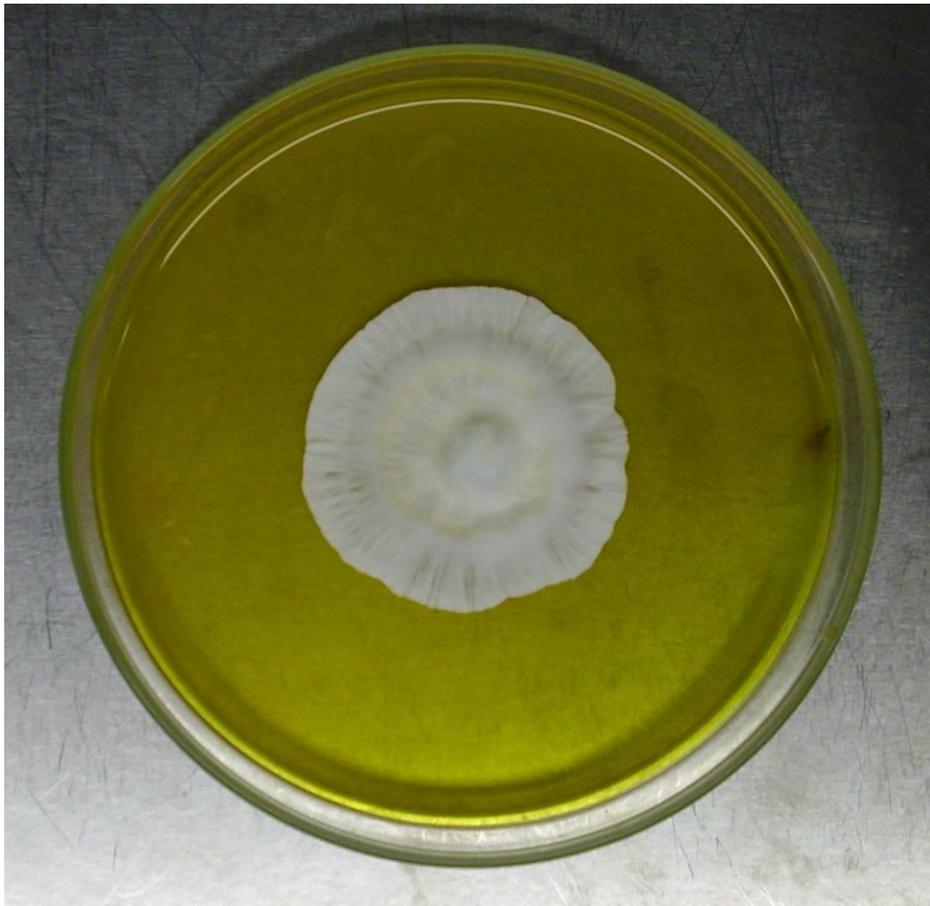


Figura 8: Meio com solução reveladora Vermelho fenol para verificação do halo de degradação.

3.3.3.1.3 Solução reveladora para pectinase

Para melhor revelação do halo de degradação, as placas de Petri foram coradas adicionando-se um volume de 10mL de solução de vermelho de metila a 0,2%. Esperou-se um tempo de aproximadamente 20-30 minutos, retirou-se o excesso de solução no meio e verificou-se a presença do halo.

