



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

PAULA DANIELLE DE SOUZA VIEIRA

**Bioprospecção de Metabólitos Secundários de Fungos
Endofíticos associados à Planta Medicinal *Plantago major* L.
de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS)**

RECIFE

2014



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

**Bioprospecção de Metabólitos Secundários de Fungos
Endofíticos associados à Planta Medicinal *Plantago major* L.
de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS)**

PAULA DANIELLE DE SOUZA VIEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta

Co-orientadoras: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta
Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

RECIFE

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Vieira, Paula Danielle de Souza

Bioprospecção de metabólitos secundários de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Plantago major* L. do interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) / Paula Danielle de Souza Vieira. – 2014.

102 f. : il.

Orientadora: Ivan da Rocha Pitta.

Coorientadora: Cristina Maria de Souza Motta.

Coorientadora: Norma Buarque de Gusmão.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2014.

Inclui referências.

1. Fungos. 2. Plantas medicinais. I. Pitta, Ivan da Rocha (Orientador). II. Motta, Cristina Maria de Souza (Coorientadora). III. Gusmão, Norma Buarque de (Coorientadora). IV. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2016 - 229

PAULA DANIELLE DE SOUZA VIEIRA

**Bioprospecção de Metabólitos Secundários de Fungos
Endofíticos associados à Planta Medicinal *Plantago major* L.
de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

TESE APROVADA EM: 21/02/2014

BANCA EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta (Orientador, Departamento de Antibióticos-UFPE/PE)

Profa. Dra. Neiva Tinti de Oliveira (Departamento de Micologia-UFPE/PE)

Profa. Dra. Janete Magali de Araújo (Departamento de Antibióticos-UFPE/PE)

Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva (Departamento de Micologia-UFPE/PE)

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz/SP)

SUPLENTE

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Departamento de Micologia-UFPE/PE)

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Departamento de Bioquímica-UFPE/PE)

Dedico este trabalho ao meu querido Pai,

“Leonardo Vieira” (in memoriam)...

Com você aprendi que vale a pena semear o amor, viver com simplicidade, ser feliz com um sorriso, ter respeito pelo próximo, irradiar alegria, fazer o bem pelo simples prazer de fazer o bem e, sobretudo, a lutar por quem amamos. Por isso é tão difícil de dizer adeus!! Teus ensinamentos estarão para sempre guardados em meu coração!!

Obrigada por estar comigo em todos os momentos da minha vida, compartilhando as minhas vitórias. Sei que se aqui estivesse sentirias muito orgulho em ver que segui o teu conselho e continuei em frente. Nas páginas que seguem está o resultado do meu esforço em continuar!! E toda essa pesquisa, e toda essa vitória, eu dedico a você!!

Eternas Saudades!!

Agradecimentos

A Deus que não me abandonou em nenhum momento, me dando força e coragem para que eu chegasse até aqui.

Ao meu marido, Wendell Medrado, pelo companheirismo, amor e contínuo incentivo em todos os momentos. Pelos sábios conselhos e pelo ombro amigo de sempre. Por depositar em mim a confiança que por muitas vezes perdi.

À minha orientadora, Profa. Dra. Suely Galdino (*in memoriam*), pela credibilidade e confiança em mim depositadas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, à Professora Maira Pitta e à minha co-orientadora, Profa. Cristina Motta pelos ensinamentos, paciência e por toda ajuda no decorrer desta pesquisa.

À Prof. Dra. Norma Gusmão por sua orientação e estímulo no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por sua disponibilidade de tempo, por toda a ajuda, paciência e amizade de sempre e por suas palavras de ânimo.

À Profa Débora Maria de Massa Lima pela colaboração na identificação dos fungos isolados e pelos cuidados dispensados.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelas lições e conhecimentos transmitidos.

A todos os amigos agradeço pelos momentos de cooperação e desconcentração vividos, e pela amizade.

A minhas estagiárias Mayana Oliveira Ramos e Laís Regina Martins por estarem sempre ao meu lado me auxiliando no decorrer dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

À Empresa FRUTOTAL e à Usina OLHO D'ÁGUA que cederam os resíduos agroindustriais utilizados nos experimentos.

A todos vocês que tanto fizeram parte desta etapa da minha vida como personagens importantes, o meu eterno agradecimento e a certeza de que hoje vocês dividem comigo a felicidade desta vitória.

RESUMO

A bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos constitui uma atividade promissora na pesquisa e detecção de novas espécies capazes de produzir compostos com atividades biológicas de interesse na área de saúde e na agrônômica. O objetivo deste estudo foi isolar e determinar a frequência de colonização de fungos endofíticos associados a folhas, pecíolos, raízes e sementes da planta medicinal *Plantago major*, avaliar sua capacidade para produzir metabólitos secundários com ação antibacteriana e antifúngica frente a micro-organismos patogênicos, bem como analisar a eficiência da utilização de resíduos agroindustriais como meios de cultivo alternativos para endofíticos, visando à produção de esporos e de compostos bioativos. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Phoma eupyrena*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium* e *Pestalotiopsis maculans*. Os resultados obtidos apontam os fungos endofíticos associados a *P. major* como uma fonte promissora de metabólitos secundários bioativos, onde esses compostos podem ser obtidos a baixo custo por fermentação em resíduos agroindustriais de arroz e maracujá.

Palavras chave: Bioatividade, fungos endofíticos, *Plantago major*.

ABSTRACT

Bioprospecting of secondary metabolites produced by endophytes is a promising activity in research and detection of new species capable of producing compounds with biological activities of interest in the area of health and agronomy. The aim of this study was to isolate and determine the frequency of colonization of endophytic fungi associated with leaves, petioles, roots and seeds of medicinal plant *Plantago major*, assess its ability to produce secondary metabolites with antibacterial and antifungal against pathogenic to humans and plants share microorganisms, as well as analyze the efficiency of the use of agroindustrial wastes as alternative means of cultivation for endophytic, aimed at producing spores and bioactive compounds. The most frequently isolated species were *Phoma eupyrena*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium* and *Pestalotiopsis maculans*. The results obtained indicate the endophytic fungi associated with *P. Major* as a promising source of bioactive secondary metabolites, where these compounds can be obtained at low cost by fermentation of agroindustrial waste rice and passion fruit.

Keywords: Biactive, endophytic fungi, *Plantago major*.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfologia da planta medicinal <i>Plantago major</i> L. (Foto: a autora).....	14
Figura 2. Mecanismos de colonização dos fungos endofíticos (A) em comparação com o de fungos fitopatogênicos (B). Adaptado de Kogel et al. (2006).....	18
 CAPÍTULO 1	
Figura 1. Locais de coleta: ■ Horta didática de Plantas Medicinais do Setor de Fitoterápicos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA); ■ Centro de Saúde Alternativa da Muribeca (CESAM) em Jaboatão dos Guararapes; ■ Horta comunitária em Petrolina.....	64
Figura 2. Fungos endofíticos encontrados em associação com pecíolos, raízes, sementes e folhas de <i>Plantago major</i> . A: <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; B: <i>Colletotrichum dematium</i> ; C: <i>C. gloeosporioides</i> ; D: <i>Curvularia lunata</i> ; E: <i>Fusarium lateritium</i> ; F: <i>F. Oxysporum</i> ; G: <i>F. verticillioides</i> ; H: <i>Gliocladium virens</i> ; I: <i>Glomerella cingulata</i> ; J: <i>Guinardia bidwelli</i> ; K: <i>Nigrospora sphaerica</i> ; L: <i>Pestalotiopsis maculans</i> ; M: <i>Phoma eupyrena</i> ; N: <i>Phomopsis archeri</i> ; O: <i>Trichoderma piluliferum</i> ; P: <i>Verticillium chlamydosporium</i> var. <i>catenulatum</i> (Foto: a autora).....	65
Figura 3. Frequência de colonização dos fungos endofíticos (FC%) nas diferentes partes (pecíolos, raízes, sementes e folhas) da planta medicinal <i>Plantago major</i> , coletadas em hortas de plantas medicinais do CESAM, IPA e Petrolina, durante os períodos de estiagem e chuvoso. As barras seguidas pela mesma letra em cada parte da planta não apresentam diferença significativa baseado no teste de tukey a 5% de probabilidade.....	66
 CAPÍTULO 3	
Figura 1. Halos de inibição dos extratos brutos acetotílicos dos fungos endofíticos cultivados em meio arroz frente a bactérias de importância médica. A: <i>Staphylococcus aureus</i> 1- <i>Phomopsis archeri</i> ; 2- <i>Trichoderma piluliferum</i> ; 3- <i>Fusarium lateritium</i> ; 4- Controle do solvente acetato de etila; 5: Controle positivo (cloranfenicol); 6: extrato de arroz controle negativo. B: <i>Bacillus subtilis</i> 1- <i>Trichoderma piluliferum</i> ; 2- <i>Pestalotiopsis maculans</i> ; 3: <i>Fusarium lateritium</i> ; 4: <i>Fusarium oxysporum</i> ; 5: Controle positivo (tetraciclina); 6: extrato de arroz controle negativo	97
Figura 2. Halos de inibição dos extratos brutos acetotílicos dos fungos endofíticos cultivados em meio maracujá frente a bactérias de importância médica. A: <i>Staphylococcus aureus</i> 1- <i>Pestalotiopsis maculans</i> ; 2- Controle positivo (cloranfenicol); 3- Controle do solvente, acetato de etila; 4: <i>Curvularia lunata</i> ; 5: <i>Fusarium oxysporum</i> ; 6: extrato de maracujá como controle negativo. B: <i>B. subtilis</i> 1- <i>Fusarium oxysporum</i> ; 2- <i>Fusarium lateritium</i> ; 3: <i>Curvularia lunata</i> ; 4: <i>Pestalotiopsis maculans</i> ; 5: Controle positivo (tetraciclina); 6: extrato de maracujá como controle negativo.....	97

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos de plantas medicinais.....	31
Tabela 2. Produção de metabólitos secundários utilizando resíduos agroindustriais.....	34
CAPÍTULO 1	
Tabela 1. Dados Meteorológicos das áreas de coleta durante nos períodos de estiagem e chuvoso.....	62
Tabela 2. Frequência de colonização dos fungos endofíticos em pecíolos, raízes, sementes e folhas de amostras da planta medicinal <i>Plantago major</i> coletadas em hortas de plantas medicinais do CESAM, do IPA e de Petrolina, durante os períodos de estiagem e chuvoso.....	63
CAPÍTULO 2	
Tabela 1. Halos de inibição dos micro-organismos teste frente aos fungos endofíticos.....	83
Tabela 2. Avaliação do Antagonismo dos Fungos Endofíticos de <i>Plantago major</i> frente aos fungos fitopatogênicos <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>	84
Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de fungos endofíticos e de amostras secas e frescas de pecíolos, raízes, sementes e folhas de <i>Plantago major</i> frente a bactérias e fungos de importância médica e agrícola.	85
CAPÍTULO 3	
Tabela 1. Relação dos fungos endofíticos bioativos da planta <i>Plantago major</i> utilizados no experimento.....	90
Tabela 2. Produção de esporos por fungos endofíticos em diferentes substratos: grãos de arroz, cascas de maracujá, resíduos de abacaxi, bagaço de laranja, cascas de tomate e bagaço de cana-de-açúcar.....	93
Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos de <i>Plantago major</i> cultivados em diferentes substratos sólidos (grãos de arroz, cascas de maracujá, resíduos de abacaxi) frente a micro-organismos de importância médica e agrícola.....	95
Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos de <i>Plantago major</i> cultivados em diferentes substratos sólidos (bagaço de laranja, cascas de tomate, bagaço de cana-de-açúcar) frente a micro-organismos de importância médica e agrícola.....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1	TRANSAGEM (<i>Plantago major</i> L.): ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	14
3.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	16
3.2.1	Interação Ecológica entre Fungos Endofíticos e Plantas.....	16
3.2.2	Diversidade dos Fungos Endofíticos.....	20
3.2.3	Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Hospedeiro.....	22
3.2.4	Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Tipo de Órgão e Tecido Vegetal.....	23
3.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	25
	REFERÊNCIAS.....	32
4	CAPÍTULO 1. FUNGOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA MEDICINAL <i>Plantago major</i> L. (LÍNGUA DE VACA).....	49
4.1	INTRODUÇÃO.....	51
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.2.1	Material Vegetal e Local de Coleta.....	52
4.2.2	Isolamento dos Fungos Endofíticos.....	53
4.2.3	Identificação dos Fungos Endofíticos.....	53
4.2.4	Análise Estatística.....	54
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	59
5	CAPÍTULO 2. POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PLANTA MEDICINAL <i>Plantago major</i> L. E DE SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	67
5.1	INTRODUÇÃO.....	69
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	70
5.2.1	Origem e Manutenção dos Fungos.....	70
5.2.2	Seleção de Fungos Endofíticos de <i>Plantago major</i> com Potencial Antimicrobiano- Atividade Antimicrobiana pelo Método de Ichicawa...	70
5.2.3	Avaliação <i>in vitro</i> do Antagonismo contra Fungos Fitopatogênicos – Técnica de Cultura Pareada.....	71
5.2.4	Ensaio Fermentativo com os Fungos Endofíticos mais Promissores para Extração de Metabólitos Bioativos.....	72
5.2.5	Elaboração de Extratos do Vegetal <i>Plantago major</i>.....	73
5.2.6	Avaliação da 9 Susceptibilidade <i>in vitro</i> aos Antimicrobianos produzidos por <i>Plantago major</i> e seus Fungos Endofíticos (Método de Difusão em Disco de Papel).....	73
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74

5.3.1	Seleção de Fungos Endofíticos com Maior Potencial Antimicrobiano (Método de Ichicawa).....	74
5.3.2	Avaliação <i>in vitro</i> do Antagonismo contra Fungos Fitopatogênicos – Técnica de Cultura Pareada.....	75
5.3.3	Ensaio Fermentativo e Avaliação de Susceptibilidade “in vitro” aos Antimicrobianos.....	77
	REFERÊNCIAS.....	79
6	CAPÍTULO 3. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA CULTIVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS.....	86
6.1	INTRODUÇÃO.....	88
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	89
6.2.1	Origem e Manutenção dos Fungos.....	89
6.2.2	Ensaio Fermentativo: visando à produção de esporos e de metabólitos bioativos.....	90
6.2.3	Obtenção dos Extratos Brutos dos Fungos Endofíticos.....	91
6.2.4	Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Acetoetílicos (Método de Difusão em Disco de Papel).....	91
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
6.3.1	Ensaio Fermentativo: Produção de Esporos.....	92
6.3.2	Atividade Antimicrobiana dos Extratos dos Fungos Endofíticos.....	94
	REFERÊNCIAS.....	98
	CONCLUSÕES.....	102

1. INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos vivem no interior das plantas pelo menos em um período de seu ciclo de vida (Petrini, 1991) e ao contrário dos patogênicos, não causam doenças aparentes em seus hospedeiros. Assim, os fungos endofíticos podem promover a sanidade da planta hospedeira, favorecendo o seu potencial adaptativo frente a condições adversas geradas pelo estresse do meio ambiente (estresse abiótico, como o estresse hídrico, à salinidade, estresses oxidativos, acidez do solo; estresse biótico frente ao ataque de insetos e micro-organismos) por meio da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos. Esta relação de simbiose confere maior habilidade competitiva às plantas e estimula seu pleno desenvolvimento (Schardl; Phillips, 1997; Liu et al., 2001; Faeth, 2002; Schardl et al., 2007; Selosse et al., 2004; Azevedo; Araújo, 2007).

Esses endofíticos têm sido registrados em várias espécies de plantas de diferentes biomas como a tundra, os desertos, as florestas tropicais e as regiões do Ártico e da Antártica (Rosa et al., 2012).

Os endofíticos são vistos como uma excelente fonte de produtos naturais bioativos, porque muitos deles ocupam nichos biológicos únicos no interior dos órgãos vegetais (Strobel; Daisy, 2003; Strobel, 2002; Verma et al., 2009). Desse modo, mais de 8.600 metabólitos bioativos de origem fúngica têm sido descritos (Berdy, 2005).

Plantas medicinais têm sido reconhecidas como um reservatório de fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários, com diferentes atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, citotóxica e anti-parasítica, por isso diversos estudos tem sido desenvolvidos, envolvendo o isolamento desses fungos e a investigação quanto ao potencial de aplicação de seus compostos bioativos na área farmacológica, agrícola ou biotecnológica (Tan; Zou, 2001; Gunatilaka, 2006; Targa et al., 2011; Orlandelli et al., 2012; Garcia et al., 2012; Rhoden et al., 2012).

Com o surgimento de micro-organismos cada vez mais resistentes a antibióticos utilizados na terapêutica convencional, ocasionado muitas vezes pelo uso clínico irracional, a busca por novos e eficazes antimicrobianos constitui uma estratégia relevante para a biotecnologia e para a saúde humana e animal (Strobel et al., 2004).

Os fungos endofíticos podem sintetizar produtos antimicrobianos idênticos ou semelhantes aos produzidos por suas plantas hospedeiras, mas distintamente das

plantas, os endofíticos podem ser cultivados rapidamente e a biomassa e compostos bioativos podem ser produzidos em larga escala por fermentação (Prabavathy; Valli Nachiyar, 2013).

Tendo em vista as considerações acima, *Plantago major* (conhecida popularmente como língua de vaca) foi selecionada para este estudo, uma vez que é uma planta medicinal inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) e apresenta propriedades fitoterápicas comprovadas, principalmente, ação anti-inflamatória e antibacteriana sobre micro-organismos da placa dental e gengivite (Memento terapêutico, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos encontrados na planta medicinal *Plantago major* L., de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e determinar a frequência de colonização de fungos endofíticos associados a folhas, pecíolos, raízes e sementes da planta medicinal *Plantago major*, e realizar um levantamento de sua distribuição nos diferentes órgãos do vegetal.
- Incorporar espécimes de fungos endofíticos identificados ao acervo da micoteca-URM da UFPE.
- Avaliar o potencial de *Plantago major* e de seus fungos endofíticos para produzir metabólitos secundários com ação antibacteriana e antifúngica frente a micro-organismos patogênicos ao homem e a plantas.
- Analisar a eficiência da utilização de resíduos agroindustriais como meios de cultivo alternativos de baixo custo para fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Plantago major*, visando à produção de esporos e de metabólitos secundários bioativos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Transagem (*Plantago major* L.): Aspectos Botânicos e Atividade Biológica

A transagem pertence à família das plantagináceas, gênero *Plantago* e compreende muitas espécies, dentre as quais destacam-se: *Plantago major* L., *P. australis* Lam. var *hirtella* (HBK) Banhn, *P. guilhemiana* Desc., *P. catharinea* Desc. e *P. tomentosa* Engl. Todas estas são conhecidas vulgarmente no Brasil como língua-de-vaca, plantagem, tanchagem, tansagem ou transagem. São plantas perenes, eretas, sem caule, com raízes curtas e fibrosas, atingido em média de 40-50 cm de altura. Suas folhas, com formato variado, são dotadas de nervuras bem marcadas. Os pecíolos saem diretamente do solo e medem cerca de 20 cm de comprimento. As flores são pequenas, entre esverdeadas e acastanhadas, agrupadas em espigas alongadas (Figura 1) (Martins et al., 2000).



Figura 1. Morfologia da planta medicinal *Plantago major* L.
(Foto: a autora).

Pode-se observar na mesma planta várias espigas com idade e altura diferentes, o que possibilita, mais tarde, a existência de sementes se propagando por um período de tempo mais longo do que se todas as espigas se desenvolvessem na mesma época. Os frutos são muito pequenos, com sementes escuras. Como uma típica planta originária de clima temperado, costuma se desenvolver melhor em solos úmidos e locais frescos e com boa iluminação (Samuelsen, 2000).

Plantago major contém compostos biologicamente ativos como polissacarídeos, lípidios, derivados de ácido caféico, flavonóides, iridóides e terpenóides. Também foram isolados dessa planta alcalóides e alguns ácidos orgânicos; por isso apresenta uma série de atividades biológicas que incluem a cicatrização de feridas, ação anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antibiótica, regulatória do sistema imune e atividade antiulcerogênica, o que faz o seu uso bastante frequente na medicina popular (Samuelsen, 2000).

Ranv e Briner (1988) e Handjieva (1991) caracterizaram quimicamente um glicosídeo isolado do *Plantago major* ao qual denominou de Plantamajosídeo, com capacidade de inibir bactérias e fungos.

Estudos com espécies de *Plantago* realizados na Universidade Federal do Paraná comprovaram a presença de aucubina e catalpol responsáveis pela ação anti-inflamatória e antibiótica, onde Zanon et al. (1999) demonstraram o efeito antiviral do extrato alcoólico de *P. brasilienses* e *P. major* contra o vírus *Herpes suis*, inibindo duas vezes mais a infectividade desse vírus.

Das folhas de *Plantago major* também foi isolado o polissacarídeo solúvel PMII que, ao ser administrado, conferiu a camundongos infectados por *Streptococcus pneumoniae*, proteção contra infecção sistêmica (Herland, 1999).

Holetz et al. (2002) verificaram o efeito antifúngico do extrato da planta *Plantago major* contra *Candida krusei* e *C. tropicalis*, isoladas de pacientes com candidose.

Freitas et al. (2002) comprovaram, através do estudo microbiológico pelo método de difusão em meio sólido, a atividade antiestafilocócica do extrato hidroalcoólico de *P. major* frente a doze isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, obtidos de feridas abertas da pele, secreções vaginais e da orofaringe.

Estudos etnobotânicos de Lorenzi e Mattos (2008) citam a utilização popular não somente das folhas de *P. major*, mas também das sementes, flores e raízes.

A atividade antiparasitária do extrato de *P. major* foi determinada por Ponce-Macotella et al. (1994). Os resultados mostraram que cerca de 76% dos trofozoítos de *Giardia duodenalis* foram inviabilizados. Este valor foi muito próximo do obtido para o padrão tinidazol responsável pela inviabilidade de 79% dos trofozoítos.

Baseando-se em dados etnobotânicos e etnofarmacológicos, Gálvez et al. (2003) desenvolveram um estudo *in vitro* no qual obtiveram um extrato metanólico a partir das folhas de *Plantago major* o qual apresentou efeito citotóxico, inibindo o crescimento de duas linhagens de células humanas de câncer: adenocarcinoma de mama humano e melanoma humano.

Por meio de um estudo *in vivo* utilizando camundongos, Ozaslan et al. (2009) atestaram que o extrato aquoso bruto obtido a partir das folhas de *P. major* impediu a proliferação do carcinoma ascístico de Ehrlich.

O efeito anti-inflamatório e antibacteriano de *Plantago major* sobre micro-organismos da placa dental e gengivite, como *Porphyromonas gengivales* e *Prevotella melaninogenica*, já foi comprovado por diversos estudos, sugerindo a utilização dessa planta como suplemento efetivo para controle da gengivite e da placa bacteriana supra gengival, o que justifica o uso dessa planta, popularmente, como enxaguante bucal (Memento terapêutico, 2002; Freitas, 2002; Silva et al., 2006).

3.2. Fungos Endofíticos

3.2.1. Interação Ecológica entre Fungos Endofíticos e Plantas

As plantas estabelecem associações com diferentes micro-organismos como fungos e bactérias, dentre estes destacam-se bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos e micro-organismos endofíticos. Durante os últimos 30 anos o termo endofítico, que vem do grego (*éndon*= dentro + *phytón*= planta) tem sido utilizado na literatura para descrever a micobiota que vive internamente nas plantas. Conforme citado por Azevedo (2000) foi De Barry, em 1866, quem primeiro usou este termo ao se referir a fungos que vivem dentro dos tecidos vegetais, delineando uma possível distinção entre os fungos endofíticos e os patógenos de plantas.

Carroll em 1986 restringiu o uso do termo endofítico a organismos endossimbiontes que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo as micorrizas e os fungos patogênicos.

Petrini (1991) propôs a expansão da definição de Carroll, incluindo todos os micro-organismos que, em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos da planta, sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. Esta definição pode ser aplicada não somente aos simbioses ou neutros, mas também a patógenos latentes e inativos (Petrini, 1991; Azevedo, 1998; Selosse et al., 2004). E, finalmente, uma definição mais atual afirma que os endofíticos são micro-organismos que podem ou não crescer em meios de cultura e que colonizam o interior de tecidos e órgãos vegetais, de forma assintomática, inaparente, sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (Azevedo; Araújo, 2007; Hyde; Soyong, 2008).

