

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos  
endofíticos associados à *Araucaria angustifolia*  
(Bertol.) O., Kuntze.**

Mirna Giselle Moreira

**Ouro Preto**

**2013**

**Mirna Giselle Moreira**

**Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos  
endofíticos associados à *Araucaria angustifolia*  
(Bertol.) O., Kuntze.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à saúde humana e animal.

Linha de pesquisa: Bioprospecção de fungos

Orientador: Luiz Henrique Rosa

Co-orientador: Carlos Augusto Rosa

Ouro Preto, Minas Gerais

2013

**M838D MOREIRA, MIRNA GISELLE.**

Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze [manuscrito] / Mirna Giselle Moreira. - 2013.

xii, 71f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa.

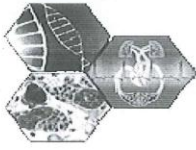
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Processos e ao Tratamento de Doenças.

1. Biotecnologia - Teses. 2. Fungos - Teses. 3. Antibióticos - Teses. 4. Microbiologia - Teses. 5. Biodiversidade - Teses. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 582.28:582.473

Catlogação: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)





**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**


**“Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à  
*Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze”**

Aos vinte dias do mês de março de 2013, às 14h00min, na Sala de Seminários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Mirna Giselle Moreira**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por .....aprovada..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Betânia Barros Cota  
Examinadora (FIOCRUZ)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva  
Examinadora (UFOP)

DATA DA DEFESA: 20/03/2013

## **AGRADECIMENTOS**

*Ousei sonhar e hoje estou aqui!!!*

Hoje se finda um ciclo em minha vida, que foi marcado por dedicação, renúncia, conquista, aprendizado e crescimento. Neste findar tenho muitos a agradecer, pois nesta caminhada não trilhei sozinha.

Agradeço ao amado de Minh'alma, "Deus", pois como um amigo fiel tem realizado os anseios do meu coração e só Ele sabe todas as montanhas que precisei ultrapassar para poder dizer; consegui!!

Ao meu pai Fernando, como é realizador poder ouvir de você que sou uma extensão viva dos teus sonhos, saber que minha realização pessoal é a sua também, te amo muito!!

A todas as conversas com minha mãe, "Maria José", no final de cada dia, te amo mãe, obrigada por estar presente sempre.

A todos os amigos feitos em meu tempo em Ouro Preto, especialmente a Cristina.

Ao Josino secretário da pós-graduação da UFOP, por sua gentileza e educação sempre prestada a mim.

A todos os professores e funcionários da UFMG que me receberam tão bem.

Ao meu orientador Luiz Henrique Rosa, mesmo estando longe sempre foi alguém presente, admiro por sua determinação e ousadia em conquistar seus ideais, é um exemplo para mim.

Ao meu co-orientador Carlos Augusto Rosa, obrigada por me fazer sentir parte da equipe e por me receber tão bem, por todo o apoio cedido a mim sempre que solicitado, sou grata a você professor!!

A todos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade de fungos da UFMG, somos verdadeiramente uma equipe que sabe trabalhar coesa.

A Alice, bahiana te admiro demais, obrigada pelo ombro amigo, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

A Barbara Muniz, foi a primeira com quem dividi a fluxo laminar, agregado a isso veio a amizade, obrigada pela companhia, ajuda pelas risadas que não foram poucas, torço muito por você e sabe disso.

A Mari Zé, obrigada pela ajuda sempre presente, pelo conhecimento cedido e pela amizade.

Ao Antônio, sou eternamente grata pelo empenho e generosidade, dicas preciosas, pela coleta e acima de tudo pela amizade.

A todas as meninas do Lab. Ana Raquel, Maroca, Mari Vieira, Té, Iara, Renata, Francine, Gabi, Priscila, Jordana, Vivi, a convivência e amizade de vocês fazem tudo valer a pena.

Isabel Sabino, sou grata por toda a ajuda nos momentos finais e tão decisivos, obrigada querida!!

A Camila Rodrigues, amiga mesmo longe sempre esteve tão perto, obrigada pela torcida, apoio, risadas, desabafos e todo encorajamento.

Aos meus amigos da célula, que em todo tempo sei que posso contar com vocês.

A Aninha e Fatinha, obrigada por abrirem a porta da casa de vocês e me receberem, agradeço a Deus todos os dias pela presença tão importante de vocês em minha vida.