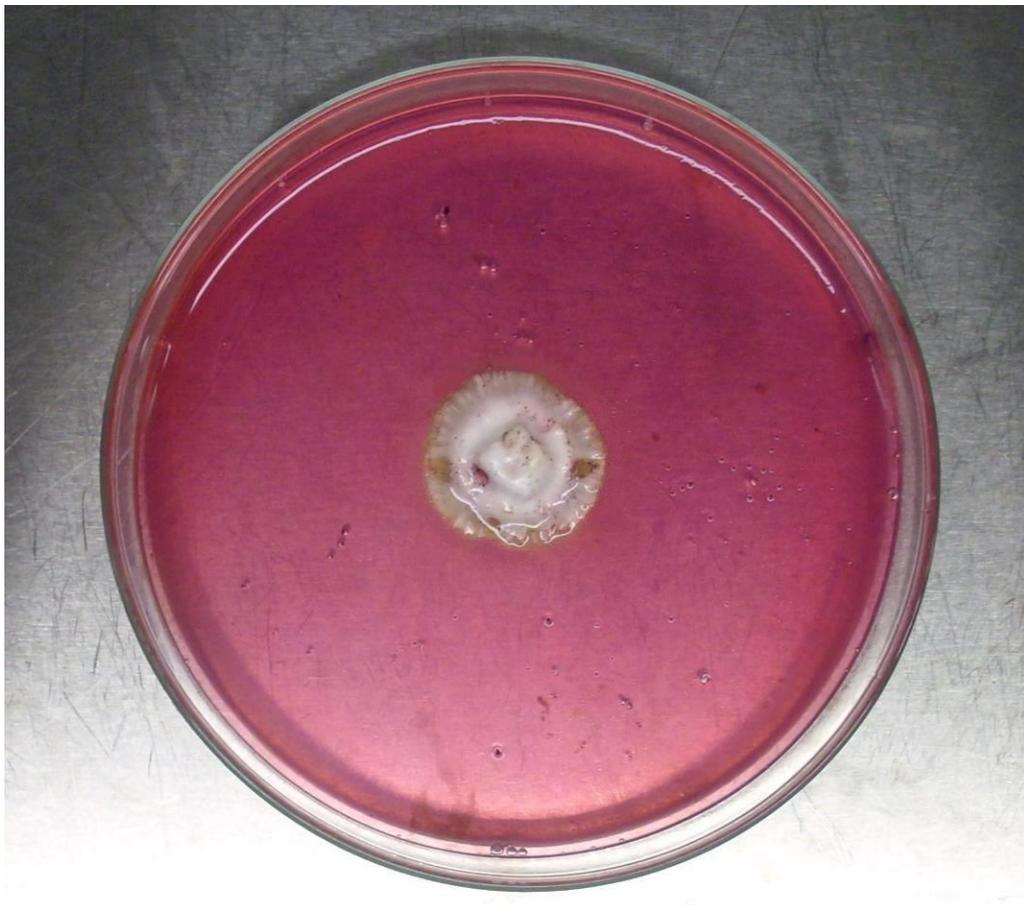


Figura 9: Meio com solução reveladora Vermelho de metila para verificação do halo de degradação.

3.3.4 Verificação das reações enzimáticas

Para amilases, celulasas e pectinases os resultados das reações enzimáticas positivas são identificadas pela formação de um halo translúcido, ao redor de cada fragmento.

A reação de fenoloxidase é detectada pela modificação química do meio de cultura. A reação positiva é visualizada, sem ser necessário adicionar solução reveladora na superfície do Ágar.

A atividade enzimática é determinada pelo tamanho do halo em milímetro, medindo-se o diâmetro pelo reverso da placa de Petri.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade enzimática para Amilase

Linhagens do fungo endofítico testado, *Xylaria* sp. , não produziu enzima hidrolíticas extracelulares para amilase, pois na verificação da reação enzimática amilolítica, não apresentou halo de degradação ao redor da colônia. Para melhor visualização a placa foi colocada contra a luz. As linhagens testadas em meio de cultura contendo amido germinaram consideravelmente, entretanto nenhuma apresentou a formação de um halo translúcido de acordo com a metodologia aplicada.