Os mecanismos de colonização dos tecidos vegetais por fungos endofíticos ocorrem por transmissão horizontal ou vertical. No primeiro mecanismo, esporos de fungos são levados de um vegetal para outro por meio de fatores abióticos, como o vento ou biótico, como insetos. Nesse caso, os fungos podem colonizar o hospedeiro, quando os esporos aerotransportados penetram no vegetal por aberturas naturais como estômatos e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta como folhas e caule ou por aberturas artificiais como fissuras sofridas pela ação de pragas, animais e agressões abióticas. Enquanto que, na transmissão vertical, que tem sido amplamente estudada em gramíneas, os fungos são transmitidos entre gerações através das sementes, contendo fungos da planta hospedeira (Petrini, 1991; Saikkonen et al., 2004; Marinho et al., 2005; Johri, 2006).

Uma vez dentro de sua planta hospedeira, os endofíticos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminar pelo sistema vascular, colonizando, geralmente, os espaços existentes entre as células do vegetal (Bacon; White, 2000). As faces vasculares e os espaços entre as células são o principal nicho destes fungos (Figura 2) (Kogel et al., 2006). Os nutrientes que compõem a seiva e as células mortas existentes nesses espaços lhes brindam com o alimento necessário para seu desenvolvimento (Strobel, 2003; Saikkonen et al., 2004; Schulz; Boyle, 2005). Enquanto que os fungos fitopatogênicos produzem haustórios que são estruturas que invadem as células do hospedeiro em busca dos nutrientes de que o fungo necessita para sobreviver, por isso o principal nicho ocupado por esses fungos é o interior das células vegetais (Kogel et al., 2006).

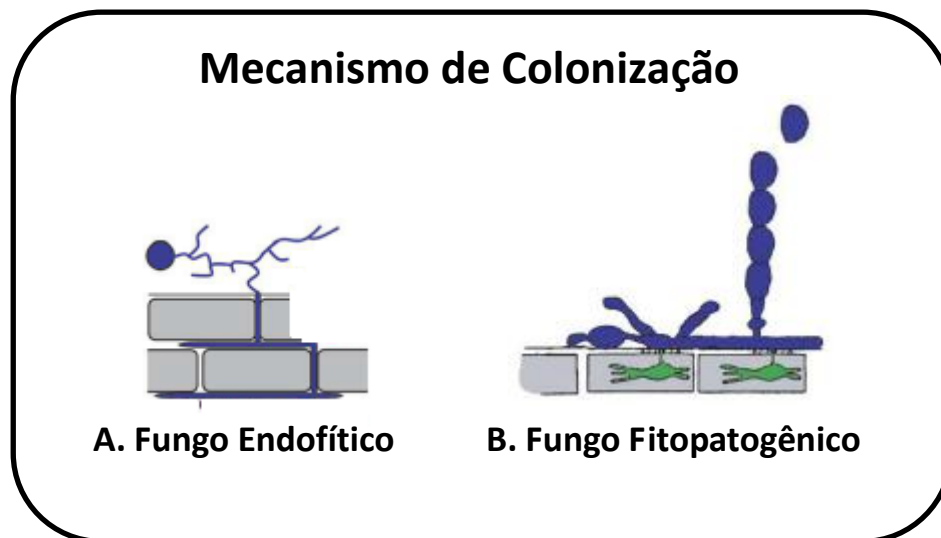


Figura 2. Mecanismos de colonização dos fungos endofíticos (A) em comparação com o de fungos fitopatogênicos (B). Adaptado de Kogel et al. (2006).

De acordo com Schulz e Boyle (2005), a colonização assintomática dos fungos endofíticos resulta de uma relação antagônica balanceada, onde ocorre um equilíbrio entre a patogenicidade do fungo endofítico e a resposta de defesa do hospedeiro. Desse modo a variabilidade dessa interação dependeria não só da adaptação ao hospedeiro, mas também de fatores de patogenicidade do endofítico, em resposta a defesa do hospedeiro e às condições ambientais.

No interior dos vegetais, os fungos endofíticos também podem ficar ativos ou assumir um estágio de latência (repouso), comportando-se assim ou por toda a vida útil do tecido vegetal infectado ou por um período prolongado de tempo. Em determinadas situações podem se tornar patogênicos em algum momento de oportunismo, como a fragilidade dos mecanismos de defesa da planta (Faeth, 2002; Strobel *et al.* 2004; Selosse et al., 2004; Saikkonen et al., 2004; Schultz; Boyle, 2005; Kogel et al., 2006; Sieber 2007; Aly *et al.* 2010).

Essa íntima relação de simbiose entre fungos e vegetais, provavelmente, foi iniciada a cerca de 100 milhões de anos com o surgimento das primeiras plantas na Terra (Strobel, 2003).

Durante a evolução das plantas, os fungos endofíticos ocorreram e promoveram grande potencial adaptativo às espécies vegetais hospedeiras frente a condições adversas

geradas pelo estresse, seja ele do tipo abiótico, como a seca, salinidade, estresses oxidativos, solos ácidos com alto teor de Zn e Al entre outros; ou biótico como o ataque de insetos, micro-organismos e animais herbívoros, por meio da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos aos seus inimigos. Esta simbiose confere maior habilidade competitiva às plantas, protegendo-a contra doenças, repelindo insetos, e permite um pleno desenvolvimento, traduzido por altas taxas de germinação e enraizamento e maior produção de sementes. E assim, os fungos endofíticos desempenham papel fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas e na biodiversidade (Schardl; Phillips, 1997; Li et al., 2000; Arnold et al., 2000; Azevedo et al., 2000; Zou et al., 2000; Li; Strobel, 2001; Liu et al., 2001; Redman et al., 2002; Strobel, 2003; Azevedo, 2004; Gunatilaka, 2006; Akello et al., 2007; Bae et al., 2008).

Nesse sentido, diversos fungos endofíticos têm sido descritos como sendo importantes para a proteção do hospedeiro contra insetos, é o caso de *Acremonium lolii*, *Balansia cyper*, *Cladosporium sphaerosperum*, *Muscudor vitigenus* e *Phomopsis oblonga*, que produzem substâncias que atuam como um repelente de insetos (Azevedo et al. 2000; Lewis et al., 2000; Gómez-Vidal et al., 2009).

Os fungos *Trichoderma* em feijão e *Piriformospora indica* em tomateiros, promovem o crescimento vegetal e isto se deve, principalmente, a produção de fitormônios (Azevedo, 1998; Azevedo et al., 2000; Tan; Zou, 2001; Strobel, 2003; Bandara et al., 2006).

O fungo endofítico de gramíneas *Neotyphodium* sp. atua como agente anti-herbivoria, apresentando compostos como a ergopeptina e ergovalina, que agem no sistema nervoso central elevando a temperatura corpórea, provocando vasoconstrição e reduzindo os níveis de prolactina nos animais. As neurotoxinas Lolitrem A e B causam a dificuldade na movimentação dos animais que se alimentam da gramínea. A peramina, a pirrolizidina e a pirrolopirazina atuam como um inseticida, tornando a planta menos atrativa para os insetos. *Neotyphodium* aumenta a tolerância à seca para seu hospedeiro *Festuca aerundinacea*, o crescimento da raiz, a produção de sementes, germinação, captação de fósforo e resistência a nematóides e insetos (Saikkonen et al., 1998; Gamboa; Bayan, 2001; Panaccione et al., 2001; Otero et al., 2002; Vila-Aiub et al., 2003).

Alguns autores sugerem que certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, como algumas enzimas (celulases e

ligninases) em *Xylaria* sp. e fatores de crescimento como a giberelina em *Fusarium moniliforme* (Strobel, 2003). Além do clássico exemplo do fungo *Taxomyces andreanae* isolado da planta *Taxus brevifolia*, que assim como sua planta hospedeira produz o taxol, um composto antitumoral.

3.2.2. Diversidade dos Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos são muito diversos, sendo encontrados em todas as plantas estudadas até o presente: algas, briófitas, pteridófitas, coníferas, arbustos e árvores em geral (Petrini et al., 1981; Hawksworth, 1998; Legault et al., 1989; Schulz et al., 1993; Melnroy; Kloepper, 1995; Fisher, 1996; Faeth; Hammon, 1997; Strobel et al., 1999; Arnold et al., 2000; Hawksworth, 2000; Huang et al., 2001; Gamboa et al., 2002; Chen et al., 2003; Taechowisan et al., 2003; Kumar; Hyle, 2004; Gonthier et al., 2006; Li et al., 2007; Rungjindamai et al., 2008; Sánchez Márquez et al., 2008; Tao et al., 2008; Aly et al., 2010; Madki et al., 2010; Kharwar et al., 2011; Miao et al., 2011; Vieira et al., 2011; Zhou et al., 2011; Nath et al., 2012; Gond et al., 2012; Rosa et al., 2012; Ramesha et al., 2013; El-Khawaga et al., 2013).

Os estudos revelam a presença de fungos endofíticos até em plantas isoladas de ambientes com condições climáticas extremas com grande variação de temperatura e escassez de nutrientes, como é o caso dos fungos que vivem em associação com a planta *Combretum leprosum* do bioma Caatinga do semi-árido brasileiro (Santos, 2012); e dos fungos que vivem em angiospermas adaptadas às condições extremófilas da Antártica (Santiago, 2011).

Diversos fungos endofíticos já foram registrados em plantas de regiões tropicais e subtropicais, mas ainda existem muitas espécies encontradas em associação com vegetais tropicais e que ainda não foram descritas (Rodrigues; Samuels, 1990; Fisher; Petrini, 1992; White, 1993; Rodrigues, 1994; Fisher et al., 1996; Arnold et al., 2000;).

No Brasil, devido à extensão territorial e à variedade de ecossistemas, estima-se que seja alta a diversidade de fungos endofíticos. Estudos com algumas espécies vegetais nativas registraram grande número desses fungos: cerca de 500 espécies em palicourea (*Palicourea longiflora*, nativa da Amazônia), 340 em cacaueiro (*Theobroma cacao*, nativa de florestas tropicais úmidas), 130 em mororó (*Bauhinia brevipes*, de cerrado) e 70 em alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*, amplamente distribuída no cerrado) (Oki et al., 2007).

Grande diversidade endofítica também foi relatada nos isolamentos realizados em açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.), bananeira (*Musa* sp.), coqueiro (*Cocus nucifera* L.), citrus (*Citrus limon* L.), cajazeiro (*Spondias mombin* L.), guaranazeiro (*Paullinia cupana* Mart.), cupuaçu (*Thebroma grandiflorum* Willd), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne), imbaúba (*Cecropia sciadophylla*), cumaru (*Dipterix odorata*), sucuba (*Himatanthus sucuba* Spruce), cacau (*Theobroma cacao* L.), pupunha (*Bactris gasipae* Kunth), macieira (*Malus domestica*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), milho (*Zea mays* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.), gravioleira e cajueiro, dentre outros (Mariano et al., 1997; Franken et al., 1998; Guimarães, 1998; Medeiros-Galvão, 1998; Rodrigues; Samuels, 1999; Drumond et al., 2000; Magalhães, 2000; Araújo et al., 2001; Photita et al., 2001; Costa-Neto, 2002; Rondon, 2003; Cruz, 2004; Photita et al., 2004; Camatti-Sartori et al., 2005; Rubini et al., 2005; Silva et al., 2006; Cardoso et al., 2009; Vieira et al. 2011).

De acordo com Schulz e Boyle (2005) os fungos endofíticos podem ser divididos, artificialmente, em dois grupos distintos: o grupo dos balansiaceos, que especificamente coloniza gramas e o grupo dos não-balansiaceos. O primeiro grupo compreende os gêneros de ascomicetos *Epichloë* e *Balansia* e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*, sendo encontrados crescendo de forma sistêmica e intercelular em todos os órgãos de gramíneas, resultando na transmissão vertical através das sementes (Bacon; White, 2000). Apresentam estruturas especializadas originadas pela diferenciação do micélio para a absorção de nutrientes e muitos produzem uma variedade de metabólitos secundários (Schulz; Boyle, 2005). A relação entre fungos balansiaceos e seus hospedeiros vem sendo considerada mutualista, sendo que o fungo beneficia-se com o ganho nutricional e proteção contra estresse abiótico, enquanto a planta beneficia-se pela proteção contra herbivoria através da produção de alcalóides tóxicos por parte do fungo (Saikkonen et al., 2004).

O segundo grupo, os não-balansiaceos, representa um grupo diverso, correspondendo, em sua maioria, a espécies de diferentes famílias do filo Ascomycota, são mais comumente encontradas como endofíticos, sendo isoladas de todos os órgãos em praticamente quase todas as plantas terrestres (Petrini, 1991; Schulz; Boyle, 2005; Stone et al., 2004), compreendendo, frequentemente, os ascomicetos que produzem ascostromas (Loculoascomicetos) e os que produzem peritécios (Pirenomicetos) (Alexopoulos et al., 1996). As espécies deste filo possuem micélio compartimentalizado com septos, apresentando poros simples e são reconhecidas pela presença de células

reprodutivas em forma de sacos, denominadas ascos, contendo ascosporos que são formados durante a reprodução sexuada (Alexopoulos et al., 1996).

Representantes deste grupo ocorrem, momentaneamente, de maneira localizada ou sistêmica nos tecidos do hospedeiro. São cosmopolitas ocorrendo em ambientes temperados e tropicais, sendo os gêneros, *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora*, frequentemente isolados de uma gama de hospedeiros. (Schulz; Boyle, 2005).

Em plantas brasileiras, espécies de *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* e *Xylaria* são as mais freqüentes (Peixoto-Neto et al., 2002).

3.2.3. Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Hospedeiro

As informações quanto à especificidade dos fungos endofíticos por determinado hospedeiro ainda são muito escassas, apesar de Bayman et al. (1997) terem realizado um estudo com árvores tropicais e não terem encontrado nenhuma especificidade dos fungos pelo hospedeiro. Estudos anteriores demonstram que existem espécies de fungos endofíticos que apresentam especificidade por um gênero ou família de determinado hospedeiro, assim como o fungo *Phomopsis casuarinae* que é registrado como endofítico específico de *Casuarina* (Bose, 1947).

Já *Chloroscypha chloromela* foi observado somente em *Sequoia sempervirens* (Stone, 1986), *Phyllosticta pyrolae* e *P. vaccinii* são espécies restritas a hospedeiros das Eriales (Petrini, 1986).

Carroll (1986) relatou um outro caso de estreita especificidade entre endofítico e hospedeiro. O fungo *Rhabdocline parkeri* foi encontrado somente no pinheiro de Douglas (*Pseudotsugae menziesii*, Pinaceae) e mais em nenhuma outra conífera simpátrica no Nordeste dos EUA.

No entanto, a situação mais freqüente é encontrar o mesmo endofítico numa ampla gama de hospedeiros. Pereira (1993) citou os fungos *Colletotrichum* sp. e *Xylaria* sp. como sendo os endofíticos comuns em hospedeiros tropicais.

Como endofíticos de ocorrência em hospedeiros pertencentes a diferentes famílias de plantas, ou seja, endofíticos ubíquos, Petrini (1991) registrou os gêneros

Geniculosporium, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Cryptocline*, enquanto Carroll (1986) citou *Cryptosporiopsis* e *Leptostroma*.

Algumas espécies de fungos endofíticos são mais freqüentes em um determinado tipo de vegetal, sendo designada de dominantes, em contraposição a outras espécies mais raras, chamadas de secundárias. Em alguns casos, constata-se poucas espécies de fungos associadas ao vegetal, enquanto que, na maioria dos casos, como em *Stylosanthes* e *Musa*, é observada uma variedade enorme de gêneros e espécies (Pereira et al., 1999; Azevedo, 1998).

Um padrão de dominância de espécies foi verificado por Petrini e Carroll (1981), pois um fungo isolado com maior frequência em um hospedeiro, em outro, pode ser menos frequente. Estes menos frequentes parecem ser também menos específicos, pois são isolados num amplo espectro de hospedeiros. E existe ainda a hipótese de que cada espécie vegetal desenvolve uma comunidade endofítica altamente específica.

3.2.4. Especificidade dos Fungos Endofíticos ao Tipo de Órgão e Tecido Vegetal

Um fenômeno que aparece registrado tanto para zonas tropicais como temperadas, é o da especificidade desses fungos endossimbiontes por determinado órgão (raízes, caules, folhas, flores e frutos) do vegetal com o qual se encontram associados. Isto tem sido registrado para fungos xilariáceos em órgãos vegetais aéreos de árvores tropicais (Rodrigues; Samuels, 1990; Clay, 1992; Lodge et al., 1996; Nalini et al., 2005; Tejesvi et al., 2005; Gond et al., 2007).

Diferentes espécies de fungos endofíticos são encontradas em vários tecidos vegetais: parênquimas, dutos vasculares, epiderme, etc.. A preferência de alguns fungos endofíticos por determinados órgãos e tecidos vegetais pode ser reflexo da necessidade individual de cada fungo (Luginbuhl; Müller, 1980; Von Halmschlagel et al., 1993), e tem sido considerada, como uma estratégia, para a melhor utilização dos recursos encontrados no vegetal. O que reduz a concorrência entre eles, e impede o crescimento excessivo da população endofítica em determinados órgãos. Um exemplo, são as bananeiras que possuem mais fungos endofíticos nas raízes (67%) do que no córtex (23%) ou no cilindro central (10%) (Elbeltagy et al., 2001; Yonezawa et al., 2004; Franke-Whittle et al., 2005; Almeida et al., 2009; Esposito-Polesi, 2010; Piccolo et al., 2010).

A comunidade de fungos endofíticos encontrada nos diferentes órgãos vegetais pode ser influenciada pela morfologia da parte da planta, micromorfologia da superfície de cada órgão vegetal, a localização do órgão no vegetal e o seu estágio de desenvolvimento. A esses fatores devem ser adicionados o meio bioquímico, principalmente, a disposição de nutrientes e a presença ou ausência de compostos fungistáticos, que é determinada pela composição e fisiologia do órgão de acolhimento dos fungos endofíticos e da microflora associada (Rodrigues, 1994; Santamaria; Bayman, 2005; Osono, 2007).

Em um estudo com a árvore tropical *Gynoxis oleifolia* (Asteraceae), foram observadas algumas espécies de endofíticos que eram exclusivas de raiz, enquanto que outras espécies de fungos habitavam o caule e as folhas (Fisher, 1996).

Fungos endofíticos foram isolados de diferentes órgãos de *Amomum* sp., incluindo folhas, pseudocauls e rizomas e a maioria desses micro-organismos demonstraram preferência por um dos órgãos coletados. Duas novas espécies de Ascomycetes, *Gaeumannomyces amomi* e *Leiosphaerella amomi*, foram descobertas a partir de folhas e rizomas, respectivamente, e quatro espécies de *Pyricularia*, incluindo três novas espécies, foram isolados de folhas (Bussaban et al., 2001).

Ernest et al. (2003) investigaram a interação entre fungos endofíticos obtidos de diferentes órgãos de *Phragmites australis* ao longo do ano e evidenciaram que os fungos colonizavam o hospedeiro de forma diferenciada. Na primavera, o endofítico foi encontrado somente na raiz, enquanto no outono, foi encontrado em todo o vegetal.

Por outro lado, esta preferência de endossimbiontes por certos órgãos vegetais não é universal para as plantas tropicais. Em Porto Rico, em orquídeas epífitas do gênero *Lepanthes*, não foram observadas diferenças significativas entre os fungos endofíticos de raízes e caules (Bayman et al., 1997).

Pileggi (2006) isolou micro-organismos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes de *Maytenus ilicifolia*, mas nos isolamentos não foi constatada preferência dos fungos pelos órgãos analisados.

Silva et al. (2006) analisaram folhas, caules e raízes de plantas de pinha e graviola e somente os fungos endofíticos obtidos de pinha demonstraram preferência por um determinado tipo de tecido em detrimento de outro.

Sabe-se muito pouco acerca da distribuição dos fungos endofíticos nos tecidos de um mesmo órgão. É possível encontrar diferentes espécies em cada um dos tecidos de uma folha: parênquima, faces vasculares, derme, etc (Rodrigues, 1994).

A maioria dos endofíticos são relatados em folhas (Fröhlich et al., 2000; Photita et al., 2001; Huang et al., 2001) e há poucos relatos referentes ao isolamento e diversidade de endofíticos de caule, entrecasca e raízes das plantas tropicais (Tejesvi et al., 2007).

3.3. Atividade Biológica de Fungos Endofíticos de Plantas Medicinais

Os fungos endofíticos produzem, naturalmente, uma grande variedade de metabólitos secundários como terpenóides, esteróides, xantonas, chinonas, fenóis e isocumarinas (Tan; Zou, 2001; Strobel, 2003; Strobel et al., 2004; Gunatilaka, 2006).

Em geral, esses metabólitos secundários parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados. Apresentam algumas características como: distribuição taxonômica restrita, ou seja, nem todos os fungos de uma mesma espécie é capaz de produzir determinado metabólito; não são essenciais para o crescimento e reprodução do organismo; condições de cultivo, especialmente a composição do meio, controlam a formação destes metabólitos (Jay, 2005; Keller et al., 2005; Nigan, 2009).

Por outro lado, a síntese de metabólitos secundários pode garantir ao fungo vantagem em *habitats* no qual este necessita competir com outros micro-organismos. Portanto, muitos deles apresentam efeitos antibióticos, inibitórios em outros organismos (Khaldi et al., 2010).

Os antibióticos produzidos por fungos são definidos como produtos naturais orgânicos que são ativos em baixas concentrações, inibindo ou matando uma ampla variedade de agentes causadores de doenças, originadas por fungos, bactérias, vírus e protozoários que afetam os seres humanos e demais animais (Gunatilaka, 2006). Na “Era dourada dos antibióticos”, dos anos 40 aos anos 70 do século passado, destacou-se a descoberta da Penicilina por Alexander Fleming em 1928 e por sua produção por Chain e Florey em 1940.

Os micro-organismos endofíticos são encontrados em muitas espécies de plantas medicinais. E acredita-se que muitas propriedades medicinais de certas plantas podem estar co-relacionadas com metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos, possivelmente, durante o desenvolvimento das mesmas, e dessa forma, os organismos associados adquirem potencial genético para biossintetizar as mesmas classes de

substâncias (Yang et al., 1994; Strobel et al., 1997; Baker et al., 2000; Huang et al., 2001; Strobel; Daisy, 2003).

Nesse contexto, tem aumentado o interesse pelos estudos envolvendo o isolamento e a aplicação de fungos endofíticos extraídos de plantas medicinais (Azevedo et al., 2000; Bernardi-Wenzel et al., 2010; Targa et al., 2011; Siqueira et al., 2011; Garcia et al., 2012; Orlandelli et al., 2012; Rhoden et al., 2012; Xue et al., 2012; El-Khawaga et al., 2013; Powthong et al., 2013). Através da interação endofíticos/plantas, estes micro-organismos podem produzir grande variedade de substâncias de interesse, incluindo metabólitos secundários com aplicação farmacológica, sendo usados na produção de antimicrobianos que inibem o desenvolvimento de patógenos (Chareprasert et al., 2006; Phongpaichit et al., 2006; Strobel et al., 1999; Weber et al., 2007).

Rodrigues, Hesse e Werner (2000) isolaram os fungos endofíticos *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* da planta medicinal *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) que é utilizada no Brasil devido às suas propriedades antimicrobianas. A avaliação dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos isolados desta planta demonstraram excelentes resultados na inibição da atividade contra alguns micro-organismos. Os metabólitos produzidos pelo endófito *Guignardia* sp. apresentaram atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadesis*. Metabólitos de *Pestalotiopsis guepinii* apresentaram atividade contra *S. cerevisiae*. Os metabólitos de *Phomopsis* sp. foram eficientes contra *Cladosporium elantum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

Zou et al. (2000) isolaram um fungo endofítico da planta medicinal *Artemisia mongolica* (Fisch ex Bess.), da família Asteraceae, vegetal nativo da China e que tem como característica a sua resistência contra fungos e bactérias que atacam plantas adjacentes com facilidade, fato que levou à caracterização de compostos bioativos de fungos endofíticos que colonizam este hospedeiro. O fungo obtido dessa planta identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. produziu uma substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico que mostrou forte atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas ao homem *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Sarcina lutea* e contra o fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum*.

Peláez et al. (1998) isolaram 152 espécies de fungos endofíticos de espécies de plantas medicinais provenientes de regiões de solo salino e calcáreo da Espanha. Foram

investigadas 187 linhagens de 136 espécies diferentes de fungos quanto à produção de antimicrobianos, frente a bactérias e leveduras de interesse clínico. Do total de 187, 45 (24%) das linhagens, pertencendo a 37 (27%) espécies diferentes, revelaram-se produtoras de compostos antimicrobianos, mais frequentemente antibacterianos (84,4%).