## **RESUMO**

Fungos endofíticos são caracterizados por habitar, de forma assintomática, tecidos vegetais e estabelecer uma relação considerada mutualística com seus hospedeiros. Este grupo microbiano é reconhecido como uma valiosa fonte de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a comunidade de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia*, única gimnosperma endêmica do Brasil, e sua capacidade em produzir metabólitos com atividade antimicrobiana. Para este estudo, 30 espécimes de *A. angustifolia* foram coletados em Campos de Altitude do estado de Minas Gerais. Folhas e caules de *A. angustifolia* foram desinfestados superficialmente e inoculados no meio Agar Batata Dextrosado (BDA) para o isolamento de fungos endofíticos. Após o processo de isolamento, 316 isolados fúngicos foram obtidos; destes, 204 das obtidos das folhas e 112 dos caules, os quais foram agrupados em 140 morfotipos distintos pelo perfil eletroforético dos produtos de PCR amplificados com o iniciador (GTG)<sub>5</sub>. Um isolado de cada morfotipo foi selecionado para sequenciamento da região ITS do gene do rDNA e identificados como espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Biscogniauxia*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaphorte*, *Mucor*, *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Pezizula*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Preussia*, *Trichoderma* e *Xylaria*. Os táxons mais frequentes foram *Pestalotiopsis* sp. e *Xylaria* sp. Por outro lado, *Mucor circinelloides*, *Neurospora tetrasperma*, *Phomopsis chimonanthi*, *Botryosphaeria* sp. e *Biscogniauxia* sp. foram identificados como táxons minoritários dentro da comunidade. A comunidade de fungos endofíticos de *A. angustifolia* apresentou elevados valores de diversidade (Fisher- $\alpha$  = 24,01), riqueza (Margalef's = 8,42) e dominância (Simpson's = 0,9). Além disso, a curva de rarefação de espécies (Mao Tao), que não atingiu uma assíntota, o que sugere que o número amostral não conseguiu cobrir toda a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados à *A. angustifolia*. Todos os isolados obtidos foram cultivados e seus respectivos extratos obtidos, os quais foram avaliados contra os micro-organismos alvos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. krusei* e *Cladosporium sphaerospermum*. Vinte e cinco extratos foram ativos contra pelo menos um dos micro-organismos alvos, destes, 21 demonstraram atividade antifúngica seletiva e 4 de amplo espectro. Dentre os extratos vegetais obtidos das folhas e fragmentos de caules, 24 apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli* e 1 extrato (obtido dos fragmentos de caules) demonstrou atividade antifúngica contra o

*C. sphaerospermum*. O extrato do endófito *Pezicula eucrita* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 62,5 µg/ml contra *C. albicans*. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *A. angustifolia*, a única gimnosperma endêmica do Brasil, representa uma fonte promissora de diversidade de fungos tropicais. Além disso, algumas espécies endofíticas demonstraram capacidade de produzir metabólitos bioativos e podem ser fontes de moléculas protótipos para fármacos com atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