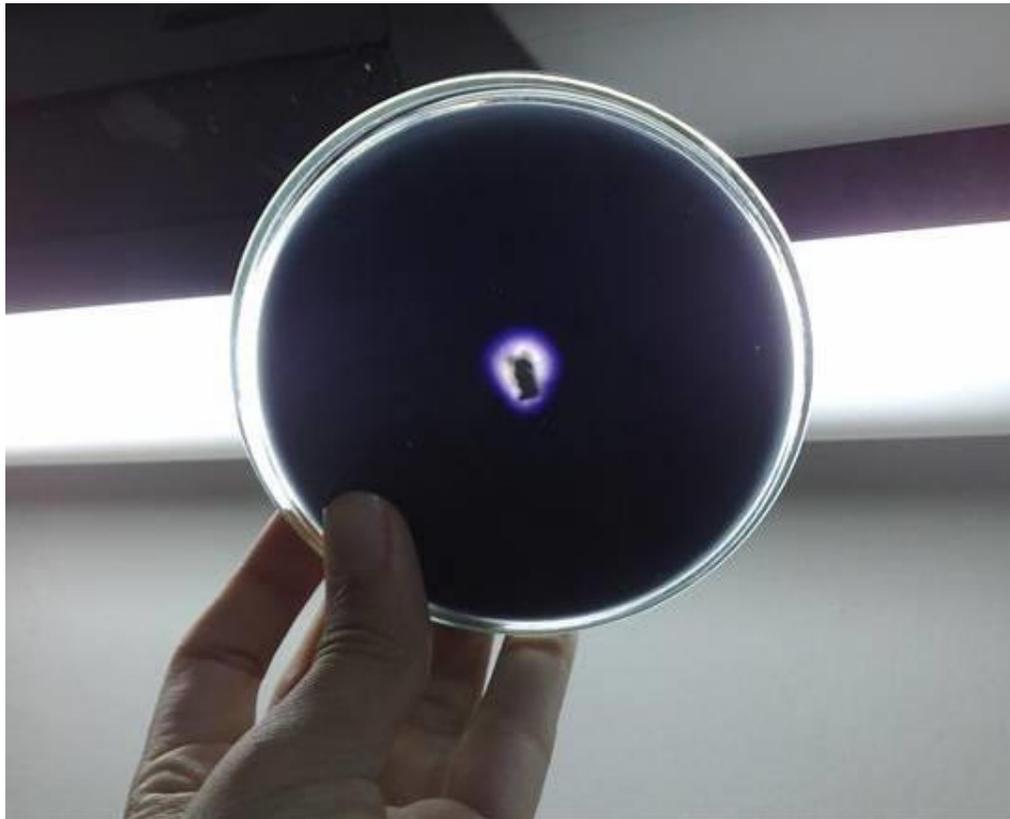


Figura 10: Verificação da reação enzimática amilolítica

4.2 Atividade enzimática para Celulase

Das linhagens testadas, não houve produção de enzima hidrolítica extracelular para celulase, pois na verificação da reação celulolítica foi avaliado a ausência do halo de degradação ao redor da colônia. Foi visualizado crescimento considerável dos fungos em meio celulolítico.



Figura 11: Verificação da reação enzimática celulolítica .

4.3 Atividade enzimática para Fenoxidase

Para a reação de fenoxidase a análise não foi realizada.

4.4 Atividade enzimática para Pectinase

Não houve produção de enzima hidrolítica extracelular para pectinase, pois na verificação da reação pectinolítica foi avaliado a ausência do halo de degradação ao redor da colônia. As linhagens testadas em meio de cultura contendo pectina cítrica germinaram consideravelmente. A presença de um halo claro em volta da colônia sugeria a degradação da pectina cítrica; porém não houve presença de halo.