Dentre estas substâncias de origem endofítica, a Criptocandina A, um lipopeptídeo antimicótico isolado de *Cryptosporiopsis quercina* obtido em associação com a planta medicinal *Tripterigeum wilfordii* (Celastraceae), demonstrou excelente atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. A criptocandina também possui atividade contra fitopatógenos, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (Strobel et al., 1999).

Esse mesmo fungo, *Cryptosporiopsis quercina*, produz também um ácido chamado Criptocina, que usualmente apresenta atividade contra *Pyricularia oryzae*, um fungo fitopatogênico (Li et al., 2000).

Outras substâncias que merecem destaque são as citocalasinas que pertencem a um grupo de metabólitos fúngicos relacionados pela estrutura e atividade biológica, com capacidade antitumoral e atividade antibiótica. Estes metabólitos apresentam efeitos que incluem a inibição da divisão do citoplasma e dos movimentos celulares, indução do deslocamento nuclear, retração de coágulos e agregação de plaquetas, transporte de glucose e secreção da tireóide. Recentemente, três novas citocalasinas foram relatadas como provenientes do fungo endofítico *Rhinochadiella* sp. de *Tripterigium wilfordii* (Wagennar et al., 2000). Outra citocalasina importante é a Phomopsolida, um metabólito do fungo *Phomopsis* sp., que exibe atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*; e atividade antifúngica frente a *Candida tropicalis* (Horn et al., 1995).

Li e Strobel (2001) purificaram duas substâncias, a jesterona e a hidroxil-jesterona, produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis jesteri*, isolado da planta *Fragraea bodenii* (Gentianaceae), das quais a primeira apresentou considerável atividade antifúngica contra o patógeno *Phythium ultimum*. Outra espécie, *Pestalotiopsis microspora*, isolado da planta *Terminalia morobensis* (Combretaceae), foi alvo de estudo de Strobel et al. (2002), no qual isolaram e caracterizaram uma isopestacina (isobenzofuranona), que se mostrou ativa contra os fungos *Phythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotium* e *Rhizoctonia solani*. Outras substâncias, as

pestalotiopsins A e B, foram isoladas da mesma espécie de fungo (*P. microspora*) de *Taxus brevifolia* (Pulici et al., 1996).

Stinson et al. (2003) isolaram da planta *Eucryphia cordifolia*, na Patagônia, o fungo *Gliocladium* sp., que apresentou bioatividade contra os fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Verticillium dahliae*. Da mesma forma, o endofítico *Muscudor albus*, isolado da planta *Cinnamomum zeylanicum* (canela), foi descrito como produtor de antimicrobianos que inibem o crescimento de bactérias e outros fungos (Ezra; Strobel, 2003).

Na Tailândia, Wiyakrutta et al. (2004), isolaram fungos endofíticos de plantas medicinais capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, anticancerígena e antimalárica.

Espécies de *Phomopsis* isoladas da planta medicinal *Erythrina crista-galli* são capazes de produzir o antibiótico chamado “phomol” o qual apresenta atividade antifúngica, antibacteriana e baixa atividade citotóxica (Weber et al. 2004).

No estudo realizado por Silva et al. (2005) foram obtidos dois novos metabólitos, o 2,4-diidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila e a Phomopsilactona, a partir do extrato de *Phomopsis cassiae* isolado de folhas de *Cassia spectabilis*, planta medicinal tradicionalmente utilizada no Brasil para tratamento de gripes e resfriados. Nos testes, esses metabólitos mostraram-se fortemente ativos contra os fitopatógenos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*.

Phongpaichit et al. (2006) isolaram fungos endofíticos da planta medicinal *Garcinia* e verificaram que metabólitos produzidos pelos fungos *Phomopsis* e *Botryospheria*, extraídos com acetato de etila, inibiram o crescimento microbiano.

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 desses fungos endofíticos na síntese de metabólitos bioativos (Schmeda-Hirschmann et al., 2005; Phongpaichit et al., 2006; Kumala et al., 2006).

Já dentre os fungos endofíticos isolados de *Quercus variabilis*, planta medicinal nativa da China usada contra afecções da garganta, 53,7% se mostraram inibidores do crescimento de pelo menos um micro-organismo teste, tanto fungos patogênicos ao homem (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*), como também bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*). O fungo que se mostrou mais ativo foi

Cladosporium sp. que produz uma substância química identificada como Brefeldin A ativo contra *Aspergillus Niger*, *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum* (Wang et al., 2006).

Dois novos benzopiranos tem sido isolados de *Curvularia* sp., um endofítico de *Ocotea corymbosa*, que apresenta atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (Teles et al., 2006).

Fungos endofíticos isolados da tradicional planta medicinal chinesa *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) apresentam compostos com atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Candida albicans*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger* (Huang et al., 2008).

De acordo com Rocha et al. (2009), fungos endofíticos isolados de folhas de confrei (*Symphytum officinale* L.) indicaram potencial contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotium*.

Oliveira et al., (2011), no estudo com metabólitos produzidos pelo fungo *Pestalotiopsis guepinii* isolado da planta medicinal *Viola michelii* registraram uma nova substância, a qual denominaram “guepinona” com ação antibiótica.

Fungos endofíticos isolados de *Lippia sidoides* demonstraram potencial farmacêutico, por apresentar atividade biológica inibindo o crescimento de bactérias e fungos (Siqueira et al., 2011).

Kharwar et al. (2011) isolaram fungos endofíticos da planta medicinal *Adenocalymma alliaceum*. Os extratos dos fungos *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Penicillium* sp. e *Chaetomium globosum* exibiram atividade antibacteriana contra a maioria dos patógenos testados.

Os extratos de fungos endofíticos isolados de folhas, caules, raízes e flores de *Orthosiphon stamineus* também apresentaram atividade antimicrobiana, segundo Tong et al. (2011).

A atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados com a planta medicinal brasileira *Solanum cernuum* foi estudada e 28,12% dos extratos apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica (Vieira et al., 2012).

Os fungos *Nigrospora oryzae*, *Colletotrichum dematium* e *Chaetomium globosum* exibiram atividade contra *Shigella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp. (Gond et al., 2012).

Garcia et al. (2012) registraram que os extratos brutos de fungos endofíticos de *Sapindus saponaria* (sabão-de-soldado) apresentam atividade frente a bactérias

patogênicas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*.

Espécies de *Phoma* isoladas da planta medicinal chinesa *Arisaema erubescens* produziram compostos que demonstraram atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Magnaporthe oryzae*, *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas oryzae*) (Li et al., 2012).

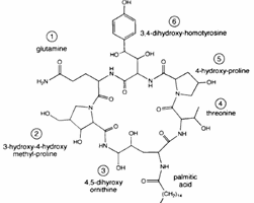
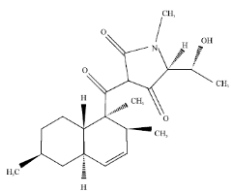
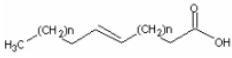
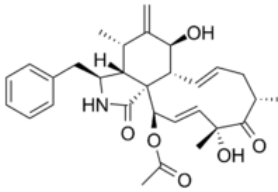
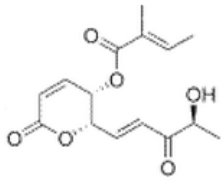
Nas plantas medicinais *Trichilia elegans*, *Erythrina crista-galli*, *Camellia sinesis*, *Calotropis procera*, *Sesbania grandiflora*, *Embllica officialis* e *Piper hispidum* foram encontrados fungos endofíticos, cujos extratos brutos atuaram como agentes antimicrobianos, inibindo o crescimento de micro-organismos patogênicos (Nath et al., 2012; Rhoden et al., 2012; Devi; Orlandelli et al., 2012; Wahab, 2012; El-Khawaga et al., 2013; Redko et al., 2013).

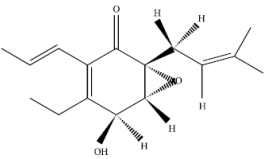
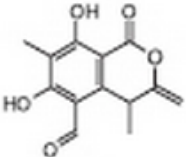
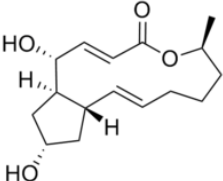
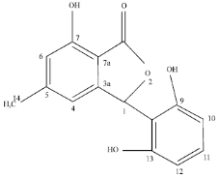
De acordo com Prabavathy e Valli Nachiyar (2013), o extrato acetotílico do fungo endofítico *Syncephalastrum* sp. isolado da planta medicinal *Adathoda beddomei* apresentou atividade frente a micro-organismos patogênicos e exibiu atividade antidiabética pela inibição da atividade da α -amilase.

A substância Piperina produzida pela planta medicinal *Piper nigrum* também foi encontrada sendo produzida pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolado desse hospedeiro. Esse composto apresenta propriedade bioativo, incluindo antibacteriana e antifúngico (Chithra et al., 2013).

A grande vantagem na identificação de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais, que apresentam ação como biossintetizantes de compostos bioativos é a sua facilidade de produção em larga escala utilizando métodos de cultivo com baixo custo (Chithra et al., 2013).

Tabela 1. Metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos de plantas medicinais.

Fungo Endofítico	Substância e Estrutura	Atividade Biológica	Referência
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	Criptocandina 	Antifúngico	Strobel et al., (1999)
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	Criptocina 	Antifúngico	Li et al. (2000)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ácido coletótrico 	Antibacteriano	Strobel et al. (1997)
<i>Rhinocladiella sp.</i>	Citocalasina 	Antifúngico e Antibacteriano	Wagenaar et al. (2000)
<i>Phomopsis sp.</i>	Phomopsolida 	Antifúngico e Antibacteriano	Horn et a., 1995

<i>Pestalotiopsis jesteri</i>	Jesterona 	Antifúngico	Li & Strobel (2001)
<i>Phomopsis cassiae</i>	Phomopsilactona 	Antifúngico	Silva et al. (2005)
<i>Cladosporium sp.</i>	Brefeldin A 	Antifúngico	Wang et al. (2006)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Isopestacina 	Antifúngico e Antibacteriano	Pulici et al. 1996

3.4. Uso de Resíduos Agroindustriais em Processos Fermentativos para Produção de Metabólitos Secundários por Fungos

A economia brasileira é uma das mais importantes economias baseadas em agricultura no mundo, produzindo café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros produtos. Entretanto, essa grande produção é responsável pela geração de grande quantidade de resíduos diariamente, a partir de diversas atividades econômicas como práticas agrícolas e industriais. O acúmulo dessa biomassa resulta não apenas na deterioração do meio ambiente, como também na perda de materiais potencialmente valiosos. Essas razões, aliadas ao baixo custo destas matérias-primas, tem causado o aumento do interesse na utilização destes resíduos como substratos em processos biotecnológicos. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para cultivo

pode representar um valor adicional para a indústria (Soccol; Vandenberghe, 2003; Souza et al., 2004; Daroit et al., 2007).

Em processos fermentativos, diversos resíduos podem ser utilizados: bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, polpa de maçã, casca de soja, casca de café, palha de trigo, dentre outras (Zadrazil; Punia, 1995). Essas matérias-primas fornecem um excelente substrato para o crescimento de micro-organismos, suprimindo os nutrientes essenciais para os mesmos. Diversos processos tem sido desenvolvidos com a utilização dessas matérias-primas complexas como a produção de etanol, enzimas, aminoácidos e metabólitos secundários bioativos (Singhania et al., 2008). Na Tabela 2, é possível visualizar a utilização de resíduos para a produção de metabólitos secundários ativos por processos fermentativos.

Na obtenção de produtos de fermentação são utilizados, basicamente, dois tipos de processos, conforme a quantidade de água no meio: a fermentação submersa (SmF) e a fermentação em estado sólido (SSF). Na fermentação submersa (SmF), o processo fermentativo ocorre com excesso de água, sendo o sistema mais empregado industrialmente para a obtenção de uma variedade de importantes metabólitos produzidos por fungos filamentosos (Gibbs et al., 2000). São normalmente utilizadas em processos industriais por causa de sua facilidade de manuseio e de controle de parâmetros de bioprocessos (Nigam, 2009).

Já a fermentação em estado sólido (SSF) ou fermentação semi-sólida, que foi utilizada no presente estudo, é designada como um processo fermentativo que utiliza materiais não-solúveis que atuam tanto como suporte físico quanto fonte de nutrientes na ausência ou quase ausência de água livre. O baixo conteúdo de umidade limita o número de micro-organismos capazes de realizar essa fermentação, sendo, principalmente leveduras e fungos filamentosos (Couto; Sanromán et al., 2006).

Tabela 2. Produção de metabólitos secundários utilizando resíduos agroindustriais.

Resíduo agroindustrial	Fungos Filamentosos	Metabólito secundário	Tipo de fermentação	Referência
Bagaço de oliva	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Ácido Giberélico	SmF	HERNÁNDEZ & MENDOZA, 1976
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Claviceps purpurea</i>	Alcalóides do Ergot	SSF	HERNANDEZ <i>et al.</i> , 1993
Bagaço de mandioca e farinha de soja	<i>Rhizopus oryzae</i>	Aromas	SSF	BRAMORSKI <i>et al.</i> , 1998
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	SSF	BARRIOS-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1988
Farelo de trigo	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ácido Micofenólico	SSF	SADHUKHAN <i>et al.</i> , 1999
Farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>	Nigerloxina	SSF	SEKHAR RAO <i>et al.</i> , 2005
Farelo de trigo	<i>Aspergillus flavipes</i>	Lovastatina	SSF	VALERA <i>et al.</i> , 2005
Resíduo de uva	<i>Monascus purpureus</i>	Pigmentos	SmF	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2008
Farelo de trigo hidrolisado e torta de óleo de coco	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporina A	SSF	SURVASE <i>et al.</i> , 2009
Milhocina, farelo de soja e farinha de semente de algodão	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Cefalosporina C	SmF	LEE <i>et al.</i> , 2010

A tecnologia das fermentações se favoreceu em muito dos avanços no aproveitamento de resíduos (Dasilva; Sasson, 1995).

A fermentação semi-sólida (fermentação sólida ou em estado sólido) tem se destacado nos estudos e avanços obtidos no aproveitamento destes resíduos. Segundo os autores Bramorski (1997) e Lu, Maddox e Brooks (1998) algumas vantagens da fermentação semi-sólida sobre a fermentação submersa são as seguintes: o meio é geralmente simples, consistindo de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo. Isto significa que o pré-tratamento pode ser simplesmente, um cozimento com água para umidificar ou dilatar o substrato, ou a quebra do substrato na superfície para aumentar a acessibilidade aos nutrientes internos ou a moagem de grandes blocos de substrato para partículas menores; geralmente todo o produto é utilizado; o custo de esterilização é reduzido, pois se aquece menos água; o espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, considerando-se o rendimento do produto; Utiliza-se menor quantidade de água e o substrato é concentrado; como a maioria das bactérias requer altos níveis de mistura líquida, esse tipo de fermentação exclui, ou reduz, sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana; o meio é facilmente aerado, desde que haja espaço entre as partículas do substrato; a solubilidade e difusão de oxigênio e outros gases, são maiores; geralmente, o único componente necessário a ser adicionado ao meio é água; torna-se possível a obtenção de esporos que são impossíveis

de se obter em cultura submersa; menor custo dos equipamentos; exige menor demanda de energia.

Pesquisas voltadas para os resíduos agroindustriais de todo o mundo vem sendo feitas a fim de selecionar substratos adequados. Os materiais agrícolas, que por suas características naturais são suscetíveis de emprego como substrato para a fermentação semi-sólida são dois: celulósicos (polpa de café, bagaços, palhas, cascas, cascas de frutas processadas, etc) e amiláceos (batata, milho, mandioca, banana e seus resíduos, entre outros) (Facchini et al., 2011).

4. Referências

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley, 1996.

ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 1757-1764, 2009.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **J. Invertebr Pathol**, v. 96, p. 34-42, 2007.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.

ARAÚJO, W.L.; SARIDAKIS, H.O.; BARROSO, P.A.V.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v.107, p. 25-37, 2000.

AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos**. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic J. Biotechnol.**, v.3, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects**. In: Fungi: multifaceted microbes (B.N. Ganguli & S.K. Deshmukh, Edts.) Anamaya Publishers, New Delhi, 2007.

BACON, C.C.W.; WHITE, J.F. **Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae**. In: Bacon, C. J.; White, J. F. (Ed.). Microbial endophytes. New York: Macel Dekker, 2000.

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

BAYMAN, P.; LEBRO, L.L.; TREMBLAY, R.L.; LODGE, D.J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytology** 135: 143-149, 1997.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot**, v. 58, p. 1-26, 2005.

BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabolites voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substrates agroindustriais**. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Paraná, 1997.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCIA, A.; RUBIN-FILHO, C.J.; PRIOLI, A.J.; PAMPILE, J.A.; Evaluation of foliar fungal endophytes diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biol. Res.**, v. 43, p. 375-384, 2010.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; McKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 943-948, 2001.

CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; PAGNOCCA, F.C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J.L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 397-402, 2005.

CARDOSO, J.E.; BEZERRA, M.A.; VIANA, F.M.P.; SOUSA, T. R. M.; CYSNE, A.Q.; FARIAS, F.C. Endophyte occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* in cashew tissues and its transmission by vegetative propagules. **Summa Phytopathologica**, v. 4, p. 262-266, 2009.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1986.

CHEN, G.; LIN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L.L.P.; JONES, E.B.G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. **Tetrahedron**, v. 59, p. 4907-4909, 2003.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E.K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 5, p. 7-10, 2013.

CLAY, K. Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. **Natural Toxins**, v. 1, p. 147-149, 1992.

COSTA-NETO, P.Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunheira (*Bactris gassipae*) e caracterização por marcadores moleculares**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas, São Carlos, Brasil, 86p., 2002.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 291-302, 2006.

CRUZ, A.A. **Diversidade, patogenicidade e caracterização morfológica de *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico e patógeno**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 58p., 2004.

DASILVA, E.; SASSON, A. Biotechnologies: an agenda for development. **Biotechn. Develop. Review**, v. 4, p. 37-47, 1995.

DAROIT, D.J.; SILVEIRA, S.T.; HERTZ, P.F.; BRANDELLI, A. Production of extracellular β -glucosidase by *Monoascus purpureus* on different growth substrates, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 877-880, 2003.

DEVI, N.N.; WAHAB, F. Antimicrobial properties of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Camellia sinensis*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, p. 420-427, 2012.

DRUMMOND, A.A.; MEDEIROS-GALVÃO, R.S.; COSTA-NETO, P.Q.; PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos isolados de cumaru (*Dipterix odorata*)**. Anais da IX jornada de iniciação científica, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 27p., 2000.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5285-5293, 2001.

EL-KHAWAGA, M.A.; EL-AZIZ, M.M.A.; HEGAZI, G.A.E.M. Identification and bioactive potencial of endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Life Science Journal**, v. 10, p. 2804-2814, 2013.

ERNEST, M.; MENDGEN, K.W.; WIRSEL, S.G.R. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microcosms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 580-587, 2003.

FAETH, S.H.; HAMMON, K.E. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and association with leafminers. **Ecology**, v. 78, p. 810-819, 1997.

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

FAETH, S.H.; SULLIVAN, T.J. Mutualistic asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. **The American Naturalist**, v.161, p. 2-12, 2003.

FISHER, P.J. Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. **New Phytology**, v. 132: p. 119-122, 1996.

FRANKE-WHITTLE, I.H.; O'SHEA, M.G.; LEONARD, G.J.; WEBB, R.; SLY, L.I. Investigation into the ability of *Gluconacetobacter sacchari* to live as an endophyte in sugarcane. **Plant and Soil**, v. 271, p. 285- 295, 2005.

FRANKEN, P.; BUTEHORN, B.; VARMA, A. ***Piriformospora indica*, a cultivable root cell-infecting fungus promotes the growth of a broad range of plant species.** In: International Conference on Mycorrhiza. 2, Swenden, 1998.

FREITAS, A.G.; COSTA, V.; FARIAS, E.T.; LIMA, M.C.A.; SOUSA, M.C.A.; XIMENES, E.A. Atividade estafilocócica do *Plantago major* L. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 12, p. 64-65, 2002.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.D.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, v. 104, p. 1202-1212, 2000.

GALVEZ, M.; MARTÍN-CORDERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M.; CORTÊS, F.; AYUSO, M.J. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. On cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 125-130, 2003.

GAMBOA, M.A.; BAYAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, v. 33, p. 352-360, 2001.

GAMBOA, M.A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, p. 41-45, 2002.

GARCIA, A.; RHODEN, S.A.; RUBIN-FILHO, C.J.; NAKAMURA, C.V.; PAMPHILE, J.A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 35-40, 2012.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, p. 17-48, 2000.

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

GOND, S.K; MISHRA, A.; SHARMA, V.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, J.; KHARWAR, R.N.; KUMAR, A. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of Índia. **Mycoscience**, v. 53, p. 113-121, 2012.

GONTHIER, P.; GENNARO, M.; NICOLOTTI, G. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. **Fungal Diversity**, v. 21, p. 69-80, 2006.

GUIMARÃES, V.C. **Isolamento de Fungos Endofíticos de Hospedeiro *Paulinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mar) Duche e Análise da Variabilidade Genética Detectada por Marcadores RAPD no Endofítico *Glomerella cingulata***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 115p., 1998.

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

HANJIEVA, N.; SPASSOU, E.A.T.; BODUROVA, G.; SAADI, H.; POPOFF, S.; Marajosíffio, an iridoid glucoside from *Plantago major*. Great Britain, **Phytochemistry**, v.30, p. 1317-1318, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 96, p. 3-20, 1998.

HAWKSWORTH, D.L. How many fungi are there? **Mycological Research**, v. 104, p. 4-5, 2000.

HOLETZ, F.B.; et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Tumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-167, 2001.

HUANG W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Divers**, v. 33, p. 61-75, 2008.

HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163- 173, 2008.

JAY, J.M. Micotoxinas. In: **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Artmed, Porto Alegre, 2005.

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

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

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KUMALA, S.; UTJI, R.; SUDARMONO, P.; KARDONO, L.B.S. Isolation of endophytic fungi from *Brucea javanica* (L.) Merr and cytotoxic evaluation of their n-butanol. Extract from Fermentation Broth. Pak. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, p. 825-832, 2006.

KHARWAR, R.N.; VERMA, S.K.; MISHRA, A.; GOND, S.K.; SHARMA, V.K.; AFREEN, T.; KUMAR, A. Assessment of diversity, distribution and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from a medicinal plant *Adenocalymma alliaceum* Miers. **Symbiosis**, v. 55, p. 39-46, 2011.

KUMAR, D.S.S.; HYDE, K.D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, v. 17, p. 69-90, 2004.

LEGAULT, D.; DESSUREAULT, M.; LAFLAMME, G. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* L. Champignons endophytes. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2053-2060, 1989.

LEWIS, L.C.; BRUCK, D.J.; GUNNARSON, R.D.; BIDNE, K.G. Assessment of plant pathogenicity of endophytic *Beauveria bassiana* in Bt transgenic and non-transgenic and non-transgenic corn. **Crop Science**, v. 41, p. 1395-1400, 2001.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 262-265, 2001.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A.; HARPER, J.K.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, v. 2, p. 767-770, 2000.

LI, W.C.; ZHOU, J.; GUO, S.Y.; GUO, L.D. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 69-80, 2007.

LIU, C.I.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

LODGE, D.J.; FISHER, P.J.; SUTTON, B.C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 88, p. 733-738, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais o Brasil: Nativas e exóticas**. 2ª edição. Nova Odessa – SP: Editora Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 512 p., 2008.

LU, M.Y.; MADDOX, I.S.; BROOKS, J.D. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid state fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 117-123, 1998.

LUGINBUHL, M.; MÜLLER, E. Endophytische Pilze den oberirdischen organen von 4 gemeinsam an gleichen Standorten achsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hedera*, *Ilex*, *Ruscus*). **Sydowia**, v. 33, p. 185-209, 1980.

MAGALHÃES, A.A.S. **Isolamento e variedade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* Spruce (Wood) Apocynaceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 130p., 2000.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDI, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.S.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation process. **Biochemistry**, v. 39, p. 2031-2034, 2004.

MARIANO, R.L.R.; LIRA, R.V.I.; SILVEIRA, E.B.; MENEZES, M. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. Frequência a população fúngica e efeito da hospedeira. **Agrotópica**, v. 9, p. 127-134, 1997.