Endophytic fungi are characterized by inhabiting, asymptotically, plant tissues and establish a relationship with their hosts, usually called mutualistic. This microbial group is recognized as a valuable source of secondary metabolites with different biological activities. This study aimed to characterize the community of endophytic fungi associated with *Araucaria angustifolia*, the only gymnosperm endemic in Brazil, and its ability to produce metabolites with antimicrobial activity. For this study, 30 specimens of *A. angustifolia* were collected in Campos de Altitude of the state of Minas Gerais. The leaves and stems of the *A. angustifolia* were superficially sterilized and inoculated in Potato Dextrose Agar (BDA) to isolate the endophytic fungi. After the isolation procedure, 316 fungal isolates were obtained. From those, 204 obtained from the leaves of and 112 from the stems, which were grouped into 140 morphotypes, distinct by electrophoretic pattern of the PCR products amplified with primer (GTG)<sub>5</sub>. An isolate of each morphotype was selected to sequenciate the ITS region of the rDNA gene and identified as species belonging to the genera *Aspergillus*, *Biscogniauxia*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaphorte*, *Mucor*, *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Pezicula*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Preussia*, *Trichoderma* and *Xylaria*. The most common taxa were *Pestalotiopsis* sp. and *Xylaria* sp. In other hand, *Mucor circinelloides*, *Neurospora tetrasperma*, *Phomopsis chimonanthi*, *Botryosphaeria* sp. and *Biscogniauxia* sp. were identified as minority táxons within the community. The community of endophytic fungi of *A. angustifolia* presented high values of diversity (Fisher- $\alpha$  = 24.01), richness (Margalef's = 8.42) and dominance (Simpson's = 0.9). Moreover, the rarefaction species curve (Mao Tao), which did not reach an asymptote, suggesting that the sample size could not cover the entire range of the community associated with endophytes *A. angustifolia*. All isolates were cultured and their extracts, which were evaluated against the target micro-organisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. krusei* and *Cladosporium sphaerospermum*. Twenty-five extracts were active against at least one of the target micro-organisms, from these, 21 showed selective antifungal activity and 4 of wide spectrum. Among the plant extracts obtained from leaves and stems fragments, 24 showed antibacterial activity against *E. coli* and 1 extract (obtained from stems fragments) showed antifungal activity against *C. sphaerospermum*. The extract of the fungus *Pezicula eucrita* displayed minimal inhibitory concentration (MIC) values of 62.5 mg/ml against *C. albicans*. The results of this study show that *A. angustifolia*, the only gymnosperm endemic to Brazil, is a promising source of diversity of tropical fungi. Furthermore, some species within the

endophytic community showed the potential to produce bioactive metabolites and can be considered source of prototype molecules for drugs with antimicrobial activity.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
1. REVISÃO DA LITERATURA .....	164
1.1. MICRO-ORGANISMOS ENDOFITICOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.4
1.2. FONTES DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS .....	16
1.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS: FONTES DE MOLECULAS ANTIMICROBIANAS.....	18
1.4. ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA: ÚNICA GIMNOSPERMA ENDEMICA DO BRASIL .....	25
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. OBJETIVOS GERAIS .....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. COLETA DAS AMOSTRAS VEGETAIS .....	29
3.2. ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS.....	29
3.3. CRESCIMENTO MICÉLIAL PARA EXTRAÇÃO DE DNA .....	30
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS .....	30
3.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	30
3.4.2. PCR COM INICIADOR (GTG) <sup>5</sup> .....	31
3.4.3. OBTENÇÃO DOS AMPLICONS .....	31
3.4.4. PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS.....	32
3.4.5. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....	32
3.4.6. PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO .....	32
3.4.7. ANÁLISE COMPUTACIONAL DAS SEQUÊNCIAS .....	33
3.5. PREPARO DOS EXTRATOS.....	34
3.5.1. PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS .....	34
3.5.2. CULTIVO DOS FUNGOS E PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS.....	34
3.6. ENSAIO BIOLÓGICO .....	34
3.6.1. PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS.....	35
3.6.2. ENSAIO DE TRIAGEM.....	35
3.7. DIVERSIDADE DA COMUNIDADE FÚNGICA: CÁLCULO DOS ÍNDICES DE ABUNDÂNCIA, RIQUEZA E DOMINÂNCIA .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.1. COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	38
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS .....	40
4.3. CULTIVO, PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	49
5. CONCLUSÃO .....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA: Agar Dextrose Batata

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CI: Concentração Inibitória

CI<sub>50</sub>: Concentração Inibitória a 50%

cm: centímetro

CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

g: grama

g/L: grama por litro

GPS: *Global Positioning System*

h: Hora

H<sub>2</sub>O: água

HCl: Ácido clorídrico

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

INCA: Instituto Nacional de Câncer

ITS: Região transcrita interna

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Dihidrogenofosfato de potássio

KNO<sub>3</sub>: nitrato de potássio

LBEM: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular

m: metro

M: molar

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnésio

mg: miligrama

mg/mL: miligrama/mililitro

min: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar  
mol/L : mol por litro  
MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico  
µg: Micrograma  
µg/ml: micrograma/mililitro  
µl: Microlitro  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: dihidrogenofosfato de sódio  
NaCl: Cloreto de sódio  
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*  
ng: nanograma  
nm: Nanômetro  
OMS: Organização Mundial de Saúde  
PCR: Reação em cadeia da polimerase  
PEG: polietilenoglicol  
pH: potencial hidrogeniônico  
p.p.m: partes por milhão  
pmol: Pico mol  
p/v: peso por volume  
rDNA: DNA ribossomal  
rRNA: RNA ribossomal  
r.p.m.: Rotações por minuto  
s: Segundo  
S: sul  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
TBE: Tris borato  
U: Unidade  
UACC-62: Célula de melanoma  
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais  
UFMGCB: Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais  
UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto  
V: Volts  
W: oeste