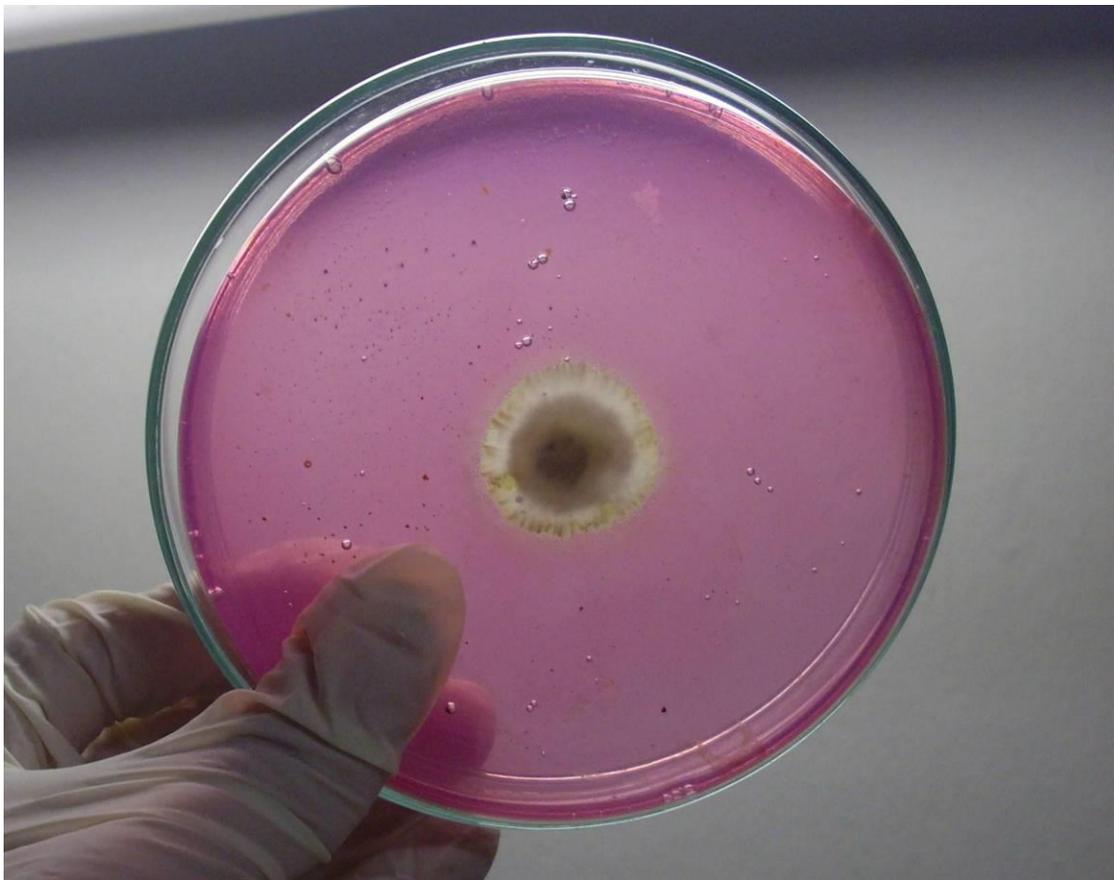


Figura 12: Verificação da reação enzimática pectinolítica .

O halo indicador da degradação estava ausente nos meios em experimento. Nas linhagens testadas a reação foi negativa pois não houve detecção de atividade enzimática através da análise dos halos de degradação.

Segundo Neirotti e Azevedo (1988), a visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas do meio de cultura podem interferir no corante proporcionando resultados falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos.

5. CONCLUSÃO

O estudo da caracterização enzimática das linhagens do endófito *Xylaria* sp., neste trabalho, não evidencia a potencialidade biotecnológica desse microrganismos, porém faz-se necessário a busca de novas pesquisas e revisão das metodologias aplicadas para que no futuro desenvolva-se pesquisas envolvendo este gênero.

6. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W.L. 1996. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de Citros**. Piracicaba: ESALQ/USP, 91p. Dissertação de Mestrado.
- AZEVEDO, J. L. IN: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: 1998. cap. 4, p. 116-147.
- BATEMAN, D.F. & BASHAM, H.G. 1976. Degradation of plantcell walls and membranes by microbial enzymes. **Physiological and molecular plant pathology** 4: 316-355.
- BOK, J.D.; YERNOOL, D.A.; EVELEIGH, D.E. 1998. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases celA and celB from *Thermotoga neapolitana*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(12):4774-4781.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J. Appl. Microbiol.**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.
- CARROLL, G. E PETRINI, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia** 75: 53-63.
- CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, Â.R. 2005. **Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravi* (rubiaceae)**. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 6, 991-995,
- CORTES, P. R. 1969/1971. Uma etiologia de la borrachera del llano. *Revta. Ganagrínco*, Caracas, 4(18), 5(19,20,21,22), 6(23,24).
- COSTA, C. P. R. E LIMA, A. E. 1989. Brazilian-Sino Symposium on Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Rio de Janeiro.
- DÖBEREINER, J., TOKARNIA, C. H.; SILVA, M. F. Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em bovinos na Região Amazônica do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 17-24. 1983.
- DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 4, n.3, p. 89-96. 1984.
- DONG, G.; VIEILLE, C.; SAVCHENKO, A.; ZEIKUS, L.G. 1997. Cloning sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(9):3569-3576.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Em **The discovery of natural products with therapeutic potential**; Gullo, V. P., ed.; Butterworth-Heinemann: Boston, 1994, p. 49-80.

EUFIC. 2002. **Enzimas: ferramentas indispensáveis num mundo vivo**. Disponível [http:// www.cib.org.br/papers/enzimes.htm](http://www.cib.org.br/papers/enzimes.htm).

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

FAHEY, J.W. 1988. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. ACS SYMP. SER in: *Biologically Active Natural Products: Potential use Agriculture*, Hanover, v. 380, p.120-8.

FUNGARO, M. H. P. E MACCHERONI, W. JR. 2002. **Melhoramento de genética para a produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos**. *In: Recursos genéticos & melhoramento – Microrganismo*. Melo, I. S. de.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Argle marmelos*?? *Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1371-1375.

HABERMEHL, G. G. Poisonous plants of Brazil: review article. **Toxicon**. v. 32, n. 2, p. 143-156. 1994.

HANLIN, R.T. E MENEZES, M. 1996. *Gêneros ilustrados de ascomicetos*. UFRPe. Recife-PE. 274p.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. 1996. Toxicity of fungal endofhyte metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, v. 102, p. 155-162.

HERRERA, A.H.M. 1991. ***Thermoascus aurantiacus* (Gepa Brasileira): Aspecto do crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos**. Campinas – SP. (Tese de mestrado), p.13.

IGARASHI, K.; HATADA, Y.; HAGIHARA, H.; SAEKI, K.; TAKAIWA, M.; UEMURA, T.; ARA, K.; OZAKI, K.; KAWAI, S.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(9):3282-3289.