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**, v. 16, p. 280-283, 2005.

MARTINS, E.R.; DE CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa. Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 220 p., 2000.

MEDEIROS-GALVÃO, R.S. **Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas, Manaus, Brasil, 151p., 1998.

MEMENTO TERAPÊUTICO. **Programa Estadual de Plantas medicinais**. 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2002.

NALINI, M.S.; MAHESH, B.; TEJESVI, M.V.; PRAKASH, S.H.; SUBBAIAH, V.; KINI, K.R.; SHETTY, H. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) D.C. (Caparidaceae). **Mycopathologia**, v. 159, p. 245-249, 2005.

NATH, A.; RAGHUNATHA, P.; JOSHI, S.R. Diversity and Biological activities of endophytic fungi of *Emblica officinalis*, an ethnomedicinal plant of India. **Mycobiology**, v. 40, p. 8-13, 2012.

NAVARRO, D.F.; SANTOS, E.A.T.; ROCHA, J.C.F.; BREMM, L.L.; JKOSKI, M.; RIBEIRO, P.G.; KOZLOWSKI-JR, V.A. Efeito do digluconato de clorexina *Plantago major* e placebo sobre a placa dental e gengivite: Uma comparação clínica da eficácia de colutório. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.1, p. 24-27, 1998.

NIGAN, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAN, P.S.; PANDEY, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization**. Springer + Business Media, 2009.

OKI, Y.; FERNANDES, G.W.; CORREA JUNIOR, A. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**, v. 252, p. 64-66, 2007.

OLIVEIRA, M.N. Novel anthraquinone derivatives produced by *Pestalotiopsis guepinii*, an endophytic of the medicinal plant *Virola michelii* (Myristicaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 22, p. 993-996, 2011.

ORLANDELLI, R.C.; ALBERTO, R.N.; ALMEIDA, T.T.; AZEVEDO, J.L., PAMPHILE, J.A. In vitro antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 137-141, 2012.

OSONO, T. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. **Mycoscience**, v. 48, p. 47-52, 2007.

OTERO, J.T.; ACKERMAN, J.D.; BAYMAN, P. Diversity and host specificity of endophyte *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal Botany**, v. 89, p. 1852-1858, 2002.

OZALAN, M.; KARAGOZ, I.D.; KILIÇ, I.H.; CENGİZ, B.; KALENDER, M.E.; GULDUR, M.E.; KARAGOZ, A.; ZUMRUTDALI, M.E. Effect of *Plantago major* sap on Ehrlich ascites tumours in mice. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 955-959, 2009.

PANACCIONE, D.G.; JOHNSON, R.D.; WANG, J.; YOUNG, C.A.; Damronkool, P.; Scott, B.; Schardt, C.L. Elimination of ergovaline from grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the Natural Academy of Sciences**, v. 98, p. 12820-12825, 2001.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 32-37, 2002.

PEREIRA, I.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, J.O.; CARNEIRO-VIEIRA, M.L.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 37-40, 1999.

PETRINI, O.; CARROLL, G.C. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 629-636, 1981.

PETRINI, O. **Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues**. In: Fokkema, N.J.; Heuvel, J. van Den (Eds.) *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrewa, J.; Hirano, S. S. 1991. (Ed.). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer Verlag, 1991.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796, 1992.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 48, p. 367-372, 2006.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K.D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, p. 1508-1514, 2001.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE K.D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v. 16, p.131–40, 2004.

PICCOLO, S.L.; FERRARO, V.; ALFONZO, A.; SETTANNI, L.; ERCOLINI, D.; BURRUANO, S.; MOSCHETTI, G. Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. **Ann Microbiol**, v. 60, p. 161-167, 2010.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. Por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico.** Dissertação de Doutorado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

PONCE-MACOTELA, M.; NAVARRO-ALEGRIA, I.; MARTINEZ-GORDILLO, M.N.; ALVAREZ-CHACON, R. In vitro effect against *Giardia* of 14 plant extract. **Ver. Invest. Clin.**, v.46, p. 343-347, 1994

POWTHONG, P.; THONGMEE, A.; SUNTORNTHTICHAROEN, P. Antioxidant and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Sesbania grandiflora* (L.). **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, p. 102-107, 2013.

PRABAVATHY, D.; VALLI NACHIYAR, C.; Antimicrobial and antidiabetic activity of endophytic fungi isolated from *Adathoda beddomei*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 780-783, 2013.

RAMESHA, A.; SUNITHA, V.H.; SRINIVAS, C. Antimicrobial activity of secondary metabolites from endophytic fungi isolated from *Nerium oleander* L. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, p. 683-693, 2013.

RANV, H.; BRIMER, L.; Structure and antibacterial activity of Plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp. *major*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3433-3437, 1994.

REDKO, F.; CLAVIN, M.L.; GIBERTI, G.C.; ANKE, T.; MARTINO, V.S. Influence of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. In the production of secondary metabolites in *Erythrina crista-galli*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, p. 875-879, 2013.

REDMAN, R.S.; DUNIGAN, D.D.; RODRIGUEZ, R.J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, v. 151, p. 705–716, 2001.

RHODEN, S.A.; GARCIA, A.; BONGIORNO, V.A.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A. **Juss. J. App. Pharm Sci.**, v. 2, p. 57-59, 2012.

ROCHA, R.; LUZ, D.E.; ENGELS, C.; PILEGGI, S.A.V. JACCOUD FILHO, D.S.; MATIELLO, R.R.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotium* (Lib.). **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 73-78, 2009.

RODRIGUES, K.F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, p. 376-385, 1994.

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

RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. Fungal endophytes of *Spodias mombin* leaves in Brasil. **Journal Basic Microbiology**, v. 39, p. 131-135, 1999.

RONDON, A.C.F. **Atividade amilolítica de fungos endofíticos isolados de *Manihot esculenta***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 100p., 2003.

ROSA, L.H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; WEDGE, D.E.; PAN, Z.; BERNIER, U.R.; BECNEL, J.J.; AGRAMONTE, L.A.W.; MORAES, R.M. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 1105-1114, 2012.

RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D. R. dos; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 24-33, 2005.

RUNGJINDAMAI, N.; PINRUAN, U.; CHOYKLIN, R.; HATTORI, T.; JONES, E.B.G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 139-161, 2008.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 275–280, 2004.

SAMUELSEN, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L.; a review. **J. Ethnopharmacology**, v. 71, p. 1-21, 2000.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G.F.; ZABALGOGEAZCOA, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 87-100, 2008.

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

SANTOS, S.N. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* do bioma Caatinga**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, 182p., 2012.

SANTIAGO, I.F. **Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a angiospermas presentes na Antártica**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. 98p., 2011.

SCHARDL, C.L.; PHILLIPS, T.D. Protective grass endophytes: Where are they from and where are they going? **Plant Disease**, v. 81, p. 430-438, 1997.

SCHARDL, C.L.; GROSSMAN, R.B.; NAGABHYRU, P.; FAULKNER, J.R.; MALLIK, U.P. Loline alkaloids: currencies of mutualism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 980-996, 2007.

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

SCHULZ, B.; CHRISTINE, B.; DRAEGER, S.; ROMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycol Res**, v. 106, p. 996-1002, 2002.

SELOSSE, M.A.; BAUDOUIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 639-648, 2004.

SIEBER, T.N.; DORWRTH, C.E. An ecological study about assemblages of endophyte fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. **Canadian Journal Botany**, v. 1, p. 1-72, 2007.

SILVA, R.L.O.S.; LUZ, S.J.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta bot.bras.**, v. 20, p. 649-655, 2006.

SINGHANIA, R.R.; SOCCOL, C.R.; PANDLEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation processes. In: **Corrent Developments in Solid-State fermentation**. Springer Science+Business Media, 2008.

SIQUEIRA, V.M.; CONTI, R.; ARAÚJO, M.A.; SOUZA-MOTTA, C.M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, p.89–95, 2011.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGUE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brasil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

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, p. 185-195, 2004.

STONE, J.K. Initiation and development of latent infection by *Rhabdochne parkeri* on Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 2614-2621, 1986.

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

STROBEL, G.A.; FORD, E.; LI, J.Y.; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. *Seimatoantherium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 426-433, 1999.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-534, 2003.

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

STROBEL, G.A. Microbial gifts from rain forests. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 14-20, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILHO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

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

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

TAO, G.; LIU, Z.Y.; HYDE, K.D.; LUI, X.Z.; YU, Z.N. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). **Fungal Diversity**, v. 33, p. 101-122, 2008.

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

TEJESVI, V.M.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S.; VEN SUBBIAH; SHETTY, H.S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Divers.**, v. 24, p. 37- 54, 2007.

TELES, H.I.; SORDI, R.; SILVA, G.H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; PFENNING, L.H.; ABREU, L.M.; COSTA-NETO, C.M.; YOUNG, M.C.M.; ARAÚJO, A.R. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopia aromatic*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2686-2690, 2006.

TRAGA, S.E.M.; ORLANDELLI, R.C.; BERNARDI-WENZEL, J.; CONTE, H.; PAMPHILE, J.A. Influence of crude extracts of endophytes from *Luchea divaricate* (Malvales; Tiliaceae) on the in vitro development of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae) larvae. **Sabios: Rev. Saúde e Biol.**, v. 6, p. 1-7, 2011.

TONG, W.Y.; DARAH, I.; LATIFFAH, Z. Antimicrobial activities of endophytic fungal isolates from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* Benth. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 831-836, 2011.

VERMA, V.C.; KHARWAR, R.N.; STROBEL, G.A.; Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Nat Prod Comm**, v. 4, p. 1511-1532, 2009.

VIEIRA, P.D.S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; LIMA, D.; TORRES, J.B.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, N.T. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. **Mycology**, v. 2, p. 91-97, 2011.

VIEIRA, M.L.; HUGLES, A.F.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.; ALVES, T.M.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). **Can. J. Microbiol.**, v. 58, p. 54-66, 2012.

VON HALMSCHLAGER, E.; BUTIN, H.; DONAUBAUER, E. Endophytische Pilze in Blättern und Zweigen von *Quercus petraea*. **European Journal of forest Pathology**, v. 23, p. 51-63, 1993.

WANG, B.; PRIEST, M.J.; DAVIDSON, A.; BRUBAKER, C.L.; WOODS, M.J.; BURDON, J.J. **Mycological Research**, v. 111, p. 347-354, 2006.

WEBER, R.W.S.; KAPPE, R.; PAULUTAT, T.; MOSKER, E.; ANKE, H. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 886-982, 2007.

WHITE, J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. II. Taxonomic observations on the endophyte of *Festuca arundinacea*. **Mycologia**, v. 77, p. 483-486, 1985.

WHITE, J.F. Endophyte-host associations in grasses. XIX. A systematic study of some sympatric species of *Epichloë* in England. **Mycologia**, v. 85, p. 444-455, 1993.

XUE, H.; LU, C.; LIANG, L.; SCHEN, Y. Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an endophytic fungus of *Cephalot axusmanni*. *Rec Nat Prod.*, v. 6, p. 28-34, 2012.

ZADRAZIL, F.; PUNIA, A.K. Studies on the effect of particle size on solid state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 85-87, 1995.

ZANON, S.M.; et al. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. **Rev. Latinoam. Microbiol.** v. 41, p. 59-62, 1999.

ZHOU, Y.Q.; TAN, X.M.; CHEN, X.M.; GUO, S.X. Isolation of endophytic fungi from medicinal plant *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg and its antimicrobial activity. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 46, p. 649-651, 2011.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.

YANDRY, R.R.J.; FERNANDEZ, E.D.; RODOLFI, M.; SOLVEIG, T. Actividad antagonica de hongos endofitos de plantas medicinales Del ecuador sobre bacterias patogenas. **Boletín Micológico**, v. 21, p. 49-53, 2006.

YONEZAWA, M.; USUKI, F.; NARISAWA, K.; TAKAHASHI, J.; HASHIBA, T. Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* and **Chinese cabbage**. **Mycoscience**, v. 45: 367-371, 2004.

CAPÍTULO 1

Fungos Endofíticos da Planta Medicinal *Plantago major* L. (língua de vaca)

Artigo a ser submetido a Revista Sydowia

Fungos Endofíticos da Planta Medicinal *Plantago major* L. (língua de vaca)

Paula Danielle de Souza Vieira^{1,2}, Débora Lima², Cristina Maria de Souza Motta², Norma Buarque de Gusmão^{1,2} e Ivan da Rocha Pitta¹.

¹ Departamento de Antibióticos. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

² Departamento de Micologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

Os fungos endofíticos encontram-se associados a tecidos ou órgãos dos vegetais, estabelecendo uma relação harmônica com seus hospedeiros. Os objetivos deste estudo foram isolar e determinar a frequência de colonização de fungos endofíticos associados a folhas, pecíolos, raízes e sementes da planta medicinal *Plantago major*, bem como realizar um levantamento de sua distribuição nos diferentes tecidos do vegetal. A partir de 432 fragmentos analisados, coletados nos períodos de estiagem e chuvoso em hortas de plantas medicinais, foram isolados 838 fungos, pertencentes a 15 gêneros. A frequência dos fungos foi maior em folhas e pecíolos coletados durante o período chuvoso, na horta de plantas medicinais localizada no Instituto Agrônomo de Pernambuco em Recife. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Phoma eupyrena*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium* e *Pestalotiopsis maculans*.

Palavras-chave: fungos endofíticos, diversidade, *Plantago major*.

Correspondence: Paula Danielle de Souza Vieira, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Nelson Chaves S/N, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: pdani_vieira@hotmail.com

Nas últimas décadas, várias pesquisas apontam as plantas como reservatórios para inúmeros micro-organismos conhecidos como endofíticos. Por definição, estes micro-organismos, dentre os quais estão os fungos, vivem uma parte ou todo o seu ciclo de vida, intra e/ou intercelularmente nos tecidos das plantas, de forma assintomática, sem causar nenhum efeito evidente imediato, alguns são de fácil cultivo em laboratório e outros não são cultiváveis por serem simbióticos obrigatórios (Tan & Zou 2001, Azevedo & Araújo 2007, Hyde & Soyong 2008).

Os endofíticos podem ser transmitidos de um vegetal para outro por meio das sementes, durante a reprodução, ou horizontalmente, onde os esporos são transmitidos pelo ar, água ou insetos (Carroll 1988). Esses micro-organismos podem penetrar no vegetal por meio de aberturas naturais ou por fissuras decorrentes da ação de insetos (Kobayachi & Palumbo 2000).

Uma vez dentro de sua planta hospedeira, geralmente os fungos endofíticos assumem um estágio de latência (repouso), comportando-se assim ou por toda a vida útil do tecido vegetal infectado ou por um período prolongado de tempo. Em determinadas situações podem se tornar patogênicos em algum momento de oportunismo, como a fragilidade dos mecanismos de defesa da planta (Strobel *et al.* 2004, Sieber 2007, Aly *et al.* 2010).

Na íntima relação simbiótica existente entre endofíticos e plantas, os fungos são capazes de produzir substâncias provenientes do seu metabolismo secundário, que contribuem com as defesas químicas do seu hospedeiro contra estresses bióticos (como o ataque de insetos e outros animais herbívoros) e abióticos (como baixa umidade e/ou elevadas temperaturas), enquanto que o micro-organismo se beneficia com o ganho nutricional e a proteção contra estresse abiótico, o que é proporcionado pelo vegetal (Akello *et al.* 2007, Giordano *et al.* 2009).

Nesse contexto, diversas pesquisas tem sido desenvolvidas no Brasil com o intuito de investigar a diversidade de fungos endofíticos associados a plantas medicinais, tais como: *Piper aduncum* (matico), *Smallanthus sanchifolius* (yacon), *Virola michelii* (virola), *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), *Echinacea purpurea* (flor-do-cone), *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Schinus terebenthifolius* (aroeira) e *Sapindus saponaria* (sabão-de-soldado) (Pimentel 2006, Silva *et al.* 2010, Oliveira 2011, Siqueira *et al.* 2011, Garcia *et al.* 2012, Rosa *et al.* 2012a, Rosa *et al.* 2012b), o que tem propiciado a descoberta de novas espécies e

orientado a busca por micro-organismos com potencial para a produção de metabólitos secundários bioativos com aplicação na indústria, na agricultura e na farmacologia (Strobel & Daisy, 2003).

Desse modo, os objetivos deste estudo foram isolar e determinar a frequência de colonização de fungos endofíticos associados a folhas, pecíolos, raízes e sementes da planta medicinal *Plantago major*, bem como realizar um levantamento de sua distribuição nos diferentes tecidos do vegetal.

Material e Métodos

Material Vegetal e Local de Coleta

As coletas foram realizadas durante o período de estiagem (outubro/2010) e o período chuvoso (maio/2011) nos seguintes locais (Fig. 1):

- Horta Didática de Plantas Medicinais do Laboratório de Fitoterápicos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no Instituto Pernambuco Participações e Investimentos S/A (PERPART), Recife, Pernambuco (10 m de altitude; 8°3'33"S e 34°57'7"O);
- Centro de Saúde Alternativa da Muribeca (CESAM), em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco (76 m de altitude; 8°9'49"S e 34°55'22"O);
- Horta Comunitária, no município de Petrolina, Pernambuco (366 m de altitude; 09°23'55"S e 40°30'03").

Os dados de temperatura máxima e mínima, e precipitação pluviométrica, que constam na Tabela 1, referentes aos municípios de Recife, Jaboatão dos Guararapes e Petrolina nos períodos de coletas (período chuvoso e período de estiagem) foram obtidos no Banco de Dados do Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – EMBRAPA.

Em cada local de coleta foram escolhidos aleatoriamente 13 indivíduos adultos de *Plantago major* L. (língua-de-vaca) dos quais foram coletadas folhas, pecíolos, raízes e sementes, sendo todas as amostras sadias, ou seja, sem danos ou sintomas aparentes de doenças.

Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e levadas ao Laboratório de Pesquisa da Micoteca URM (University Recife Mycologia) do Departamento de Micologia- UFPE, onde foram processadas. As excisas de espécimes das plantas utilizadas no experimento foram depositadas no Herbário

Professor Geraldo Mariz – UFP, Departamento de Botânica, UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil, sob os números de registro 63.369/UFPE, 63.370/UFPE e 65.504/UFPE referentes ao material coletado no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no Centro de Saúde Alternativa da Muribeca (CESAM) e na Horta Comunitária de Petrolina, respectivamente.

Isolamento dos Fungos Endofíticos

Para o isolamento dos fungos endofíticos, amostras de folhas, pecíolos, raízes e sementes foram submetidas ao processo de desinfestação conduzido de acordo com Araújo *et al.* (2005). Para tanto foram inicialmente lavadas em água corrente e submetidas a uma sequência de lavagens: solução de álcool etílico a 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2,5% por 4 minutos, novamente em álcool etílico a 70% por 30 segundos e três vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto.

Após a desinfestação, as amostras foram fragmentadas (5 x 5 mm diâmetro) e transferidas, em condições assépticas, para placas de Petri. De 432 fragmentos analisados (108 de folha, 108 de pecíolo, 108 de raiz e 108 de semente) contendo o meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 mg L⁻¹) e incubadas à temperatura ambiente (30° ± 1 °C), por trinta dias. A eficácia do processo de desinfestação superficial foi avaliada através do plaqueamento de alíquotas da última água utilizada durante a sequência de lavagens, em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) com cloranfenicol, à temperatura ambiente (30 ± 1 °C).

O crescimento das colônias fúngicas foi acompanhado diariamente. À medida que surgiram, foram transferidas para tubos de ensaio contendo BDA com cloranfenicol, à temperatura ambiente, purificadas e depois armazenadas a 4 °C para posterior identificação.

Identificação dos Fungos Endofíticos

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada a partir do microcultivo usando os meios de cultura BDA e observando-se os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas, tendo como base literatura específica (Booth 1971; Button 1980; Barnett & Hunter 1987; Lacaz *et al.* 2002; Halin 2000; Klich 2002; dentre outros).

Os fungos que não esporulavam eram semeados em meio ágar extrato de malte e V8; e expostos à luz U.V. por 30 s para induzir a esporulação.

Isolados representativos dos fungos obtidos foram depositados na Coleção de Culturas URM (University Recife Mycologia), Brasil.

Análise Estatística

A frequência de colonização (FC%) dos fungos foi calculada pela relação entre o número de isolados obtidos (Ni) e o número total de fragmentos inoculados (Nf), sendo o valor dado em porcentagem: $FC\% = Ni/Nf \times 100$ (Araújo *et al.* 2002).

Os dados das frequências de colonização de fungos nas respectivas partes da planta, locais e períodos de coleta foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância, transformados quando necessário, e submetidos à ANOVA múltiplas em esquema fatorial 2 x 4 x 3, considerando dois períodos de coleta (estiagem e chuvoso), quatro partes da planta (pecíolo, raiz, semente e folha) e três locais de coleta. Essas análises foram realizadas empregando o programa PAST. As médias para os fatores significativos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Todas essas análises foram conduzidas empregando o programa ASSISTAT (2013).

A diversidade de espécies fúngicas nas diferentes partes da planta, período e locais de coleta foram calculadas pelo índice de Shannon-Wiener por meio do programa PAST.

Resultados e Discussão

De 432 fragmentos analisados (108 de folhas, 108 de pecíolos, 108 de raízes e 108 de sementes) foram isolados um total 838 fungos dos diferentes tecidos da planta, representando uma frequência de colonização total (FC) de 193,9%. No período de estiagem foram obtidos 379 isolados, com frequência de colonização de 87,7% e no período chuvoso, 459 isolados com FC= 106,2% (Tab. 2).

A análise estatística detectou que não houve diferença significativa entre a frequência de colonização de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Plantago major* entre os períodos de estiagem e chuvoso ($P = 0,43$). E os resultados quanto ao índice de diversidade de Shannon-Wiener foram bem próximos nos dois períodos: o de estiagem ($H' = 2,38$) e o chuvoso ($H' = 2,40$). No que se refere à incidência de fungos endofíticos, os resultados encontrados no presente estudo é esperado quando se trata de regiões tropicais, onde, geralmente, não é verificada variações na quantidade de fungos endofíticos entre as estações do ano, que não se apresentam bem definidas. O que ocorre

de forma diferente em regiões de clima temperado, com estações do ano bem definidas, onde a riqueza desses micro-organismos é maior no período de chuvas, como ocorre em carvalhos (árvores do gênero *Quercus*) (Oki *et al.* 2008).

Com relação às áreas de coleta: CESAM, IPA e Petrolina, a ANOVA também não detectou diferença entre as frequências de colonização registradas nesses locais ($P = 0.66$). E os valores do índice de diversidade dos fungos nesses locais de coleta foram bem próximos (CESAM: $H' = 2,02$; IPA: $H' = 1,98$; Petrolina: $H' = 1,98$).

Nas condições de estudo, foi verificada que a comunidade de fungos endofíticos associada a raízes, pecíolos, sementes e folhas é composta por um total de 15 gêneros: *Cladosporium* (*C. cladosporioides*), *Colletotrichum* (*C. dematium*, *C. gloeosporioides*), *Curvularia* (*C. lunata* var. *aeria*, *C. lunata* var. *lunata*), *Fusarium* (*F. lateritium*, *F. oxysporum*, *F. verticilioides*), *Gliocladium* (*G. virens*), *Glomerella* (*G. cingulata*), *Guignardia* (*G. bidwellii*), *Nigrospora* (*N. sphaerica*), *Pestalotiopsis* (*P. maculans*), *Phoma* (*P. eupyrena*, *P. sorghina*), *Phomopsis* (*P. archeri*), *Trichoderma* *piluliferum*, *Tritirachium* *orysae*, *Verticillium* *catenulatum* e *Xylaria* (Tab. 2, Fig. 2). Destes, a maioria é anamórfica, 08 pertencem ao grupo Hyphomycetes, 04 pertencem ao grupo Coelomycetes e 03 são Ascomycetes. Os outros fungos foram classificados como fungos não-esporulantes, porque não produziram estruturas reprodutivas e por essa razão não puderam ser identificados com base em suas características morfológicas.

As espécies mais frequentemente isoladas foram *Phoma eupyrena* (FC=28,7%), *Colletotrichum gloeosporioides* (FC=21,3%), *Fusarium oxysporum* (FC=14,8%) e *Pestalotiopsis maculans* (FC=12,7%). As espécies *Fusarium lateritium* e *Phoma sorghina* foram registradas apenas durante o período chuvoso.