‰: por cento

°C: graus Celsius

®: marca registrada

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Novas substâncias químicas entre 1981 a 2006 (*NEWMAN & CRAGG, 2007*).....17.
- Figura 2.** 5-hydroxiramulosin produzido pelo fungo endofítico *Phoma* sp.....19.
- Figura 3.** Exemplos de amostras da *Araucaria angustifolia* em (A) folhas, (B) árvore adulta, (C) sementes conhecidas como pinhão e (D) cascas.....26.
- Figura 4.** Número de isolados de fungos endofíticos por indivíduo de *Araucaria angustifolia*.....39.
- Figura 5.** Árvore filogenética de *Aspergillus*.....45.
- Figura 6.** Árvore filogenética de *Mucor* e *Muscador*.....46.
- Figura 7.** Número de isolados fúngicos por gênero obtidos de folhas e cascas de *A. angustifolia*.....47.
- Figura 8.** Curva de acumulação de espécies (Mao Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia*.....51.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Alguns dos principais metabólitos secundários isolado de fungos endofíticos.....21.

**Tabela 2.** Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia*.....41.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos obtido de *Araucaria angustifolia*.....51.

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais obtidos da *A. angustifolia* .....53.



## ***1 Revisão da Literatura***

### ***1.1 Micro-organismo Endofíticos***

Desde a descoberta dos organismos endofíticos em 1904 por Darnel, vários pesquisadores os definiram de diferentes formas (STROBEL & DAISE, 2003). Mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou a diferença existente destes micro-organismos com patógenos de plantas (AZEVEDO, 1999). Desse modo supõe-se que diversas interações entre vegetais e seus endofíticos foram aprimoradas e estabelecidas ao longo dos anos, incluindo relações de especificidade entre estes micro-organismos e suas plantas hospedeiras (TAN & ZOU, 2001, STROBEL, 2003).

Os micro-organismos endofíticos incluem protistas (PETERES, 1991), insetos (FELLER, 1995), bactérias (KOBAYASCH & PALUMBO, 2000) e fungos (STONE et al., 2000), que podem passar parte ou todo o ciclo de vida colonizando os tecidos vivos de uma planta hospedeira sem, entretanto, causar sintomas aparentes de doenças ou efeitos negativos (WILSON, 1995; BACOVEWHITE, 2000; TAN & ZOU, 2001; STROBEL & DAISE, 2003; SCHULZ & BOYLE, 2005). Existem trabalhos que demonstram a presença destes micro-organismos em plantas pertencentes aos grupos pteridófitas (PETRINI et al., 1992); angiospermas (SANTOS et al., 2008); briófitas (U'REN et al., 2011) e gimnospermas (SOCA-CHAFZE et al., 2011). Os micro-organismos endofíticos se diferem dos fitopatogênicos e epifíticos; entretanto, esta diferença é meramente didática para alguns autores, uma vez que pode ocorrer sobreposição entre os grupos microbianos, o que dificulta sua separação. Embora os micro-organismos epifíticos sejam capazes de colonizar a superfície dos vegetais, muitos podem, eventualmente, penetrar nos tecidos da planta, permanecendo por certo período sem causar dano (AZEVEDO, 1999), caracterizando-os como endofíticos.

Em associação com os vegetais, os fungos endofíticos mostram-se ubíquos, uma vez que todas as plantas examinadas até o momento abrigam de uma a centenas de espécie (WANG et al., 2006; ARNOLD, 2007; RAKOTONIRIANA et al., 2007). Estima-se a ocorrência de cerca de 1,5 milhões de espécies endofíticas. Deste total, apenas 10% foram descobertos e discutidas até o momento e apenas 1% examinada quanto ao seu espectro de metabólitos secundários (GUO et al., 2008). Porém estudos recentes propõem uma nova estimativa de ocorrência de espécies fúngicas de aproximadamente 5,1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011).