- KING, R. D. 1987. **Identification of carbon dioxide as dermatophyte inhibitory factor produced by *Candida albicans***. C. J. Microbiol. 22: 1720-1727.
- KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. 2006. Endophyte or parasite – what decides? Current Opinion in Plant Biology, v. 9, p. 358-363.
- LEHNINGER, A.L. 1995. **Princípios de Bioquímica**. 2ª Ed. Sarvier, São Paulo, 761 p.
- LOWE, D. A. E ELANDER, R. P. 1983. Contribution of mycology to the antibiotic industry. **Mycologia**, 75: 361-373.
- MELO, I.S.; VALADARES, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C. 2002. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna.
- MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M. & SCOTT, D.B. 1992. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. Molecular Genetics, v. 233, 1-9p.
- NALINI, M.S.; MAHESH, B.; TEJESVI, M.V.; PRAKASH, S.H.; SUBBAIAH, V. KINI, K.R.; SHETTY, H. 2005. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) D.C. (Capparidaceae). Mycopathologia, v. 159, p. 245-249.
- NOORDERVLIET. P.F. E TOET. D.A. 1988. **Safety in enzyme technology**. In: REHM, H.J. E REED. G./KENNEDY, J.F. Biotechnology. Netherlands. V.7. p. 713-741
- ORBERG, P.K. 1981. Studies on cellulose production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*. **Dissertação de mestrado**, Oregon State University, Oregon
- OSONO, T. 2007. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. Mycosciense, v. 48, p. 47-52.
- PEPPLER, H. J. E REED, G. 1988. Enzymes in food and feed processing. In: REHM, H. J; REED, G. ; KENNEDY, J. F. Biotechnology, Netherlands, V. 7, p. 549-603.
- PEREIRA, J.O. 1993. *Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais*. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p.
- PETRINI, O. 1991. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. 9ed.). Microbial ecology of leaves. New York, Springer Verlag, p. 179-197.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 38-42, 2001.

ROBSON, L.M. E CHAMBLISS, G.H. 1989. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology** 11:626-644.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research*, 94: 827-830.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. 1992. *Idriella* species endophytic in palms. *Mycotaxon*, 43: 271-276.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, J.; CLAY, K. 2004. Endofhytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters*, v. 7, p. 42-51.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, v. 50, p. 1-8.

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

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. de. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: Educs, 2002. 433p.

SHIH, N.J. E LABBÉ, R.G. 1995. Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Clostridium perfringens* type A. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(5):1776-1779.

SINGH, S.b.; ZINK, D.; POLISHOOK, J.; VALENTINO, D.; SHAFIEE, A.; SILVERMAN, K.; FELOCK, P.; TERAN, A.; VILELLA, D.; HAZUDA, D.j.; LINGHAM, R.b. 1999. Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrase inhibitor integric acid, a novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. *Tetrahedron Letters*, 40: 8775-8779.

STADLER, M.; BAUMGATNER, M.; GROTHE, T.; MUHLBAUER, A.; SEIP, P.; WOLLWEBER, H. 2001. Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Daldinia concentrica*. *Phytochemistry*, 56(8): 787-793.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc.Tecnol. Aliment.*18(4): 382-385p.

STIERLE, A.; STOBEL, G. & STIERLE, D. 1993. Taxol and taxane production by *taxonomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science*, washington, v. 260, 214-6p.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M. M.;TEPLOW, D. B.; HESS, W. M. 1999. Cryptocandin, a potent antimicotic from the Endophytic fungus *cryptosporiopsis* cf. *Quercina*. *Microbiology*. 17: 417-423p.

TEIXEIRA, M.F.S. 1994. Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicos e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos. **Dissertação de Mestrado**.

TEJESVI, V.M.; MAHESH, B.; NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S.; KIMI, K.R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. 2005. Endofhytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1535-1540.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M. F. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. INPA. Manaus. 1979. 95 p. il.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil**. Ed. Helianthus. Rio de Janeiro. 2000. 320 p. il.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**. v. 40. p. 1635-1660. 2002.

YATES I.E., C.W. BACON & D.M. HINTON. 1997 Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. **Plant Diseases** 81 : 723-728.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. Strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS- Microbiology Letters*, 193:249-253p.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2009	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2010	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	R	R			R	R			R	R		
2	Recuperação de Linhagem	R											
3	Obtenção de Cultivo		R	R									
4	Ensaio Enzimáticos				R	R	R	R	R				
5	Elaboração do Resumo e Relatório Parcial						R						
6	Recuperação Enzimática						R	R	R				
7	Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)											R	
8	Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												R