Os grupos de espécies identificadas se apresentam de forma diferenciada em cada tecido vegetal analisado. Por exemplo, *Xylaria* sp. ocorreu apenas em folhas. Em sementes não foram registradas as espécies *Phomopsis archeri*, *Colletotrichum dematium*, *Curvularia lunata* var. *aeria*, *Gliocladium virens*, *Guignardia bidwellii*, *Tritirachium orysae*, *Verticillium chlamydosporium* var. *catenulatum*, *Trichoderma piluliferum* e *Phoma sorghina*, que apareceram em todos os demais tecidos vegetais analisados. *Nigrospora sphaerica* e *Fusarium lateritium* apenas não ocorreram em raízes.

A frequência de colonização (FC) nas diferentes partes da planta (pecíolos, raízes, sementes e folhas), independente do local e período de coleta, diferiu significativamente ($P < 0.0004$) segundo a análise estatística.

Folhas e pecíolos foram os órgãos vegetais com maior colonização por fungos endofíticos. E em ambos os órgãos, a frequência de colonização foi maior durante o período chuvoso na horta de plantas medicinais do Setor de Fitoterápicos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife em comparação com as outras áreas de coleta (Fig. 3).

Ainda comparando as partes da planta, os índices de diversidade de Shannon-Wiener para a comunidade de fungos endofíticos também foram maiores em folhas ($H' = 2,84$) e pecíolos ($H' = 2,83$), coletados durante o período chuvoso e no IPA. As raízes ($H' = 2,30$) e sementes ($H' = 1,78$) apresentaram os menores índices, nesse mesmo período e local de coleta. Esses resultados foram maiores que registros anteriores de outras plantas medicinais como em folhas de *Nyctanthes arbor-tristis* ($H' = 2.73$); e folhas ($H' = 2.51$) e pecíolos ($H' = 2.01$) de *Adenocalymma alliaceum* (Gond *et al.* 2007, Kharwar *et al.* 2011).

Diversos estudos também demonstram que as folhas são os tecidos vegetais com maior incidência de fungos endofíticos, o que pode ser explicado pelo fato de que as folhas dos vegetais hospedeiros devem ser, provavelmente, a primeira porta de entrada para os micro-organismos, pois apresentam tecidos mais frágeis e expostos pela presença dos estômatos, ocorrendo, posteriormente, à migração para os outros tecidos da planta (Souza, 2004).

Em folhas e pecíolos, a espécie isolada com maior frequência foi *Phoma eupyrena* (FC= 60,1% e 37,0%, respectivamente), em raízes foi a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (FC= 18,5%) e em sementes, *Fusarium oxysporum* (FC= 25,9%).

A literatura indica que as comunidades endofíticas variam no vegetal, havendo diferença e especificidade da microbiota entre os diversos tecidos vegetais: raízes, caules, folhas, flores e frutos (Nalini *et al.* 2005, Gond *et al.* 2007), além de muitas vezes sofrerem influência do ambiente (Unterseher *et al.* 2007) e da idade do vegetal (Vieira *et al.* 2011). E o fato de cada fungo preferir determinado tecido vegetal é reflexo do conteúdo existente em cada tecido, uma vez que diferentes tecidos vegetais podem de fato constituir distintos micro-habitats. Além disso, o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico no qual muitos fatores como a espécie do hospedeiro, interação com outros endofíticos ou micro-organismos patogênicos, exposição, além do tipo e idade do tecido, afetam a composição de espécies e a frequência de colonização (Fisher *et al.* 1994, , Rodrigues 1994, Fisher *et al.*, 1996, Araújo *et al.* 2001, Araújo *et al.* 2002).

Os dados obtidos nesse estudo estão de acordo com resultados encontrados com fungos endofíticos de outros hospedeiros nos quais, geralmente, um amplo grupo de espécies pode ser isolado de um dado vegetal, mas apenas algumas espécies estão presentes em número significativo (Petrini *et al.* 1992).

Alguns gêneros *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Glomerella* e *Guignardia* são relatados na literatura como endofíticos com alta frequência de colonização ocorrendo em diferentes tecidos vegetais (Larran *et al.* 2001, Santamaria & Bayaman 2005, Chareprasert *et al.* 2006, Osono 2007, Verma *et al.* 2007, Lin *et al.* 2007).

Grande parte dos fungos encontrados neste trabalho tem sido registrados em outros estudos envolvendo isolamento de endofíticos de plantas medicinais, como é o caso de *Pestalotiopsis* encontrado também em associação com a planta medicinal *Viola michellii* (virola); *Curvularia* ocorrendo em *Ocotea corymbosa* (canela-do-cerrado); *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia bidwellii* e *Phomopsis archeri* obtidos de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta); e *Phoma* ocorrendo em *Luchea divaricata* (açoita-cavalo) (Oliveira *et al.* 2010, Siqueira *et al.* 2011, Teles *et al.* 2006, Bernardi-Wenzel *et al.* 2010).

No entanto, o fungo *Verticillium chlamydosporium* var. *catenulatum* que foi registrado no presente estudo apresentando interação com folhas, pecíolos e raízes das plantas de *Plantago major*, não é comumente encontrado como endofítico, sendo conhecido como eficiente patógeno de nematóides presentes no solo. Mas já foi também encontrado colonizando raízes de cevada (Lopes-Lorca *et al.* 2002).

Na literatura, até o momento, ainda não havia sido registrado o comportamento endofítico do fungo *Trichoderma piluliferum*. As espécies do gênero *Trichoderma* são cosmopolitas, encontradas principalmente como saprófitas do solo. Algumas são economicamente importantes por causa do seu potencial para produção de enzimas, antibióticos e sua ação como agentes de biocontrole (Harman & Kubicek 1998). Mas recentemente é que a habilidade dessas espécies viverem como endofítico tem sido reconsiderada (Harman *et al.* 2004, Samuels *et al.* 2006). Dentre as espécies endofíticas de *Trichoderma* estão incluídas *Trichoderma ovalisporum* (Holmes *et al.* 2004), *Trichoderma martiale* (Hanada *et al.* 2008), *Trichoderma stromaticum* (Samuels *et al.* 2000), *Trichoderma theobromicola*, *Trichoderma paucisporum* (Samuels *et al.* 2006), *Trichoderma koningiopsis* (Samuels *et al.* 2006), *Trichoderma viride* e *Trichoderma evansii* (Samuels & Ismael 2009), que são capazes de desenvolver íntimas associações

com sistemas radiculares de plantas, as quais tem sido caracterizadas como uma relação simbiótica oportunista avirulenta (Harman *et al.* 2004). A principal característica dessa associação é a penetração nas raízes das plantas por *Trichoderma* e a persistente sobrevivência desses fungos nos tecidos das plantas (Evans *et al.* 2003, Bailey *et al.* 2006, 2008). Os resultados encontrados, no presente estudo, demonstraram que a espécie *Trichoderma piluliferum* podem ser encontradas em associação com plantas de transagem, não apenas em raízes, como também em pecíolos e folhas.

O registro de fungos endofíticos nas sementes do vegetal analisado sugere que pode haver transmissão vertical dos fungos endofíticos já presentes em uma planta para as gerações seguintes por meio das sementes. Este resultado está de acordo com Petrini *et al.* (1992) que observaram que fungos endofíticos podem ser transmitidos para plantas de forma horizontal pelo ar, ou de forma vertical, isto é, via semente (Strobel, 2003).

Os resultados encontrados nesse estudo com relação à transmissão vertical corroboram o trabalho desenvolvido por Rodrigues e Samuels (1990), que ao isolarem endofíticos de folhas não expandidas de *Licuala ramsayi*, sugeriram que sua ocorrência foi devida à transmissão por meio de sementes do hospedeiro. Da mesma forma, Marshall *et al.* (1999) observaram que o fungo endofítico *Neotyphodium* sp. é sempre transmitido às plantas descendentes de *Triticum*.

Os resultados apontados neste estudo representam o primeiro registro sobre a composição de fungos endofíticos associados à *Plantago major* (língua de vaca), além do que mostram a importância relativa da preferência de determinado tecido vegetal pelos endofíticos e sua diversidade, o que vem a contribuir para o entendimento das relações simbióticas com esta planta.

Referências

- Akello J., Dubois T., Gold C.S., Coyne D., Nakavuma J., Paparu P. (2007) *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *J. Invertebr Pathol* **96**: 34-42.
- Aly A. H., Debbab A., Kjer J., Prosch P. (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* **41**:1-6.
- Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK, Lacava PT (2002). *Manual de isolamento de microorganismos endofíticos*. Piracicaba, ESALQ.

- Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK, Lacava PT (2005) *Manual: Isolamento de microorganismos endofíticos*. 3ª reimpressão. Departamento de Genética. Piracicaba, ESALQ.
- Araújo W.L., Saridakis H.O., Barroso P.A.V., Aguilar-Vildoso, C.I., Azevedo J.L. (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 229-236.
- Azevedo J.L., Araújo W.L. (2007) *Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects*. In: Fungi: multifaceted microbes (B.N. Ganguli & S.K. Deshmukh, Edts.) Anamaya Publishers, New Delhi.
- Barnett H.L., Hunter B.B. (1987) *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Bernardi-Wenzel J., Garcia A., Rubin-Filho C.J., Prioli A.J., Pampile J.A. (2010) Evaluation of foliar fungal endophytes diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biol. Res.* **43**: 375-384.
- Booth C. (1971) *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 236p.
- Button, C.B., 1980. *The Coelomycetes Fungi Imperfect with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth, Surrey, England.
- Carrol G.C. (1986) Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69**: 2-9.
- Chareprasert S, Piapukiew J, Thienhirun S, Whalley AJS, Sihanonth P (2006) Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World J. Microbiol Biotechnol* **22**:481-486.
- Fisher P.J. (1996) Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *Pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. *New Phytology* **132**: 119-122.
- Garcia A., Rhoden S.A., Rubin-Filho C.J., Nakamura C.V., Pamphile J.A. (2012) Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of applied Pharmaceutical Science* **2**: 35-40.
- Gond S.K., Verma V.C., Kumar A., Kumar V., Kharwar R.N. (2007) Study of endophytic fungal community from different of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J. Microbiol Biotechnol* **23**:1371-1375.
- Hanlin RT (2000) *Illustrated genera of Ascomycetes*. APS Press. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT (2002) *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição. São Paulo, Sarvier.
- Larran S, Mónaco C, Alippi HE (2001) Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World J Microbiol Biotechnol* **17**:181-184.
- Lin X, Lu C, Huang Y, Zheng Z, Su W, Shen Y (2007) Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World J Microbiol Biotechnol* **23**:1037-1040.

- 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. (Caparidaceae). *Mycopathologia* **159**: 245-249.
- Oki Y., Fernandes G.W., Correa Junior A. (2007) Fungos: amigos ou inimigos? *Ciência Hoje* **252**: 64-66.
- Oliveira M.N. (2011) Novel anthraquinone derivatives produced by *Pestalotiopsis guepinii*, an endophytic of the medicinal plant *Virola michelii* (Myristicaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **22**: 993-996.
- Osono T. (2007) Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. *Mycoscience* **48**:47-52.
- Petrini O., Stone J., Carroll F.E. (1992) Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany* **60**: 789-796.
- Pimentel I.C., Kuczkowski F.R., Chime M.A., Auer C.G., Grigoletti Junior A. (2006) Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraquariensis* A. St.-Hil.). *Floresta* **36**:123-128.
- Rodrigues K.F. (1994) The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleraceae*. *Mycologia* **86**: 376-385.
- Rosa L.H., Tabanca N., Tehen N., Wedge D.E., Pan Z., Bernier U.R., Becnel J.J.; Agramonte L.A.W., Moraes R.M. (2012) Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences* **3**: 1105-1114.
- Santamaría J, Bayman P (2005) Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* **50**:1-8.
- Sieber T.N., Dorwrth C.E. (2007) An ecological study about assemblages of endophyte fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. *Canadian Journal Botany* **1**: 1-72.
- Siqueira VM, Conti R, Araújo JM, Souza-Motta CM (2011) Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* **53**:89-95.
- Souza AQL, Souza ADL, Astolfi-Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO (2004) Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amaz* **34**:185-195.
- Strobel G., Daisy B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 491-502.
- Tan R.X., Zou W.X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* **18**: 448-459.
- Teles H.I., Sordi R., Silva G.H., Castro-Gamboa I., Bolzani V.S., Pfenning L.H., Abreu L.M., Costa-Neto C.M., Young M.C.M., Araújo A.R. (2006) Aromatic compounds produced by

Periconia atropurpurea, an endophytic fungus associated with *Xylopi aromatic*. *Phytochemistry* **67**: 2686-2690.

Unterseher M, Reiher A, Finstermeier K, Otto P, Morawetz W (2007) Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycol Progress* **6**:201-212.

Verma VC, Gond SK, Kumar A, Kharwar RN, Strobel GA (2007) Endophytic mycoflora from leaf, bark, and stem of *Azadirachta indica* A. Juss. from Varanasi (India). *Microb Ecol* **54**:119-125.

Vieira P.D.S., Souza-Motta C.M., Lima D., Torres J.B., Quecine M.C., Azevedo J.L., Oliveira N.T. (2011) Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. *Mycology* **2**: 91–97.

Tab. 1. Dados Meteorológicos das áreas de coleta durante nos períodos de estiagem e chuvoso.

Locais de Coleta	Períodos de Coleta					
	Período de Estiagem			Período Chuvoso		
	Temperatura Máxima	Temperatura Mínima	Precipitação Pluviométrica	Temperatura Máxima	Temperatura Mínima	Precipitação Pluviométrica
IPA/Recife	33,0°C	21,0°C	28,0 mm	27,0°C	18,3°C	41,5 mm
CESAM/Jaboatão	33,1°C	20,6°C	28,0 mm	27,1°C	16,6°C	68,0 mm
Petrolina	38,1°C	20,0°C	11,5 mm	26,0°C	16,3°C	30 mm

Tab. 2. Frequência de colonização dos fungos endofíticos em pecíolos, raízes, sementes e folhas de amostras da planta medicinal *Plantago major* coletadas em hortas de plantas medicinais do CESAM, do IPA e de Petrolina, durante os períodos de estiagem e chuvoso.

Fungos Endofíticos	CESAM (FC %)								IPA (FC %)								PETROLINA (FC %)								TOTAL	
	Estiagem				Chuvoso				Estiagem				Chuvoso				Estiagem				Chuvoso				FC (%)	N
	P	R	S	F	P	R	S	F	P	R	S	F	P	R	S	F	P	R	S	F	P	R	S	F		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2,7	1,8	1,8	0,9	2,7	0,9	3,7	2,7	0	0,9	0	1,8	0,9	0,9	3,7	2,7	3,7	0,9	1,8	0	1,8	0,9	3,7	1,8	10,8	47
<i>Colletrichum denatum</i>	0	3,7	0	2,7	2,7	0,9	0	5,5	0	0	0	0	2,7	0,9	0	5,5	2,7	1,8	0	1,8	1,8	0,9	0	4,6	9,7	42
<i>Colletrichum gloeosporioides</i>	1,8	4,6	4,6	4,6	2,7	2,7	2,7	2,7	6,4	5,5	1,8	11,1	3,7	0,9	1,8	2,7	0	3,7	3,7	5,5	1,8	0,9	3,7	4,6	21,3	92
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	0	2,7	0	0,9	1,8	0,9	0	2,7	3,7	0	0	5,5	1,8	0,9	0	1,8	0,9	1,8	0	2,7	2,7	0,9	0	0	8,1	35
<i>Fusarium lateritium</i>	0	0	0	0	0,9	0	0	2,7	0	0	0	0	0,9	0	0,9	1,8	0	0	0	0	0,9	0	0	0,9	2,3	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	4,6	0	2,7	0	3,7	3,7	2,7	0	5,5	9,2	2,7	0	2,7	3,7	0	0	4,6	3,7	1,8	0	4,6	2,7	14,8	64
<i>Fusarium verticillioides</i>	4,6	0	0	1,8	1,8	0,9	0	1,8	0	0	0	1,8	1,8	0,9	0	1,8	1,8	0	0	1,8	0,9	0	0	1,8	5,8	25
<i>Gloecladium virens</i>	0	0	0	1,8	1,8	1,8	0	2,7	0	0	0	0	2,7	1,8	0	3,7	0	0	0	2,7	1,8	1,8	0	3,7	6,7	29
<i>Glomerella cingulata</i>	4,6	0,9	1,8	3,7	0,9	0,9	0	1,8	0	2,7	1,8	1,8	0,9	0,9	0	1,8	0	0	0	0,9	0	0	0	0,9	6,7	29
<i>Guignardia biviae</i>	3,7	0	0	3,7	5,5	0	0	5,5	1,8	0	0	0	5,5	0,9	0	2,7	1,8	0	0	1,8	5,5	0	0	1,8	10,2	44
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0	0	1,8	0	0,9	0	3,7	1,8	0	0	0,9	0	1,8	0	3,7	2,7	0	0	1,8	0	0,9	0	5,5	3,7	7,4	32
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	1,8	4,6	0,9	3,7	1,8	4,6	0	1,8	4,6	4,6	1,8	1,8	2,7	3,7	0	1,8	0	2,7	0,9	0,9	0,9	2,7	0	1,8	12,7	55
<i>Phoma eupyrena</i>	12,9	1,8	0	10,2	3,7	1,8	2,7	7,4	9,2	2,7	1,8	12,0	4,6	0,9	4,6	12,0	2,7	0	0	8,3	3,7	0,9	0	10,2	28,7	124
<i>Phoma sorghina</i>	0	0	0	0	0,9	0,9	0	4,6	0	0	0	0	1,8	0	0	4,6	0	0	0	0	2,7	0,9	0	3,7	5,1	22
<i>Phomaopsis archeri</i>	4,6	0	0	0	1,8	0	0	2,7	0,9	1,8	0	2,7	1,8	0	0	3,7	4,6	0	0	2,7	1,8	0	0	0,9	7,6	33
<i>Trichoderma piluliferum</i>	0	0	0	0,9	2,7	1,8	0	2,7	0	0	0	0	1,8	2,7	0	5,5	0	0	0	0	1,8	2,7	0	2,7	6,5	28
<i>Trichium arysae</i>	0	0	0	0	1,8	0,9	0	2,7	0	0	0	0,9	1,8	0	0	1,8	0	0	0	0,9	0,9	0,9	0	0,9	3,5	15
<i>Verticillium dahliae</i> var. <i>caulicola</i>	0	2,7	0	1,8	2,7	3,7	0	1,8	0,9	1,8	0	3,7	2,7	2,7	0	2,7	1,8	2,7	0	1,8	1,8	0,9	0	1,8	9,7	42
<i>Xylaria</i> sp.	0	0	0	0,9	0	0	0	0,9	0	0	0	0,9	0	0	0	2,7	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	8
Fungos não-esporulantes	1,8	1,8	12,0	1,8	0	0,9	2,7	0	0	0	12,0	2,7	2,7	0,9	0	4,6	0	0	0	1,8	2,7	0,9	2,7	0,9	13,4	58
TOTAL FC (%)	38,8	25,0	27,7	39,8	40,7	24,1	19,4	58,3	30,5	20,4	25,9	56,5	46,3	19,4	17,6	71,3	20,4	13,9	12,9	37,9	37,0	15,7	20,4	51,8	193,9	838
N	42	27	30	43	44	26	21	63	33	22	28	61	50	21	19	77	22	15	14	41	40	17	22	56	-	-

FC: Frequência de colonização; CESAM: Centro de Saúde Alternativa da Muribeca; IPA: Instituto Agrônomo de Pernambuco; N: Número de isolados; P: Pecíolo; R: Raiz; S: Semente; F: Folha.



Fig. 1. Locais de coleta: ■ Horta didática de Plantas Medicinais do Setor de Fitoterápicos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) em Recife; ■ Centro de Saúde Alternativa da Muribeca (CESAM) em Jaboatão dos Guararapes; ■ Horta comunitária em Petrolina.

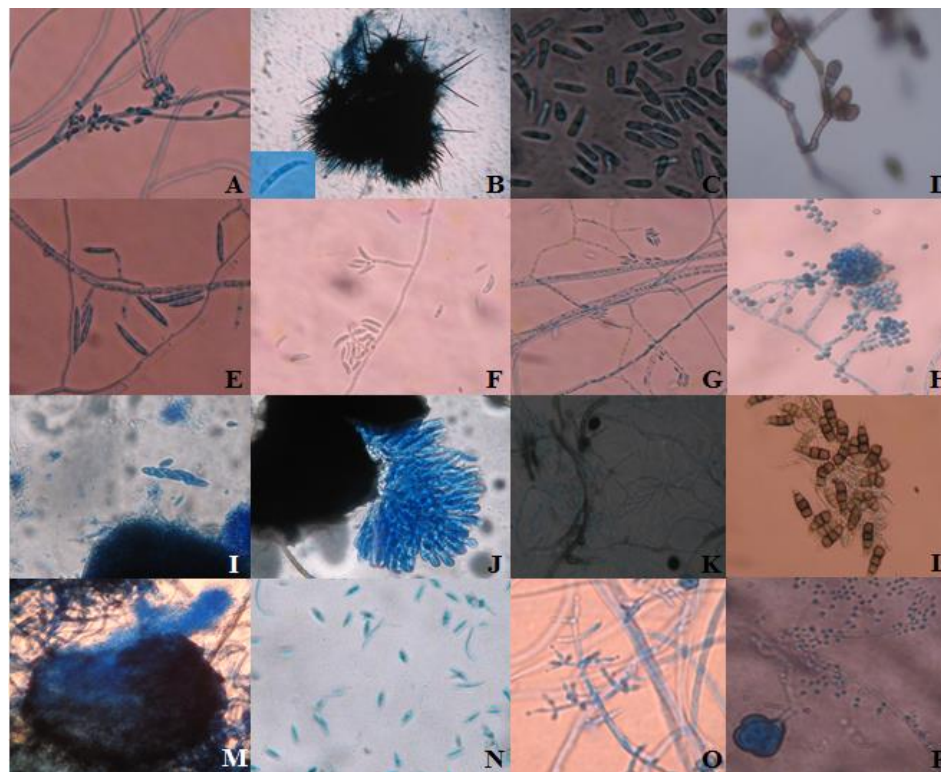


Fig. 2. Fungos endofíticos encontrados em associação com pecíolos, raízes, sementes e folhas de *Plantago major*. **A:** *Cladosporium cladosporioides*; **B:** *Colletotrichum dematium*; **C:** *C. gloeosporioides*; **D:** *Curvularia lunata*; **E:** *Fusarium lateritium*; **F:** *F. Oxysporum*; **G:** *F. verticillioides*; **H:** *Gliocladium virens*; **I:** *Glomerella cingulata*; **J:** *Guinardia bidwelli*; **K:** *Nigrospora sphaerica*; **L:** *Pestalotiopsis maculans*; **M:** *Phoma eupyrena*; **N:** *Phomopsis archeri*; **O:** *Trichoderma piluliferum*; **P:** *Verticillium chlamydosporium* var. *catenulatum* (Foto: a autora).