Estima-se que a interação entre plantas e endofíticos teve início há centenas de milhares de anos, quando os vegetais surgiram no planeta, e existem evidências que confirmam esta associação planta/endofíticos por ter sido encontrado fragmentos miceliais destes micro-organismos em tecidos fossilizados (GUNATILAKA, 2005). Desse modo, supõe-se que as interações entre vegetais e seus endofíticos foram aprimoradas e estabelecidas ao longo dos anos, incluindo relações de especificidade entre estes micro-organismos e suas plantas hospedeiras (TAN & ZOU, 2001, STROBEL, 2003). A interação fungos endofíticos/planta hospedeira é tradicionalmente considerada uma relação mutualística, na qual o vegetal fornece nutrição ao endófito e este provê alguma forma de proteção e melhorias à planta (STONE et al., 2000; CASTILLO et al., 2007; BACKMANE et al., 2008). Os micro-organismos endofíticos se encontram na região do vegetal definida como endosfera, onde se estabelecem protegidos com vantagens competitivas sobre os micro-organismos presentes na rizosfera e filosfera. Na endosfera, os endófitos são favorecidos por condições ideais de nutriente, pH e umidade (PETRINI et al., 1992; SAIKKOMEN et al., 1998; STROBEL & DAISE, 2003; SELOSSE et al., 2004; GUNATILAKA, 2005; KOGEL et al., 2006; BACKMANN et al., 2008; LINAKOSKI et al., 2011).

Esta interação mutualística entre endofítico e planta hospedeira ainda pode exercer influência sobre a composição da comunidade vegetal, bem como a sucessão e ciclagem de nutrientes (DAVVITT et al., 2010). Os endófitos frequentemente induzem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, o que pode afetar o desempenho da planta sob diferentes estresses bióticos ou abióticos, tais como déficit hídrico, elevada salinidade e concentrações de metais no solo, resistência a ataques de insetos e herbívoros, tolerância à dessecação, proteção contra patógenos e ainda, estimular o crescimento do vegetal (RAKOTONIRIANA et al., 2007; BAYAT et al., 2009).

De acordo com Araújo et al. (2002), os endófitos estão associados aos mais diversos órgãos e tecidos vegetais, incluindo folhas, ramos, caules, raízes, estruturas florais (como pólen, ovário, anteras e estames). Normalmente, mais de uma espécie de fungo endofítico pode ser obtida dos mesmos tecidos de um único hospedeiro. Entretanto, a preferência pelo local de sua colonização pode ser um reflexo do conteúdo daquele tecido específico, uma vez que diferentes tecidos e órgãos vegetais podem representar microhabitats distintos (SANTOS et al., 2003). Alguns estudos

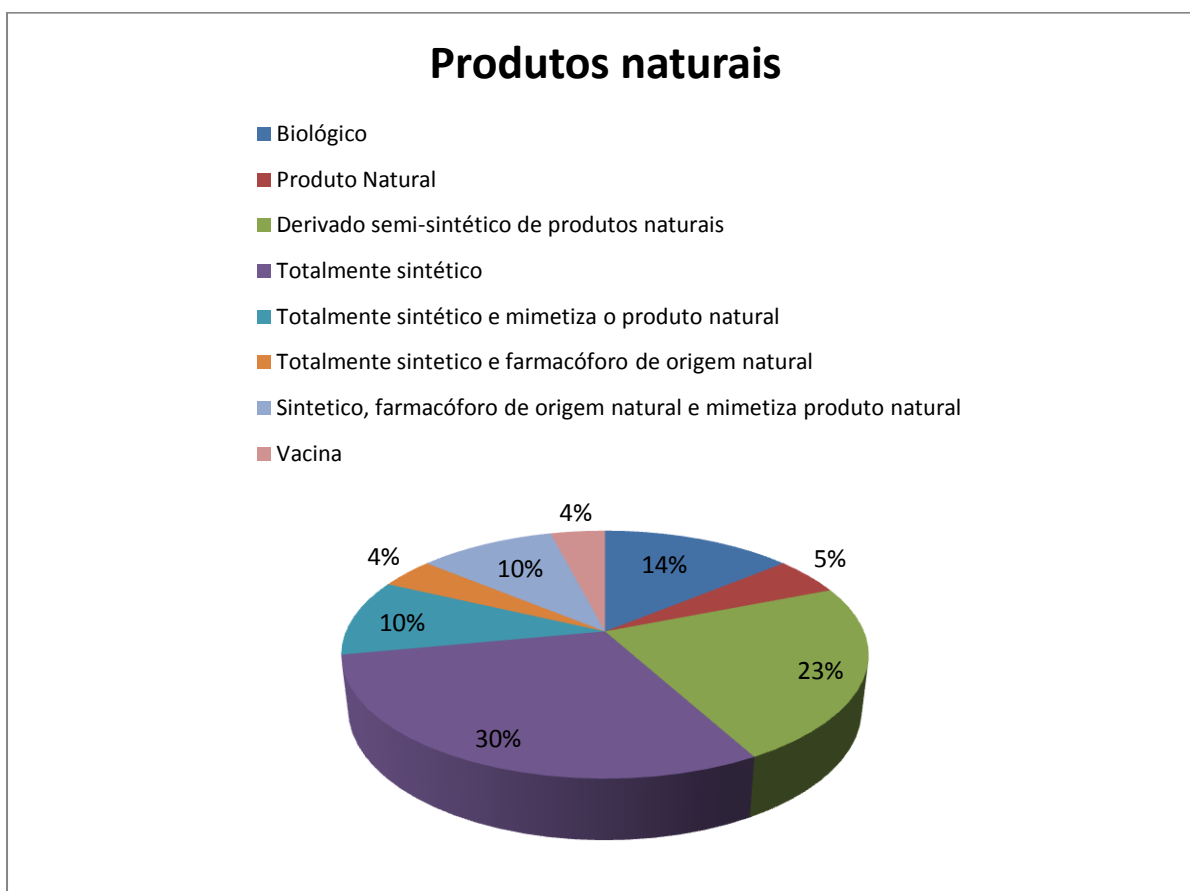
demonstraram as diversas funções ecológicas relacionadas aos endofíticos tais como a decomposição de tecidos vegetais mortos (KUMARESAN & SURYANARAYANAN, 2002; HYDE & SOYTONG, 2008; OSES et al., 2008), proteção do hospedeiro contra doenças (ARNOLD et al., 2007), atividade repelente contra insetos (AKELLO et al., 2007), aumento da tolerância a estresse abiótico (REDMAN et al., 2002; BAE et al., 2009) e produção de fito hormônios, toxinas enzimas e metabólitos bioativos.

## ***1.2 Fontes de substâncias bioativas***

Produtos naturais desempenham um importante papel no tratamento e prevenção de doenças humanas por milhares de anos (CHIN et al., 2006; BAKER et al., 2007; MUSSI-DIAS et al., 2012). A natureza é fonte de agentes medicinais e diferentes fármacos modernos são provenientes de fontes naturais, particularmente plantas, os quais tiveram seu uso baseado na medicina tradicional (CRAGG & NEWMAN, 2005; GARCEZ et al., 2012). Os produtos naturais têm um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos por um longo tempo (PUPO et al., 2006; MOLINARI, 2009). Além disso, a complexidade estrutural dos produtos naturais serve de modelo na área da síntese orgânica e também como ferramentas para pesquisa e compreensão de vias bioquímicas (GULLO et al., 2006; GALLO et al., 2008). Uma análise da origem dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2006 mostra que produtos naturais ou substâncias derivadas de produtos naturais (com modificações e por isso chamados de substâncias semi-sintéticas) compreendem 34% de todas pequenas moléculas consideradas novas entidades químicas; além disso, 29% dessas novas entidades são miméticos de produtos naturais ou foram sintetizadas com base no estudo de grupos farmacóforo relacionados aos produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007) de acordo com a Figura 1.

Aproximadamente 10 dos 20 medicamentos mais vendidos no mundo são de origem natural e totalizaram uma arrecadação de cerca de US\$ 16 bilhões em 2009 (BARREIRO & BOLZANI, 2010). De acordo com Ojima (2008), os fármacos baseados em produtos naturais (derivados, mímicos e análogos de produtos naturais) correspondem a 57,7% de todos os fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Com relação aos fármacos utilizados para tratamento de doenças infecciosas (antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários e antivirais), cerca 68% são

classificados como derivados ou inspirados em produtos naturais para fármacos anti-infectivos (CRAGG & NEWMAN, 2009).