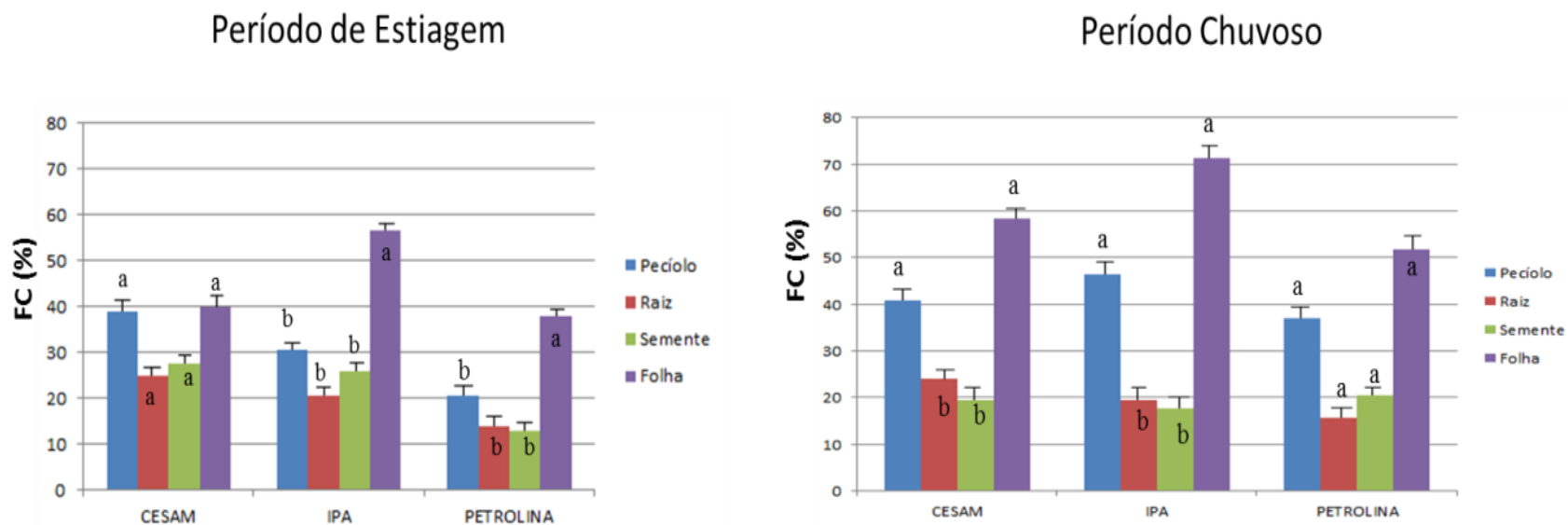


Fig. 3. Frequência de colonização dos fungos endofíticos (FC) nas diferentes partes (pecíolos, raízes, sementes e folhas) da planta medicinal *Plantago major*, coletadas em hortas de plantas medicinais do CESAM, do IPA e de Petrolina, durante os períodos de estiagem e chuvoso,. As barras seguidas da mesma letra em cada parte da planta não apresentam diferença significativa baseado no teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO 2

Potencial Antimicrobiano da Planta Medicinal *Plantago major* L. e de seus Fungos Endofíticos

Artigo a ser submetido a Revista Symbiosis

Potencial Antimicrobiano da Planta Medicinal *Plantago major* L. e de seus Fungos Endofíticos

Paula Danielle de Souza Vieira, Laís Martins, Mayana Oliveira Ramos, Débora Lima, Cristina Souza-Motta, Norma Buarque de Gusmão e Ivan da Rocha Pitta.

Plantago major é uma planta herbácea que ocorre espontaneamente em regiões tropicais e temperadas, sendo facilmente cultivada no Brasil. Apresenta efeito clínico comprovado como anti-inflamatório, antifúngico e antibacteriano sobre micro-organismos da placa dental e gengivite. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de *P. major* e de seus fungos endofíticos quanto à produção de metabólitos secundários com ação antibacteriana e antifúngica frente a micro-organismos patogênicos ao homem e às plantas. Extratos elaborados com amostras secas e frescas de cada uma das partes dessa planta (pecíolos, raízes, sementes e folhas) foram avaliados contra micro-organismos teste. Os extratos obtidos dessas amostras apresentaram atividade antimicrobiana apenas contra micro-organismos de importância médica: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Se tratando dos fungos, através do ensaio primário, utilizando blocos de gelose, e do ensaio secundário por fermentação, a maioria dos fungos endofíticos isolados de *P. major* produziram metabólitos antimicrobianos contra bactérias e fungos de importância médica e agrícola. Os resultados obtidos nesse estudo vieram a comprovar que *Plantago major* e seus fungos endofíticos apresentam capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos que atuam em diferentes graus de inibição em bactérias e fungos patogênicos ao homem e às plantas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, fungos endofíticos, *Plantago major*.

Paula D. de S. Vieira, Mayana Oliveira Ramos, Débora Lima, Cristina S. Motta, Norma Buarque de Gusmão e Ivan da Rocha Pitta.

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Nelson Chaves S/N, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.
pdani_vieira@hotmail.com

Introdução

O estudo das interações entre plantas e micro-organismos tem revelado novos caminhos para a obtenção de produtos naturais. Essas interações parecem ocorrer em um nível de intimidade bioquímica surpreendente. Possivelmente, durante o processo de co-evolução de plantas e fungos endofíticos, em decorrência da transferência horizontal de genes, ambos os organismos vivos associados (fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras) adquiriram potencial genético para biossintetizar as mesmas classes de substâncias, como é o caso da planta *Taxus brevifolia* e dos seus fungos endofíticos, onde ambos produzem a substância taxol, com atividade antitumoral (Li et al. 2000).

Muitos metabólitos produzidos por plantas e fungos endossimbiontes são, na verdade, induzidos por micro-organismos fitopatogênicos, concluindo-se que a produção de compostos bioativos não procede exclusivamente dos endofíticos, mas da interação destes com sua planta hospedeira (Desjardins et al. 1989).

Desse modo, os micro-organismos endofíticos que vivem em associação com plantas constituem uma fonte promissora de metabólitos secundários, uma vez que um único endófito pode ser capaz de produzir uma grande variedade de compostos bioativos que inibem o desenvolvimento de patógenos (Weber et al. 2007).

Além disso, diante da realidade de micro-organismos patogênicos multirresistentes e levando em consideração a capacidade de produção de compostos antimicrobianos por endófitos é indispensável a busca por substâncias antibióticas com novos mecanismos de ação e efeitos menos tóxicos (Azevedo et al. 2000).

Nesse contexto, os fungos endofíticos de plantas medicinais estão sendo amplamente estudados quanto à produção de metabólitos secundários potencialmente bioativos e úteis para propósitos farmacêuticos, biotecnológicos e agrícolas (Tan e Zou 2001; Strobel et al. 2004; Gunatilaka 2006; Rosa et al. 2012; Bernardi-Wenzel et al. 2010; Targa et al. 2011; Devi e Wahab 2012; Rhoden et al. 2012; Xue et al. 2012; El-Khawaga et al. 2013; Powthong 2013).

A planta medicinal *Plantago major*, também conhecida como língua de vaca, tem grande potencial para utilização clínica e exploração comercial, uma vez que apresenta efeito anti-inflamatório, antifúngico e antibacteriano comprovado sobre micro-organismos, como por exemplo, aqueles associados à placa dental e à gengivite (Memento terapêutico 2002).

Em virtude de suas propriedades fitoterápicas com efeito antibacteriano e antifúngico (Miyake et al. 2004), *Plantago major* foi o vegetal selecionado para o estudo envolvendo sua micobiota endofítica, uma vez que a relação de simbiose com fungos pode ter participação nas propriedades terapêuticas dessa espécie.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de *Plantago major* e dos seus fungos endofíticos para produzir metabólitos secundários com ação antibacteriana e antifúngica frente a micro-organismos patogênicos ao homem e a plantas.

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Origem e Manutenção dos Fungos

Os fungos endofíticos utilizados neste estudo foram obtidos em associação com raízes, pecíolos, sementes e folhas de *Plantago major* (língua de vaca). Uma vez depositados na Coleção de Culturas URM (Universidade Recife Micologia), Brasil, os mesmos foram mantidos em meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA), armazenados a 4°C e repicados mensalmente para a manutenção das culturas.

Seleção de Fungos Endofíticos de *Plantago major* com Potencial Antimicrobiano

Atividade Antimicrobiana pelo Método de Ichicawa

Fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos de *Plantago major* (língua de vaca) foram submetidos ao ensaio antimicrobiano frente a micro-organismos teste em meio sólido, baseado na metodologia de Ichicawa et al. (1971), também conhecida como “Método do bloco de gelose”, para a seleção rápida e qualitativa de micro-organismos bioativos.

Os micro-organismos teste utilizados para o ensaio foram as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (patogênicas ao homem); e *Bacillus megaterum* UFPEDA 549, *Xantomonas campestris* UFPEDA 585, *Citrobacter broakii* UFPEDA 1008 (fitopatogênicas) provenientes da Coleção de Culturas UFPEDA, Departamento de Antibióticos, UFPE,

Recife, Brasil; além dos fungos patógenos humanos *Candida albicans* (UFPEDA 1017) e *Trichosporon ovoides* (URM 6294), tendo sido este último isolado obtido da Micoteca - URM, do Departamento de Micologia, UFPE, Recife, Brasil.

Cada fungo endofítico foi cultivado na superfície de BDA em placas de Petri a 30°C por sete dias. Após este período, discos com 6 mm de diâmetro foram cortados da colônia com um furador esterilizado e transferidos para a superfície dos meios Ágar Muller-Hinton e BDA previamente semeado com a suspensão dos esporos dos micro-organismos teste bactérias e fungos, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24/48 horas no caso de bactérias; e a 30 °C por 48-120 horas no caso de fungos.

A avaliação foi realizada mediante medição dos halos de inibição após esse período, onde os diâmetros dos halos mensurados foram expressos em milímetros. As provas foram realizadas em triplicata.

Avaliação *in vitro* do Antagonismo contra Fungos Fitopatogênicos – Técnica de Cultura Pareada

Os mesmos fungos endofíticos submetidos ao ensaio antimicrobiano com blocos de gelose, pela metodologia de Ichicawa, também foram testados pelo método da cultura pareada, que consistiu no confronto direto do provável antagonista (endofítico) com os fungos patogênicos, em placas de Petri contendo meio de cultura sólido BDA (Mariano 2005).

Para o teste de antagonismo foram utilizados os seguintes fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* (URM 5283) e *Colletotrichum acutatum* (URM 5565), provenientes da Micoteca - URM, do Departamento de Micologia, UFPE, Recife, Brasil.

Para determinar a velocidade de crescimento micelial de cada isolado fúngico (endofítico e fitopatógeno). Foram feitas inoculações individuais, transferindo-se discos de micélio-ágar (4 mm de diâmetro) para o centro de placas de Petri, contendo meio BDA, com três repetições para cada isolado. Foi realizada a mensuração diária dos diâmetros das colônias até o momento em que atingiram a borda da placa. A taxa de crescimento para cada uma das espécies foi obtida através da fórmula adaptada de Lilly e Barnett (1951): $T_{xc} = (C2 - C1) / (T2 - T1)$. Onde: T_{xc} = taxa de crescimento; $C1$ = crescimento no tempo 1; $C2$ = crescimento no tempo 2; $T1$ = tempo em que ocorreu a leitura 1; $T2$ = tempo em que ocorreu a leitura 2.

Para o teste de antagonismo, cada fungo endofítico foi cultivado na superfície de BDA em placas de Petri a 30 °C por sete dias. Após este período, discos com 6 mm de diâmetro foram retirados das colônias crescidas com um furador esterilizado. O mesmo procedimento foi adotado em relação aos fungos fitopatogênicos. Um disco do endofítico e outro do fitopatógeno foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, de forma equidistante, mantendo uma distância de 7 cm entre si e a 1 cm da borda, de tal forma que possibilitasse as colônias alcançarem, simultaneamente, o centro da placa, respeitando-se a taxa de crescimento. As placas foram incubadas a 30 °C por 14 dias. Como controle foi inoculado apenas o fungo fitopatogênico. A avaliação foi realizada mediante medição dos halos de inibição após esse período, onde os diâmetros dos halos mensurados foram expressos em milímetros. As provas foram realizadas em triplicata. O controle positivo utilizado foi miconazol (0,07 mg/mL).

Os isolados foram classificados quanto ao antagonismo segundo a escala de Bell et al. (1982), com as seguintes notas: 1 – Antagonista cresce e ocupa toda a placa, 2 – Antagonista cresce sobre uma parte do patógeno (2/3 da placa), 3 – Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum organismo domina o outro), 4 – Patógeno cresce sobre uma parte do antagonista (2/3 da placa) e 5 – Patógeno cresce e ocupa toda a placa.

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento, mediu-se o diâmetro das colônias dos fitopatógenos após 7 dias de cultivo para fungos de crescimento rápido, e 15 dias para fungos de crescimento lento (Dias et al. 2005).

Ensaio Fermentativo com os Fungos Endofíticos mais Promissores para Extração de Metabólitos Bioativos

Os fungos que mostraram os melhores resultados na seleção preliminar foram crescidos em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA a temperatura de 30 °C por 5 dias.

Após este período, 5 blocos de gelose (6 mm) de cada cultura crescida foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do Caldo de Batata Dextrose e incubados sob agitação de 180 rpm, a 30 °C durante 15 dias (Kaouadji et al., 1993).

O micélio foi separado do líquido metabólico por filtração, utilizando papel de filtro Whatman nº 4. Aos líquidos metabólicos obtidos dos fungos testados foi adicionado 50 mL de acetato de etila, que foi utilizado como solvente de extração. Após 24 horas ocorreu a extração dos metabólitos secretados ao meio de cultura, utilizando a

metodologia de partição líquido-líquido em balão de separação de 250 mL, onde foram separadas as duas fases não miscíveis formadas no sistema, a aquosa (líquido metabólico), localizada na parte inferior do sistema, da outra orgânica (solvente de extração, acetato de etila rico em metabólitos), na parte superior. A fase orgânica foi, então, concentrada em rotaevaporador a temperatura de 40 °C e, em seguida, colocada em dessecador, até a obtenção de peso constante. Os extratos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -20 °C.

Elaboração de Extratos do Vegetal *Plantago major*

Amostras de plantas de *Plantago major* foram coletadas inteiras na horta didática de plantas medicinais do Laboratório de Fitoterápicos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sendo, posteriormente, separados para a elaboração do extrato os seguintes tecidos: folhas, raízes, sementes e pecíolos. Parte desse material foi submetido à secagem em estufa a temperatura de 30°C durante 15 dias. Outra parte do material foi utilizada na forma fresca, imediatamente após a coleta.

O método utilizado para a extração de princípios ativos foi o método da maceração (Simões et al. 2007; Cechinel Filho e Yunes 1998). Os materiais fresco e seco foram macerados e colocados em frascos de Erlenmeyer (250 mL), ao qual se adicionou o solvente extrator acetato de etila em pequena escala na proporção de 10g de material vegetal para 50 mL de acetato de etila, durante 24 horas. Após a maceração ocorreu a filtração e, em seguida, o acetato de etila foi eliminado em rotaevaporador. Os extratos obtidos foram guardados em dessecador e pesados periodicamente até a obtenção de um peso constante.

Os extratos brutos obtidos do material vegetal (folhas, pecíolos, sementes e raízes) seco e fresco foram ressuspensos em acetato de etila e usados em posteriores testes para avaliar a atividade antimicrobiana.

Avaliação da Susceptibilidade *in vitro* aos Antimicrobianos produzidos por *Plantago major* e seus Fungos Endofíticos

(Método de Difusão em Disco de Papel)

Discos de papel esterilizados, com aproximadamente 6 mm de diâmetro, foram impregnados com 20µL dos extratos brutos de *Plantago major* e de seus fungos biativos ressuspensos em acetato de etila e depositados nas superfícies das placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton e BDA previamente semeado com a

suspensão dos esporos dos micro-organismos teste bactérias e fungos, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 24/48 horas no caso de bactérias; e a 30°C por 48-120 horas no caso de fungos. A avaliação foi realizada mediante medição dos halos de inibição após esse período, onde os diâmetros dos halos mensurados foram expressos em milímetros. As provas foram realizadas em triplicata.

O perfil de susceptibilidade dos micro-organismos teste foi determinado através de um antibiograma com os seguintes discos dos antibióticos de referência, como controle positivo: tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg) e gentamicina (10µg) para bactérias; e cetoconazol e miconazol para fungos. Como controle negativo, o extrato bruto do caldo de cultura sem a inoculação dos micro-organismos. E como controle do solvente, o acetato de etila. As provas foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

Seleção de Fungos Endofíticos com Maior Potencial Antimicrobiano

(Método de Ichicawa)

Dos cinquenta e nove fungos endofíticos submetidos ao ensaio em meio sólido, sendo um espécime para cada espécie obtida de cada tecido (Tabela 1), quarenta e seis demonstraram atividade contra pelo menos um microrganismo teste com halos significativos variando de 10 a 36.5 mm. Em geral, os isolados se mostraram capazes de inibir bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, significando um amplo espectro de ação. Os fungos com maior potencial antibacteriano nesse ensaio primário foram *Curvularia lunata*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium virens*, *Glomerella cingulata*, *Pestalotiopsis maculans*, *Phomopsis archeri* e *Trichoderma piluliferum* (Tabela 1).

Resultados similares foram encontrados em outros estudos onde os fungos endofíticos *Fusarium*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Curvularia* aparecem inibindo o crescimento de micro-organismos patogênicos (Phongpaichit et al. 2006; Bernardi-Wenzel 2010; Oliveira et al. 201).

Os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium verticillioides*, *Guignardia bidwellii*, *Nigrospora sphaerica*, *Phoma sorghina*, *Tritirachum oryzae*, *Verticillium catenulatum* e *Xylaria* não inibiram o crescimento de nenhum micro-organismo teste. Em outros estudos *Cladosporium cladosporioides* também aparece sem a capacidade de inibir

bactérias patogênicas. Entretanto, as demais espécies anteriormente citadas são comumente descritas como produtoras de compostos biologicamente ativos (Oliveira et al. 2011; Bernardi-Wenzel et al. 2010; Siqueira et al. 2011).

Dentre os fungos, apenas *Candida albicans* mostrou-se sensível aos fungos endofíticos como já é previsto na literatura (Phongpaichit et al. 2006).

Avaliação *in vitro* do Antagonismo contra Fungos Fitopatogênicos – Técnica de Cultura Pareada

O fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* (URM 5283) apresentou a maior média de crescimento (0,78 cm/dia), levando cerca de cinco dias para colonizar toda placa de Petri e o fungo endofítico com maior média de crescimento foi *Trichoderma piluliferum* (1,60 cm/dia), seguido por *Gliocladium virens* (1,49 cm/dia).

Enquanto que, os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Tritirachum orysae*, *Phoma eupyrena*, *Phoma sorghina* e *Guignardia bidwellii* foram os isolados endofíticos que apresentaram crescimento mais lento, chegando a colonizar toda placa de Petri apenas depois de 15-20 dias aproximadamente (Tabela 2). Apesar do seu crescimento lento, espécies do gênero *Cladosporium*, por exemplo, são citadas na literatura pela sua habilidade antagônica a outras espécies fúngicas (Medeiros & Menezes, 1994).

Espécies de *Trichoderma* e *Gliocladium* podem se sobressair em relação ao fitopatógeno, principalmente, se aplicados no hospedeiro antes da chegada do fitopatógeno (Harman, 2000).

De acordo com a escala de Bell et al. (1982), a maioria dos isolados de fungos endofíticos confrontados com o fungo fitopatogênico *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *C. acutatum* receberam nota 3 ao antagonismo, visto que nenhum micro-organismo dominou o outro, ou seja, os dois fungos cresceram juntos até o centro da placa, ocorrendo paralisação do crescimento dos isolados, com pouca ou nenhuma sobreposição de hifas.

Os fungos endofíticos *Fusarium lateritium*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium virens* e *Pestalotiopsis maculans* receberam nota 2, uma vez que esses fungos cresceram sobre uma parte do patógeno e dominaram 2/3 da placa.

Já os fungos *C. cladosporioides*, *G. bidwellii*, *P. eupyrena*, *P. sorghina*, *Tritirachum orysae*, *Verticillium catenulatum* e *Xylaria* tiveram seu crescimento inibido visto que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cresceu sobre toda a placa e receberam nota 5 ao antagonismo (Tabela 2).

Oliveira (2011) observou resultados similares aos do presente trabalho, pois ao testar em cultivo pareado a capacidade antagônica de fungos endofíticos isolados de folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale*) contra *Colletotrichum gloeosporioides*, verificou que o fungo *Trichoderma* sp. apresentou eficiente inibição do crescimento do fungo fitopatogênico. Enquanto que, nos estudos realizados por Kumar et al. (2011) fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Tylophora indica*, testados através dessa mesma técnica de pareamento, mostraram atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*.

Curvularia lunata var. *aeria* isolada como endofítico de folhas de *Musa* spp mostrou ser potencial antagonista para o controle biológico, visto que inibiu 100% do crescimento de *Pseudocercospora musae*, com sobreposição de hifas (Assunção 2010), com isso, receberam nota 1 ao antagonismo, e recebeu nota 3 em relação ao antagonismo de *Cladosporium musae*, pois cresceu até 50% da placa de Petri.

Quarenta e nove isolados endofíticos de *Phomopsis* sp. obtidos de folhas e pecíolos da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* foram testados quanto a capacidade antagônica contra duas linhagens de *Guignardia citricarpa*, sendo que 38 deles inibiram o crescimento do fitopatógeno (Gomes 2008). Orole e Adejumo (2009) estudaram o efeito de fungos endofíticos isolados de raízes de milho (*Beauveria bassiana*, *Trichoderma koningii*, *Alternaria alternata*, *Phoma* sp. e *Acremonium strictum*) sobre os fungos fitopatogênicos (*F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *F. verticillioides* e *Cladosporium herbarum*) isolados de plantas de milho infectadas e os resultados mostraram que *T. koningii* e *A. alternata* cresceram sobre o micélio de todos os patógenos.

Fungos endofíticos isolados de *Eucalyptus citriodora*, *Nyctantles* e *Echinacea purpurea* também apresentam efeito antifúngico frente a fitopatógenos como o *Colletotrichum acutatum* e *Curvularia lunata* (Kharwar et al. 2010; Gond et al. 2011; Rosa et al. 2012).

Os endofíticos do presente estudo que apresentaram notas 2 e 3, são considerados prováveis antagonistas. Esses resultados obtidos *in vitro* devem ser interpretados como de valor relativo para o controle ao nível de campo (Bettiol et al. 2009). Esta propriedade antagônica pode ser usada no futuro para a exploração de compostos naturais, que podem competir com fungicidas sintéticos.

Micro-organismos de controle que tem capacidade de competir de forma efetiva e usar nutrientes disponíveis podem inibir de forma eficaz o patógeno por impedir a germinação de propágulos ou a infecção (Punja e Utkhrde 2003).

Ensaio Fermentativo e Avaliação de Susceptibilidade “in vitro” aos Antimicrobianos

De acordo com os resultados obtidos na seleção preliminar para avaliação do potencial antimicrobiano, os espécimes analisados de uma mesma espécie de fungo apresentaram resultados semelhantes de inibição frente aos fungos e bactérias testados, independentemente dos tecidos vegetais dos quais foram coletadas. Dentre os isolados, foram escolhidos para o ensaio fermentativo aqueles que exibiram, coincidentemente, halos ≥ 10 mm contra bactérias patogênicas e fungos patogênicos ao homem; e notas 2 ou 3 no teste de antagonismo frente a fungos fitopatogênicos, sendo duas espécimes de cada espécie de fungo endofítico testado. Portanto, para o ensaio fermentativo foram utilizados 16 isolados (Tabela 3).

Desses fungos submetidos ao ensaio fermentativo, 14 exibiram atividade antimicrobiana frente a pelo menos um dos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, com halos de inibição que variaram de 10 a 15 mm. Esses mesmos micro-organismos, com exceção de *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*, também foram inibidos pelos extratos brutos obtidos de amostras secas e frescas de pecíolos, raízes, sementes e folhas de *Plantago major*, com halos de inibição que variaram de 10 a 15 mm. As amostras frescas e secas apresentaram resultados semelhantes na avaliação da atividade antimicrobiana (Tabela 3).

Enquanto que, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterum*, *Xantomonas campestris*, *Citrobacter broakii*, *Trichosporon ovoides*, não foram inibidos por nenhum dos extratos brutos dos tecidos de *Plantago major*, nem pelos extratos dos fungos endofíticos testados.

Phomopsis archeri não apresentou atividade antimicrobiana frente a nenhum dos micro-organismos testados, apesar desse fungo ser comumente encontrado em plantas medicinais produzindo compostos antimicrobianos (Siqueira et al 2011; Garcia et al. 2012).

O poder inibitório de *Plantago major* está em concordância com outros estudos que apontam a sensibilidade de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* frente ao extrato dessa planta (Freitas et al. 2002), que também apresenta ação antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivales* e *Prevotella melaninogenica* causadoras de doença periodontal (Silva et al. 2006).

Segundo Ranv e Briner (1988), Handjieva (1991) e Zanon et al. (1999), a capacidade de inibir fungos e bactérias de *Plantago major* é devida a produção das substâncias plantamajosídio, aucubina e catalpol com propriedades antibióticas.

Pestalotiopsis maculans foi o fungo mais promissor na produção de compostos bioativos nesse estudo, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum* (Tabela 3). O gênero *Pestalotiopsis* é conhecido por apresentar espécies que produzem substâncias bioativas, como pestacina, isopestacina, criptocinina e ácido torrecianico, que possuem atividade antimicrobiana e antioxidante (Strobel et al. 2002; Strobel et al. 2003).

Gomes-Figueiredo (2007) observou que os extratos metabólicos produzidos por endofíticos do gênero *Pestalotiopsis*, isolados da planta medicinal *Maytenus ilicifolia*, tem atividade contra uma variedade de patógenos humanos e ao fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa*.

Em diversos outros trabalhos, fungos endofíticos isolados de plantas com propriedades medicinais são encontrados produzindo metabólitos com atividade antimicrobiana. Como ocorre com o fungo *Myrothecium verrucaria* isolado de *Calotropis procera*, que apresenta compostos com ação antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos (El-Khawaga et al. 2013).

Os endofíticos isolados das plantas medicinais *Lippia sidoides* e *Simphytum officinale* (confrei) também apresentam bioatividade comprovada frente às bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Pileggi et al. 2006; Siqueira et al. 2011).

Resultados similares foram observados com *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp. isolados de plantas medicinais, que mostram atividade contra *Staphylococcus aureus*, além de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Sette et al. 2004; Lin et al. 2007).

Phongpaichit et al. (2006) isolaram fungos endofíticos da planta medicinal *Garcinia* e verificaram que os metabólitos extraídos desses fungos com acetato de etila inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Bernardi-Wenzel (2008) também pesquisou a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de fungos e constatou que os compostos produzidos por fungos endofíticos de *Luehea divaricata* possuem ação contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, observando ainda que os metabólitos secundários extraídos com acetato de etila apresentaram maior eficiência contra os micro-organismos testes do que aqueles extraídos com outros solventes.

Extratos dos fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Sapindus saponaria* (sabão-de-soldado) também inibiram o crescimento de bactérias patogênicas ao homem (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de outros) (Garcia et al. 2012). Assim como extratos dos fungos endofíticos isolados de *Embllica officinalis* da Índia que apresentaram ação biativa contra *Candida albicans*.

Já os fungos endofíticos da planta medicinal *Ophiopogon japonicus* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, além de *Cryptococcus neoformans* (Liang et al. 2012).

Os endofíticos isolados de *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* e *Thalassia hemprichii* apresentam atividade antimicrobiana contra patógenos humanos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Supaphon et al. 2013).

Os resultados obtidos nesse estudo vieram a comprovar que *Plantago major* e seus fungos endofíticos apresentam capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos que atuam em diferentes graus de inibição em bactérias e fungos patogênicos ao homem e às plantas. Tal fato evidencia a existência de vias comuns de metabolismo secundário em diferentes espécies, inclusive, de outros níveis hierárquicos (fungos e plantas) (Berdys, 2005). Desse modo, os fungos endofíticos participam de uma complexa interação com a planta hospedeira e a manipulação dos mesmos em laboratório pode afetar sua capacidade metabólica.

Referências

- Azevedo JL, Maccheroni Junior W, Pereira, JO, Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic J. Biotechnol.** 3: 40-65.
- Bandara WMMS, Seneviratne G, Kulasoorya SA (2006) Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences** 31:

645-650.

Berdy J (2010) Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot**, v. 58, p. 1-26, 2005.

Bernarddi-Wenzel J, Garcia A, Rubin-Filho CJ, Prioli AJ, Pampile JA (2010) Evaluation of foliar fungal endophytes diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biol. Res.** 43: 375-384.

Devi NN, Wahab F (2012) Antimicrobial properties of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Camellia sinesis*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 3: 420-427.

El-Khawaga MA, El-Aziz MMA, Hegazi GAEM (2013) Identification and bioactive potencial of endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Life Science Journal** 10: 2804-2814.

Freitas AG, Costa V, Farias ET, Lima MCA, Souza MCA, Ximenes EA (2002) Atividade estafilocócica do *Plantago major* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 12: 64-65.

Garcia A, Rhoden SA, Rubin-Filho CJ, Nakamura CV, Pamphile JA (2012) Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of applied Pharmaceutical Science** 2: 35-40.

Gond SK, Mishra A, Sharma VK, Verma SK, Kumar J, Kharwar RN, Kumar A (2011) Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. **Mycosc.** DOI: 10.1007/s10267-011-0146-z.

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

Ichikawa T, Date M, Ishikura T, Ozaki A (1971) Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol.** 16:218-224.

Kharwar RN, Gond SK, Kumar A, Mishra A (2010) A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook., and their antimicrobial activity. **World J. Microbiol Biotechnol** 26:1941-1948.

Kumar S, Kaushik N, Edrada-Ebel R, Ebel R, Proksch P (2011) Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. **World J. Microbiol Biotechnol** 27:571-577.

- Lin X, Lu C, Huang Y, Zheng Z, Su W, Shen Y (2007) Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World J Microbiol Biotechnol** 23:1037–1040.
- Marinho AMR, Rodrigues-Filho E, Moitinho MLR, Santos LS (2005) 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.
- Memento Terapêutico (2002) **Programa Estadual de Plantas medicinais**. 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2002.
- Oliveira MN (2011) Novel anthraquinone derivatives produced by *Pestalotiopsis guepinii*, an endophyte of the medicinal plant *Virola michelii* (Myristicaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** 22: 993-996.
- Orole OO, Adejumo TO (2009) Activity of fungal endophytes against four maize wilt Pathogens. **African J of Microbiol Res** 3(12):969-973. JH
- Pileggi SAV (2006) **Isolamento e Caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 141p.
- Phongpaichit S, Rungjindamai N, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J (2006) Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunol Med Microbiol** 48: 367-372.
- Powthong P, Thongmee A, Suntornthiticharoen P (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Sesbania grandiflora* (L.). **International Journal of Phytomedicine** 5:102-107.
- Rhoden SA, Garcia A, Bongiorno VA, Azevedo JL, Pamphile JA (2012) Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. **J. App. Pharm Sci** 2: 57-59.
- Rosa LH, Tabanca N, Tehen N, Wedge, DE, Pan Z, Bernier UR, Becnel JJ, Agramonte LAW, Moraes RM (2012) Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with micropropagated medicinal plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **American Journal of Plant Sciences** 3: 1105-1114.
- Santos SN (2012) **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Cobretum leprosum* do bioma Caatinga**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, 182p..

- Santiago IF (2011) **Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a angiospermas presentes na Antártica**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. 98p.
- Silva RLOS, Luz SJ, Silveira EB, Cavalcante UMT (2006) Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta bot.bras** 20: 649-655.
- Siqueira VM, Conti R, Araújo JM, Souza-Motta CM (2011) Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis** 53:89-95.
- Strobel GA (2003) Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection** 5: 535-534.
- Strobel G, Daisy B, Castilho U, Harper J (2004) Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products** 67: 257-268.
- Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports** 18: 448-459.
- Targa SEM, Orlandelli RC, Bernardi-Wenzel J, Conte H, Pamphile JA (2011) Influence of crude extracts of endophytes from *Lucheia divaricate* (Malvales; Tiliaceae) on the in vitro development of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae) larvae. **Sabios: Rev. Saúde e Biol.** 6: 1-7.
- Weber RWS, Kappe R, Paulutat T, Mosker E, Anke H (2007) Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry** 68: 886-982.
- Xue H, Lu C, Liang L, Schen Y (2012) Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an endophytic fungus of *Cephalotaxus fortunei*. **Rec Nat Prod.** 6: 28-34.
- Zanon SM, et al. (1999) Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. **Rev. Latinoam. Microbiol.** 41: 59-62.

Tabela 1. Halos de inibição dos micro-organismos teste frente aos fungos endofíticos.

Fungo Endofítico	Tecido Vegetal do Isolamento	Micro-organismos teste / Halo de Inibição (mm)									
		S. <i>aureus</i>	B. <i>subtilis</i>	P. <i>aeruginosa</i>	E. <i>coli</i>	K. <i>pneumoniae</i>	B. <i>megaterum</i>	X. <i>campestris</i>	C. <i>broarii</i>	C. <i>albicans</i>	T. <i>ovoides</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Raiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Peciolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Semente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum dematium</i>	Raiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum dematium</i>	Peciolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum dematium</i>	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Raiz	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Peciolo	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Semente	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Folha	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-
<i>Curvularia lunata</i>	Raiz	17.75	28.5	11	30	11	-	-	-	10	-
<i>Curvularia lunata</i>	Peciolo	18.5	30	11.5	25.7	11	-	-	-	10	-
<i>Curvularia lunata</i>	Semente	15.5	31	11	23	11	-	-	-	10	-
<i>Curvularia lunata</i>	Folha	15.5	35	11	20.7	11	-	-	-	10	-
<i>Fusarium lateritium</i>	Peciolo	18	25.25	15	24	12	-	-	-	10	-
<i>Fusarium lateritium</i>	Semente	19	25.5	15	25	12	-	-	-	10	-
<i>Fusarium lateritium</i>	Folha	18	25	15	25.5	12	-	-	-	10	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	Peciolo	21	36	17	25	15	-	-	-	10	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	Semente	21.5	36.5	17	24.5	15	-	-	-	10	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	Folha	20.5	36.25	17	23.7	15	-	-	-	10	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	Raiz	10	10	8	10	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	Peciolo	10	10	8	10	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	Semente	10	10	8	10	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	Folha	10	10	8	10	-	-	-	-	-	-
<i>Gliocladium virens</i>	Raiz	25.75	26.5	19	25.5	18	-	-	-	11	-
<i>Gliocladium virens</i>	Peciolo	25.5	26.25	19	24.7	18	-	-	-	11	-
<i>Gliocladium virens</i>	Folha	25.75	26.5	19	26.5	18	-	-	-	11	-
<i>Glomerella cingulata</i>	Raiz	21.5	34	18	26.5	18.5	-	-	-	12	-
<i>Glomerella cingulata</i>	Peciolo	20.5	34.5	18	25.7	18	-	-	-	12	-
<i>Glomerella cingulata</i>	Folha	21.5	34.75	18	26	18	-	-	-	12	-
<i>Guignardia bidwellii</i>	Peciolo	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Guignardia bidwellii</i>	Folha	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Peciolo	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Semente	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Folha	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Raiz	22	27.5	11	30.5	11.5	-	-	-	12	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Peciolo	21	25.5	11	29	11.5	-	-	-	12	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Semente	20	26	11	29.5	11.5	-	-	-	12	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Folha	22	26.75	11.5	30	11	-	-	-	12	-
<i>Phoma eupyrena</i>	Raiz	19.5	25.5	-	24	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma eupyrena</i>	Peciolo	19.5	25.5	-	24	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma eupyrena</i>	Semente	19.5	25	-	24	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma eupyrena</i>	Folha	19.5	25.5	-	24	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma sorghina</i>	Peciolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma sorghina</i>	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i>	Raiz	10.5	11	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i>	Peciolo	10.5	11	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i>	Folha	10	11	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Raiz	17	25.5	15	26.5	10	-	-	-	10	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Peciolo	17	23.5	15	23.2	10	-	-	-	10	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Folha	17	25	15	25	10	-	-	-	10	-
<i>Tritirachum orysae</i>	Raiz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tritirachum orysae</i>	Peciolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tritirachum orysae</i>	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium catenulatum</i>	Raiz	-	10	-	10	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium catenulatum</i>	Peciolo	-	10	-	10	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium catenulatum</i>	Folha	-	10	-	10	-	-	-	-	-	-
<i>Xylaria</i>	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os dados representam a média de três repetições. - : sem atividade.

Tabela 2. Avaliação do Antagonismo dos Fungos Endofíticos de *Plantago major* frente aos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*.

Fungo Endofítico	Tecido Vegetal do Isolamento	IVCM (cm/dia)	Atividade Antifúngica	
			Contra <i>Fusarium oxysporum</i> (URM 5283) (IVCM = 0,78)	Contra <i>Colletotrichum acutatum</i> (URM 5283) (IVCM = 0,78)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Raiz	0,49	5	5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Pecíolo	0,46	5	5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Semente	0,45	5	5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Folha	0,48	5	5
<i>Colletotrichum dematium</i>	Raiz	0,51	3	3
<i>Colletotrichum dematium</i>	Pecíolo	0,53	3	3
<i>Colletotrichum dematium</i>	Folha	0,51	3	3
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Raiz	0,54	3	3
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Pecíolo	0,54	3	3
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Semente	0,55	3	3
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Folha	0,54	3	3
<i>Curvularia lunata</i>	Raiz	0,65	3	3
<i>Curvularia lunata</i>	Pecíolo	0,65	3	3
<i>Curvularia lunata</i>	Semente	0,65	3	3
<i>Curvularia lunata</i>	Folha	0,66	3	3
<i>Fusarium lateritium</i>	Pecíolo	0,71	2	2
<i>Fusarium lateritium</i>	Semente	0,71	2	2
<i>Fusarium lateritium</i>	Folha	0,71	2	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pecíolo	0,73	2	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	Semente	0,73	2	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	Folha	0,72	2	2
<i>Fusarium verticillioides</i>	Raiz	0,66	3	3
<i>Fusarium verticillioides</i>	Pecíolo	0,66	3	3
<i>Fusarium verticillioides</i>	Semente	0,66	3	3
<i>Fusarium verticillioides</i>	Folha	0,66	3	3
<i>Gliocladium virens</i>	Raiz	1,49	2	2
<i>Gliocladium virens</i>	Pecíolo	1,49	2	2
<i>Gliocladium virens</i>	Folha	1,49	2	2
<i>Glomerella cingulata</i>	Raiz	0,55	3	3
<i>Glomerella cingulata</i>	Pecíolo	0,56	3	3
<i>Glomerella cingulata</i>	Folha	0,55	3	3
<i>Guignardia biduilli</i>	Pecíolo	0,12	3	3
<i>Guignardia biduilli</i>	Folha	0,12	3	3
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Pecíolo	0,52	3	3
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Semente	0,52	3	3
<i>Nigrospora sphaerica</i>	Folha	0,53	3	3
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Raiz	0,70	2	2
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Pecíolo	0,70	2	2
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Semente	0,70	2	2
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Folha	0,70	2	2
<i>Phoma eupyrena</i>	Raiz	0,23	5	5
<i>Phoma eupyrena</i>	Pecíolo	0,23	5	5
<i>Phoma eupyrena</i>	Semente	0,23	5	5
<i>Phoma eupyrena</i>	Folha	0,23	5	5
<i>Phoma sorghina</i>	Pecíolo	0,20	5	5
<i>Phoma sorghina</i>	Folha	0,20	5	5
<i>Phomopsis archeri</i>	Raiz	0,50	3	3
<i>Phomopsis archeri</i>	Pecíolo	0,49	3	3
<i>Phomopsis archeri</i>	Folha	0,50	3	3
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Raiz	1,60	3	3
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Pecíolo	1,60	3	3
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Folha	1,60	3	3
<i>Tritirachum orysae</i>	Raiz	0,10	5	5
<i>Tritirachum orysae</i>	Pecíolo	0,10	5	5
<i>Tritirachum orysae</i>	Folha	0,10	5	5
<i>Verticillium catenulatum</i>	Raiz	0,50	5	5
<i>Verticillium catenulatum</i>	Pecíolo	0,50	5	5
<i>Verticillium catenulatum</i>	Folha	0,50	5	5
<i>Xylaria</i>	Folha	0,36	5	5

IVCM= Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/dia) dos fungos. Escala de Bell et al. (1982): 1: Antagonista cresce em toda a placa, 2: Antagonista cresce em 2/3 da placa, 3: Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum organismo domina o outro), 4 – Patógeno cresce em 2/3 da placa e 5 – Patógeno cresce e ocupa toda a placa.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de fungos endofíticos e de amostras frescas e secas de pecíolos, raízes, sementes e folhas de *Plantago major* frente a bactérias e fungos de importância médica e agrícola.

Extratos dos Fungos Endofíticos	Tecido Vegetal do Isolamento	Micro-organismos teste / Halo de Inibição (mm)											
		S. aureus	B. subtilis	P. aeruginosa	E. coli	K. pneumoniae	B. megaterum	X. campestris	C. brookii	C. albicans	T. ovoides	F. oxysporum	C. acutatum
<i>Curvularia lunata</i>	Raiz	10	10	10	11	-	-	-	-	10	-	-	-
<i>Curvularia lunata</i>	Pecíolo	10	10	10	11	-	-	-	-	10	-	-	-
<i>Fusarium lateritium</i>	Semente	10	11	10	14	-	-	-	-	10	-	10	10
<i>Fusarium lateritium</i>	Folha	10	11	10	14	-	-	-	-	10	-	10	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	Semente	10	11	10	13	-	-	-	-	10	-	11	11
<i>Fusarium oxysporum</i>	Folha	10	11	10	13	-	-	-	-	10	-	11	11
<i>Gliocladium virens</i>	Pecíolo	10	10	10	10	-	-	-	-	11	-	10	10
<i>Gliocladium virens</i>	Folha	10	10	10	10	-	-	-	-	11	-	10	10
<i>Glomerella cingulata</i>	Pecíolo	-	-	-	14	-	-	-	-	12	-	-	-
<i>Glomerella cingulata</i>	Folha	-	-	-	14	-	-	-	-	12	-	-	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Semente	12	14	11	17	-	-	-	-	12	-	12	12
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Folha	12	14	11	17	-	-	-	-	12	-	12	12
<i>Phomopsis archeri</i>	Pecíolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i>	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Raiz	10	11	-	11	-	-	-	-	10	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Pecíolo	10	11	-	11	-	-	-	-	10	-	-	-
Extratos Vegetais													
Pecíolo Seco		11	10	10	13	-	-	-	-	11	-	-	-
Pecíolo Fresco		11	10	10	13	-	-	-	-	11	-	-	-
Raiz Seco		12	12	10	10	-	-	-	-	11	-	-	-
Raiz Fresca		12	12	10	10	-	-	-	-	11	-	-	-
Semente Seca		13	10	10	10	-	-	-	-	10	-	-	-
Semente Fresca		13	10	10	10	-	-	-	-	10	-	-	-
Folha Seca		12	11	10	14	-	-	-	-	10	-	-	-
Folha Fresca		12	10	10	14	-	-	-	-	10	-	-	-

-: sem atividade antimicrobiana.

CAPÍTULO 3

Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais para Cultivo de Fungos Endofíticos Produtores de Compostos Bioativos

Artigo a ser submetido ao Brazilian Journal of Microbiology

Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais para Cultivo de Fungos Endofíticos Produtores de Metabólitos Secundários Bioativos

Paula D. de S. Vieira, Mayana Oliveira Ramos, Débora Lima, Cristina S. Motta, Norma Buarque de Gusmão e Ivan da Rocha Pitta.

Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

Os fungos endofíticos que vivem em associação com vegetais são produtores de metabólitos que conferem proteção ao hospedeiro. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar a eficiência da utilização de resíduos agroindustriais como meios de cultivo alternativos de baixo custo para endofíticos, visando à produção de esporos e de metabólitos secundários bioativos. Fungos endofíticos de *Plantago major* foram, então, mantidos durante 20 dias em fermentação sólida, utilizando, separadamente, os seguintes resíduos: grãos de arroz, cascas de maracujá, cascas de tomate, resíduos de abacaxi, bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar, a partir dos quais foram obtidos extratos acetotílicos. Os extratos foram submetidos ao ensaio antimicrobiano, utilizando como indicadores biológicos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas auruginosa*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum acutatum*. Os micro-organismos *S. aureus* e *B. subtilis* foram os mais sensíveis aos extratos dos fungos cultivados nos meios de cultura contendo arroz e maracujá. Esses meios também favoreceram a produção de esporos. Dentre os endofíticos testados, *Pestalotiopsis maculans* foi o fungo que apresentou maior potencial bioativo frente aos micro-organismos testados.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, bioatividade e resíduos agroindustriais.

Correspondence: Paula Danielle de Souza Vieira, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Nelson Chaves S/N, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: pdani_vieira@hotmail.com

Introdução

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies incapazes de conseguir por si próprias os seus meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predatórias. Os fungos endofíticos, além de conferir certas vantagens à sua planta hospedeira, são também reconhecidos como fonte de novos produtos naturais, alguns dos quais apresentam reconhecida atividade antibiótica, com a função de manter a associação mutualista (Natori *et al.*, 1981; Suryanarayanan *et al.*, 2009).

A grande maioria dessas substâncias é classificada como metabólitos secundários para diferenciá-las daquelas de função primária básica para os organismos vivos. Os metabólitos primários, em geral, macromoléculas, estão relacionados com o crescimento dos organismos e a transformação de nutrientes em biomassa, sendo os principais exemplos o ácido láctico ou os aminoácidos (Harborne e Tomas-Barberan, 1991). Ao contrário, os metabólitos secundários, geralmente micromoléculas, permitem a sobrevivência em ambientes extremamente competitivos que contam com escassos nutrientes, como, por exemplo, os antibióticos (Nosov, 1994).

Os metabólitos produzidos por endofíticos podem pertencer a diversos grupos químicos, como esteróides, xantonas, compostos fenólicos, isocumarinas, quinonas, terpenos, e alcalóides, dentre outros (Adrio e Demain, 2003; Sanchez e Demain, 2003; Furtado *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2002).

Dessa forma, a biossíntese de antibióticos e demais compostos secundários por fungos endofíticos é um processo complexo, submetido a um sistema de regulação eficiente influenciado por fatores ambientais bióticos e abióticos, bem como, pela composição nutricional do meio (Palkova, 2004; Melentiades *et al.*, 2000; Furtado, 2002), que são fatores que devem ser considerados na otimização dos meios fermentativos por interferirem na fisiologia e bioquímica do fungo, no crescimento e na produção de esporos (Mello *et al.*, 2004).

Os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não estão muito claros. Sabe-se, no entanto, que existem proteínas que regulam a biossíntese de metabólitos secundários de acordo com as condições ambientais (Calvo *et al.*, 2002). E podem refletir nas diferenças encontradas na produção de metabólitos secundários quando fungos são submetidos ao crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono, nitrogênio, temperatura e valores de pH (Keller *et al.*, 2005).

Portanto, na formulação de meios de cultura, as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo exercem papel fundamental na produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos (Adrio e Demain, 2003; Sanchez e Demain, 2002; Furtado *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2002).

Além desses fatores, o tempo de cultivo, pH, temperatura, aeração, concentração de substrato e de inóculo influenciam os processos de síntese de substâncias de interesse (Gaden, 2000).

Novas metodologias de produção, seleção de substratos de simples composição e baixo custo, além do conhecimento das condições adequadas de cultivo, são fatores relevantes para a utilização de fungos, em larga escala, biossintetizantes de metabólitos secundários de interesse para a medicina e agricultura.

Com a crescente expansão das atividades agroindustriais, grandes quantidades de resíduos são geradas anualmente em todo o mundo (Sanchez, 2009). E a utilização desses resíduos como fonte de carbono para o crescimento de fungos através da fermentação em estado sólido, tem sido relatada em vários trabalhos, como forma de reduzir significativamente o custo do processo.

Estudos como esses são de extrema relevância, especialmente, no Brasil que é um país de grande atividade agrícola e, conseqüentemente, grande gerador de resíduos agroindustriais, que nem sempre costumam ter aproveitamento econômico e podem ser adquiridos a baixo custo ou custo zero.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar a eficiência da utilização de resíduos agroindustriais como meios de cultivo alternativos de baixo custo para fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Plantago major* (língua de vaca), visando à produção de esporos e de metabólitos secundários bioativos.

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI), Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Origem e Manutenção dos Fungos

Foram utilizados 16 fungos endofíticos os quais foram isolados de raízes, pecíolos, sementes e folhas da planta *Plantago major* (língua de vaca), conforme a

tabela 1, apresentando bioatividade comprovada frente a micro-organismos de importância médica e agrícola. Uma vez depositados na Coleção de Culturas URM (Universidade Recife Micologia), Brasil, os mesmos foram mantidos em meio de cultura sólido Batata Dextrose Ágar (BDA), armazenados a 4°C e repicados mensalmente para a manutenção das culturas.

Tabela 1. Relação dos fungos endofíticos bioativos da planta *Plantago major* utilizados no experimento.

Fungo Endofítico	Tecido Vegetal de Isolamento
<i>Curvularia lunata</i>	Folha
<i>Curvularia lunata</i>	Semente
<i>Fusarium lateritium</i>	Pecíolo
<i>Fusarium lateritium</i>	Semente
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pecíolo
<i>Fusarium oxysporum</i>	Semente
<i>Gliocladium virens</i>	Raiz
<i>Gliocladium virens</i>	Folha
<i>Glomerella cingulata</i>	Raiz
<i>Glomerella cingulata</i>	Folha
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Pecíolo
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	Folha
<i>Phomopsis archeri</i>	Pecíolo
<i>Phomopsis archeri</i>	Folha
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Raiz
<i>Trichoderma pilluliferum</i>	Pecíolo

Ensaio Fermentativo: Visando à Produção de Esporos e de Metabólitos Bioativos

Os fungos foram crescidos em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA a temperatura de 30°C por 5 dias. Após este período, 5 blocos de gelose (Ø6 mm) de cada cultura foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50g de grãos de arroz ou de cada resíduo agroindustrial (cascas de maracujá, cascas de abacaxi, cascas de tomate, bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar), além de 10mL de água destilada em cada frasco. Esses meios foram autoclavados duas vezes (em dias alternados) à temperatura de 121°C, por 20 minutos. Os meios inoculados com os endofíticos foram incubados de modo estático por 20 dias a 30°C ($\pm 2^\circ$) (Aly *et al.*, 2008). O ensaio foi realizado em duplicata.

Obtenção dos Extratos Brutos dos Fungos Endofíticos

Após o período de 20 dias de cultivo, foram retirados 1g de cada produto fermentado (substrato + fungo) aos quais foi adicionado 9 mL de solução salina + Tween 80 (1:1v/v) e vigorosamente agitados em agitador elétrico de tubos para remoção dos conídios, sendo em seguida filtrado em tecido *voil* para remoção do substrato. As suspensões preparadas foram agitadas vigorosamente e o número de esporos determinado com auxílio de câmara de Neubauer.

Em seguida, a cada cultivo existente em frascos de Erlenmeyer foram adicionados 100 mL de acetato de etila. O sistema foi macerado com auxílio de um bastão de vidro e agitado manualmente por 5 minutos e deixado em repouso por 1 dia.

Em seguida, procedeu-se à separação do solvente extrator do meio de cultura mediante filtração e, mais uma vez, foi adicionado 100 mL de acetato de etila aos cultivos, que foram novamente macerados, agitados manualmente por 5 minutos e deixado em repouso por mais 1 dia. Transcorrido esse tempo foi realizada nova filtração dos cultivos macerados. Os dois filtrados foram reunidos e o solvente foi evaporado em rotaevaporador, fornecendo os extratos brutos.

Utilizando as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente, também foi obtido o extrato bruto do arroz e de cada um dos resíduos agroindustriais sem a inoculação dos micélios (controle negativo), com o objetivo de realizar uma comparação a fim de identificar possíveis interferentes do meio extraído com acetato de etila.

Os extratos obtidos por meio do rotaevaporador foram guardados em dessecador até obtenção de peso constante.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Acetoetílicos

(Método de Difusão em Disco de Papel)

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos metabólicos dos fungos endofíticos produzidos em cada substrato foi realizada pela metodologia de difusão em discos de papel estabelecida pelo National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Discos de papel com aproximadamente 6 mm de diâmetro impregnados com 20µL dos extratos brutos ressuspensos em acetato de etila foram depositados nas superfícies das placas de Petri, contendo o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton e BDA previamente semeados com a suspensão dos esporos dos micro-organismos teste bactérias e fungos, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C por 24/48 horas,

no caso de bactérias; e a 30°C por 48-120 horas, no caso de fungos. A avaliação foi realizada mediante medição dos halos de inibição após esse período, onde os diâmetros dos halos mensurados foram expressos em milímetros. As provas foram realizadas em triplicata.

Os micro-organismos teste utilizados para o ensaio foram as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (patogênicas ao homem); e os fungos *Candida albicans* (UFPEDA 1017) (patógeno humano) e *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* (URM 5283) e *Colletotrichum acutatum* (URM 5565) (fungos fitopatogênicos).

O perfil de susceptibilidade dos micro-organismos teste foi determinado através de um antibiograma com os seguintes discos dos antibióticos de referência para bactérias e para fungos: tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg) e gentamicina (10µg) para bactérias; e cetoconazol e miconazol para fungos. Como controle negativo foi utilizado o extrato bruto do meio sem a inoculação dos micro-organismos. E como controle do solvente, o acetato de etila. As provas foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

Ensaio Fermentativo: Produção de Esporos

Examinando-se os dados contidos na tabela 2, verificou-se que o tipo de substrato influenciou a produção de esporos pelos fungos endofíticos. Observou-se ainda que os grãos de arroz e resíduos de maracujá foram os substratos que mais favoreceram o crescimento e produção de esporos para todos os isolados testados e os fungos que apresentaram maior produção de esporos nesses substratos foram *Fusarium oxysporum*, *Fusarium lateritium* e *Pestalotiopsis maculans*. Enquanto que os substratos abacaxi e laranja inibiram o crescimento dos fungos.

Tabela 2. Produção de esporos por fungos endofíticos em diferentes substratos: grãos de arroz, cascas de maracujá, resíduos de abacaxi, bagaço de laranja, cascas de tomate e bagaço de cana-de-açúcar.

Fungo Endofítico	Produção de Esporos (Número de esporos x 10 ⁷ g ⁻¹) por Substrato					
	Arroz	Maracujá	Abacaxi	Laranja	Tomate	Cana-de-açúcar
<i>Curvularia lunata</i> (folha)	4,45	4,46	nc	Nc	3,21	2,97
<i>Curvularia lunata</i> (semente)	4,45	4,43	nc	Nc	3,20	2,95
<i>Fusarium lateritium</i> (pecíolo)	5,00	4,97	nc	1,20	3,00	3,00
<i>Fusarium lateritium</i> (semente)	5,02	5,00	nc	1,23	3,00	3,00
<i>Fusarium oxysporum</i> (pecíolo)	5,01	5,00	nc	Nc	3,23	2,95
<i>Fusarium oxysporum</i> (semente)	5,00	5,00	nc	Nc	3,20	2,95
<i>Gliocladium virens</i> (raiz)	4,40	4,39	2,89	1,04	2,30	3,01
<i>Gliocladium virens</i> (folha)	4,35	4,40	2,90	1,06	2,33	3,01
<i>Glomerella cingulata</i> (raiz)	4,00	4,00	nc	Nc	3,01	2,20
<i>Glomerella cingulata</i> (folha)	4,00	4,00	nc	Nc	3,11	2,22
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (pecíolo)	4,75	4,76	nc	Nc	2,20	2,00
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (folha)	4,76	4,74	nc	Nc	2,22	2,00
<i>Phomopsis archeri</i> (pecíolo)	1,42	1,40	nc	Nc	1,10	1,05
<i>Phomopsis archeri</i> (folha)	1,43	1,37	nc	Nc	1,11	1,05
<i>Trichoderma pilluliferum</i> (raiz)	3,27	3,40	1,02	1,30	2,01	3,32
<i>Trichoderma pilluliferum</i> (pecíolo)	3,26	3,30	1,03	1,32	2,01	3,30

Médias de três repetições. Nc= não houve crescimento e esporulação do fungo.

Segundo estudos, extratos de laranja podem apresentar compostos fenólicos com propriedade antifúngica que inibem o crescimento de alguns fungos como *Aspergillus flavus* e *Candida* (Oliveira *et al.* 2007; Cavalcanti *et al.*, 2012). Quanto ao abacaxi, na literatura existe apenas relatos de extratos de abacaxi com efeito inibitório contra bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella sonnei* e *Streptococcus sanguis* (Khosropanah *et al.*, 2012; Bansode e Chavan, 2013). No entanto, tanto laranja quanto abacaxi são frequentemente susceptíveis ao ataque de fungos como *Fusarium* spp., *Sphaceloma* spp., *Phomopsis* spp. e *Guinardia* spp., dentre outros, que provocam diversas doenças (Matos e Cabral, 2005; Azevedo, 2013).

Dentre os fungos submetidos ao ensaio fermentativo em meio sólido, todos cresceram nos meios arroz, maracujá, tomate e cana-de açúcar e por meio da confecção de lâminas após 10 dias de incubação e, consequentemente, observações ao microscópio, tornou-se possível verificar que os mesmos apresentaram, em todos esses meios, as mesmas estruturas somáticas e reprodutivas que exibem caracteristicamente em meio de rotina BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Do ponto de vista da produção comercial de fungos, a esporulação é um aspecto importante a ser considerado na seleção dos meios. Apesar do arroz ainda ser o substrato mais utilizado na produção de fungos em larga escala, outros produtos como

farelo de trigo, palha de trigo, bagaço de mandioca, farinha de soja, palha de milho, sabugo de milho triturado e cascas de café vêm sendo testados, na expectativa de otimizar o processo (Pandey *et al.*, 2000; Betini *et al.*, 2009; Pal e Khanum, 2010; Facchini *et al.*, 2011). Segundo Alves e Pereira (1998), o uso de meios sólidos representa a forma mais comum de produção de fungos, uma vez que não necessita de tecnologia aprimorada e permite a produção direta de unidades reprodutivas. Já El Damir (2006) destacou que o tipo de substrato é importante para a produção massal de fungos, uma vez que está diretamente relacionado com os custos e a qualidade dos esporos produzidos.

Na busca por substratos alternativos, avaliando a influência de substratos naturais sólidos na esporulação de isolados de *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*, Ibrahim e Low (1993) observaram que a esporulação foi maior em meios contendo arroz, farinha de tapioca e batata doce, do que em meios contendo coco ralado e mamão papaia. E Penariol *et al.* (2008) avaliaram diferentes substratos sólidos para produção de *Beauveria euphorbiae*, obtendo melhores resultados em meios contendo casca de soja e sorgo em grão.

Atividade Antimicrobiana dos Extratos dos Fungos Endofíticos

A partir dos filtrados (líquidos metabólicos) obtidos dos cultivos dos fungos em meios sólidos (grãos de arroz, cascas de maracujá, resíduos de abacaxi, bagaço de laranja, cascas de tomate e bagaço de cana-de-açúcar) foram obtidos 96 extratos brutos dos fungos, sendo 16 extratos para cada substrato.

Dos 16 fungos cultivados em grãos de arroz e em resíduo de maracujá, todos exibiram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados, com halos de inibição que variaram de 10 a 19mm para meio arroz, e de 10 a 18mm em meio maracujá (Tabela 3 e 4), demonstrando que estes dois meios são promissores para estimular a produção de compostos bioativos por estes fungos endofíticos (Figura 1 e 2). Os meios abacaxi e laranja não favoreceram o desenvolvimento dos fungos. E os substratos tomate e cana-de-açúcar embora tenham favorecido o crescimento dos fungos não favoreceram a produção de metabólitos antimicrobianos.

Dentre os endofíticos testados, *Pestalotiopsis maculans* foi o que apresentou maior potencial bioativo frente aos micro-organismos testados. Fungos desse gênero são comumente descritos como produtores de compostos bioativos (Strobel *et al.* 2002; Gomes-Figueiredo *et al.* 2007).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos de *Plantago major* cultivados em diferentes substratos sólidos (grãos de arroz, cascas de maracujá, resíduos de abacaxi) frente a micro-organismos de importância médica e agrícola.

	Halos de Inibição (mm) em Diferentes Substratos																		
	Arroz							Maracujá							Abacaxi				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Curvularia lunata</i> (raiz)	11	11	12	-	11	-	-	10	10	11	-	11	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curvularia lunata</i> (pecíolo)	11	11	12	-	11	-	-	10	10	11	-	11	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium lateritium</i> (semente)	11	11	14	-	10	10	-	11	11	13	-	10	10	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium lateritium</i> (folha)	11	12	14	-	11	10	-	11	11	13	-	11	10	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (semente)	10	14	13	-	10	11	11	10	12	13	-	11	10	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (folha)	10	13	13	-	10	11	11	10	12	13	-	11	10	-	-	-	-	-	-
<i>Gliocladium virens</i> (pecíolo)	10	10	10	-	11	-	-	10	10	10	-	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gliocladium virens</i> (folha)	10	10	10	-	11	-	-	10	10	10	-	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomerella cingulata</i> (pecíolo)	-	-	13	-	12	-	-	-	-	12	-	11	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomerella cingulata</i> (folha)	-	-	13	-	12	-	-	-	-	11	-	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (semente)	13	15	14	10	18	-	-	12	13	12	10	17	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (folha)	13	15	13	10	19	-	-	12	13	12	10	18	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i> (pecíolo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i> (folha)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i> (raiz)	11	11	11	-	12	-	-	10	11	10	11	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i> (pecíolo)	11	11	11	-	12	-	-	10	11	10	11	-	-	-	-	-	-	-	-

Média de três repetições.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos de *Plantago major* cultivados em diferentes substratos sólidos (bagaço de laranja, cascas de tomate, bagaço de cana-de-açúcar) frente a micro-organismos de importância médica e agrícola.

	Halos de Inibição (mm) em Diferentes Substratos																				
	Laranja							Tomate							Cana-de-açúcar						
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. acutatum</i>
<i>Curvularia lunata</i> (raiz)	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-	11	10	-	-	-	-	-
<i>Curvularia lunata</i> (pecíolo)	-	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-
<i>Fusarium lateritium</i> (semente)	-	-	-	-	-	-	-	11	11	-	-	-	-	-	11	11	-	-	-	-	-
<i>Fusarium lateritium</i> (folha)	-	-	-	-	-	-	-	11	11	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (semente)	-	-	-	-	-	-	-	10	11	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (folha)	-	-	-	-	-	-	-	10	11	-	-	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-
<i>Glomerella virens</i> (pecíolo)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomerella virens</i> (folha)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomerella cingulata</i> (pecíolo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomerella cingulata</i> (pecíolo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (semente)	-	-	-	-	-	-	-	11	12	-	-	-	-	-	12	12	-	-	-	-	-
<i>Pestalotiopsis maculans</i> (folha)	-	-	-	-	-	-	-	11	12	-	-	-	-	-	12	12	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i> (pecíolo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phomopsis archeri</i> (folha)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i> (raiz)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma pilluliferum</i> (pecíolo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Média de três repetições.

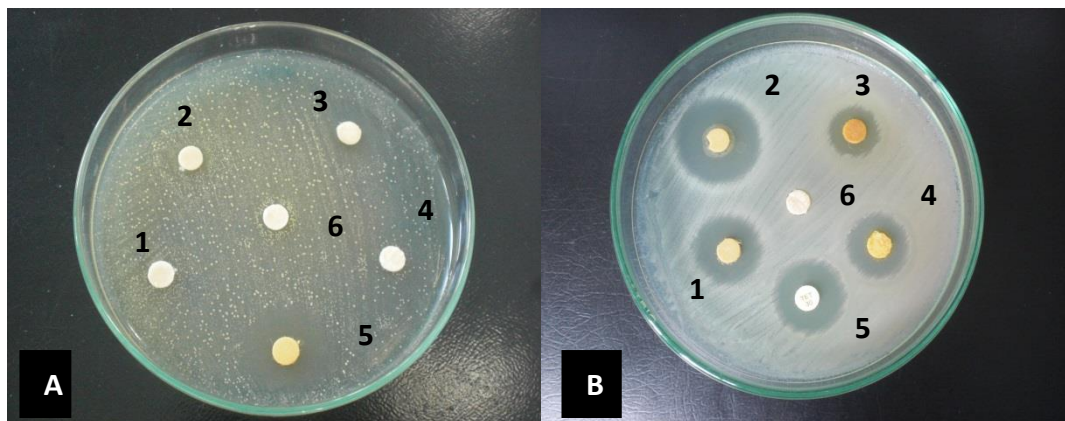


Figura 1. Halos de inibição dos extratos brutos acetoeéticos dos fungos endofíticos cultivados em meio arroz frente a bactérias de importância médica. **A:** *Staphylococcus aureus* 1- *Phomopsis archeri*; 2- *Trichoderma piluliferum*; 3- *Fusarium lateritium*; 4- Controle do solvente acetato de etila; 5: Controle positivo (cloranfenicol); 6: extrato de arroz controle negativo. **B:** *Bacillus subtilis* 1- *Trichoderma piluliferum*; 2- *Pestalotiopsis maculans*; 3- *Fusarium lateritium*; 4- *Fusarium oxysporum*; 5: Controle positivo (tetraciclina); 6: extrato de arroz controle negativo.

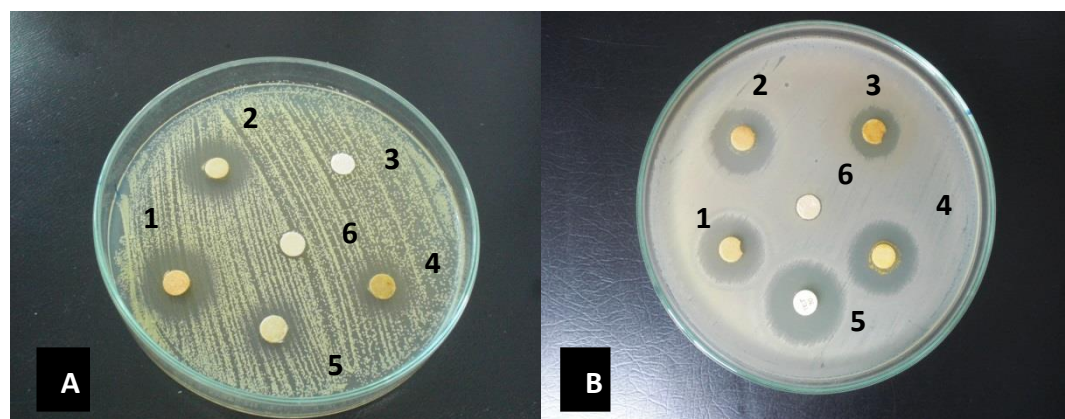


Figura 2. Halos de inibição dos extratos brutos acetoeéticos dos fungos endofíticos cultivados em meio maracujá frente a bactérias de importância médica. **A:** *Staphylococcus aureus* 1- *Pestalotiopsis maculans*; 2- Controle positivo (cloranfenicol); 3- Controle do solvente, acetato de etila; 4- *Curvularia lunata*; 5: *Fusarium. oxysporum*; 6: extrato de maracujá como controle negativo. **B:** *B. subtilis* 1- *Fusarium oxysporum*; 2- *Fusarium lateritium*; 3- *Curvularia lunata*; 4- *Pestalotiopsis maculans*; 5: Controle positivo (tetraciclina); 6: extrato de maracujá como controle negativo.

O período de 20 dias de incubação foi satisfatório para a produção de compostos bioativos dos fungos, já que a produção de metabólitos secundários (que são os responsáveis pela atividade biológica) ocorre, geralmente, na fase de crescimento estacionário dos micro-organismos (Carlile *et al.*, 2001; Berdy, 2005; Demain, 1999).

Na análise comparativa dos dados obtidos entre a atividade antimicrobiana e meio de cultura utilizado, pode-se notar a produção satisfatória de compostos antimicrobianos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos, dependendo de cada isolado fúngico e do meio de cultura utilizados. Estes resultados estão em concordância ao afirmado por Demain (1999); Demain (2006) e Frisvald *et al.* (2008), os quais sugerem que uma produção satisfatória de metabólitos secundários bioativos depende muito do meio de cultura onde o fungo é cultivado.

Como alternativa de baixo custo para o cultivo dos fungos endofíticos da planta língua de vaca, visando à obtenção de conídios e compostos bioativos, além do meio arroz que é utilizado tradicionalmente para cultivo de fungos em larga escala, o meio com o resíduo de maracujá aparece como promissor.

Referências

- Adrio JL, Demain AL (2003) Fungal biotechnology. *International Microbiology* 6: 191-199.
- Alves SB, Pereira RM (1998) Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2 ed. Piracicaba: Esalq, p.845-869.
- Berdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. A personal view. *J Antibiot* 58: 1-26.
- Betini JHA, Michelin M, Peixoto-Nogueira SC, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM (2009) Xylanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst Eng* 32: 819-824.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 447-459.
- Carlile M, Watkinson S, Gooday G. (2001) *The Fungi*, 2.ed. Hungary, Elsevier.
- Cavalcanti YW, Pérez ALL, Xavier GD, Almeida LFD, Padilha WVN (2012) Atividade antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 16: 43-48.

- Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 52:455-463.
- El Damir M (2006) Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Sciences* 6: 269-274.
- Facchini FD, Vici AC, JorgeJA, Terenzi HF, Reis RA, Polozeli MLTM (2011) Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* Co3 using agro-industrial residues with potencial application as additives in animal feed. *Bioprocess Biosyst Eng* 34: 347-355.
- Freitas AG, Costa V, Farias ET, Lima MCA, Souza MCA, Ximenes EA (2002) Atividade estafilocócica do *Plantago major* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12: 64-65.
- Frisvad JC, Andersen B, Thrane U (2008) The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research* 112: 231-240.
- Furtado NAJC, Saide S, Ito IY, Bastos JK (2002) The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. *Microbiological Research* 157: 207-211.
- Gaden ELJr (2000) Fermentation process kinetics. Reprinted from *Journal of Biochemical Microbiological Technology and Engineering* 1: 413-129. *Biotechnology and bioengineering* 67: 629-635.
- Gomes-Figueiredo J, Pimentel IC, Vicente VA, Pie MP, Kava-Cordeiro V, Galli-Terasawa L, Pereira JO, Souza AQL, Glienke C (2007) Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial proprieties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 1123-1132.
- Gond SK, Mishra A, Sharma VK, Verma SK, Kumar J, Kharwar RN, Kumar A (2010) Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycosc.* DOI: 10.1007/s10267-011-0146-z.
- Harborne JB, Tomas-Barberan FA (1991) *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. 1ª ed. Oxford, Claredon Press.
- Ibrahim YB, Low W (1993) Potencial of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. *International Journal of Pest Management* 39: 288-292.

- Ichikawa T, Date M, Ishikura T, Ozaki A (1971) Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* 16:218-224.
- Keller NP, Turner G, Bennett J (2005) Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3: 937-947.
- Matos AP, Cabral JR (2005) Manejo integrado de fusariose do abacaxizeiro. Cruz das almas: Embrapa-CNPMPF, 2p.
- Melentiades J, Meis JFGM, Mouton JW, Verweij PE (2000) Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology* 1: 478-484.
- Mello AFSM, Machado ACZ, Bedendo IP (2004) Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures and light regimes. *Scientia Agricola* 6: 542-544.
- Natori S, Ikekawa N, Zuzuki M. (1981) *Advances in Natural Products Chemistry*. 1ª ed. New York, John Wiley & Sons.
- Nosov AM (1994) “Functions of Plant Secondary Metabolites in vivo and in vitro”. *Russian Journal of Plant Physiology* 41: 767-771.
- Oliveira MS, Dors GC, Souza-Soares LA, Badiale-Furlong E (2007) Atividade Antioxidante e Antifúngica de Extratos Vegetais. *Alim. Nutri.* 18: 267-275.
- Pal A, Khanum F (2010) Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-05 through solid-state-fermentation. *Bioresour Technol* 101: 7563-7569.
- Palkova Z (2004) Multicelular microorganism: laboratory versus nature. *EMBO Reports* 5: 470-476.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000) New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35: 1153-1169.
- Penariol MC, Monteiro AC, Pitelli RA, Pereira GT (2008) Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. *Bragantia* 67: 805-814.
- Sanchez S, Demain A (2002) Metabolic of fermentation processes. *Enzyme and Microbiol Technology* 31: 895-906.
- Strobel GA (2002) Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 315-333.

Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS (2009) Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23: 9-19.

5. CONCLUSÕES

- Nas condições de estudo, verificou-se que a comunidade de fungos endofíticos associada a raízes, pecíolos, sementes e folhas é composta por um total de 15 gêneros de fungos endofíticos cultiváveis;
- Independentemente dos órgãos da planta, os períodos (de estiagem e chuvoso) e os locais de coleta, não influenciaram a composição de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Plantago major*;
- Dentre os órgãos de *P. major* analisados, folhas e pecíolos apresentaram maior colonização e diversidade de fungos endofíticos. E em ambos os órgãos, a frequência de colonização foi maior durante o período chuvoso e na horta de plantas medicinais do setor de fitoterápicos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA);
- As espécies mais frequentemente isoladas foram *Phoma eupyrena*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporium* e *Pestalotiopsis maculans*;
- A maioria dos fungos endofíticos isolados de *P. major* produziram metabólitos antimicrobianos contra bactérias e fungos de importância médica e agrícola, demonstrando potencial para utilização na indústria farmacêutica e na agricultura;
- Os extratos obtidos de amostras frescas e secas de pecíolos, raízes, sementes e folhas apresentaram atividade antimicrobiana contra micro-organismos de importância médica: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*;
- Grãos de arroz e resíduo agroindustrial de maracujá mostraram-se eficientes como meios de cultivo alternativos de baixo custo para fungos endofíticos, visando à produção de esporos e de metabólitos secundários bioativos;
- *Pestalotiopsis maculans* foi o fungo que apresentou maior potencial bioativo frente aos micro-organismos testados, seja em meio líquido (Caldo de Batata Dextrose) ou em meio sólido (grãos de arroz e resíduo de maracujá).