**Figura 1.** Novas substâncias químicas entre 1981 a 2006 (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Atualmente, a indústria farmacêutica vem passando por transformações relevantes em âmbito mundial. Ao longo dos últimos 10 ocorreu um declínio de estudos de novos produtos naturais bioativos pelas grandes empresas farmacêuticas multinacionais, ao mesmo tempo em que começaram a expirar patentes de medicamentos muito lucrativos (MOLINARI, 2009). Neste contexto autores afirmam que a indústria farmacêutica mundial busca novas fontes de substâncias bioativas e novas técnicas em biotecnologia visando desenvolvimento em pesquisa para novos fármacos (GADELHA, 2009).

A busca por metabólitos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente em comparação com os produtos obtidos de vegetais. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas (BASHYAL et al., 2007). Esta descoberta levou pesquisadores da academia e de indústrias

farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos derivados de micro-organismos (GALLO et al., 2008). Ainda segundo este autor, esta busca produtiva resultou em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas.

Micro-organismos endofíticos representam um vasto e inexplorado recurso de moléculas naturais com estruturas químicas que têm sido otimizadas evolutivamente pela sua relevância biológica e/ou ecológica. Isto porque em sua associação simbiótica, o vegetal protege e fornece nutrientes para o endófito, o qual, em contrapartida, produz metabólitos bioativos que favorecem o crescimento vegetativo e a competitividade do hospedeiro. De acordo com Bashyal et al. (2007), a possibilidade de que a diversidade de micro-organismos endofíticos seja influenciada pela diversidade de espécies vegetais e de fatores ambientais, sugere um grande potencial para descoberta de metabólitos secundários únicos a partir de endófitos encontrados em associação com comunidades vegetais até então não estudadas como fonte de micro-organismos associados.

### ***1.3 Fungos endofíticos: Fontes de Moléculas antimicrobianas***

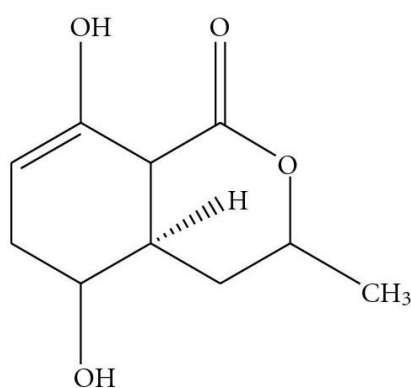
Os endofíticos são reconhecidos como valiosa fonte de metabólitos bioativos com grande aplicabilidade para a indústria farmacêutica, médica e agricultura. Algumas pesquisas demonstraram que a porcentagem de isolados endofíticos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana pode ser, em determinados casos, superior a 30% (MUSSI-DIAS et al., 2012). Schutz (2001) sugere que até 51% de metabólitos bioativos obtidos de fungos endofíticos possuem estrutura química desconhecida, o que reforça o grande potencial biotecnológico deste grupo microbiano para a descoberta de novas substâncias antimicrobianas. De acordo com Arnold et al. (2000) e Ferrara (2006), a atividade farmacológica atribuída de alguma forma as substâncias produzidas por micro-organismos endofíticos ou pela planta pode estar relacionada a uma resposta a uma infecção sofrida por seus hospedeiros. Vários produtos naturais bioativos, como por exemplo, alcalóides, terpenóides, flavanóides, esteróides, entre outros, têm sido descobertos por meio de estudos do metabolismo de fungos endofíticos (GADELHA et al., 2009).

Diferentes estudos demonstram o potencial dos fungos endofíticos associados a plantas em ecossistemas tropicais quanto à atividade antimicrobiana. VAZ et al. (2009) avaliaram presença de atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à

*Orchidaceae* e encontraram 33% táxons com atividade contra pelo menos um dos micro-organismos alvos. Carvalho et al. (2012) avaliaram a diversidade e atividade biológica de fungos endofíticos associados a planta medicinal *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e obtiveram 16 táxons que exibiram atividades contra bactérias, fungos e *Leishmania amazonensis*.

Vieira et al.(2012) estudaram a diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados com a *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). Ao final do processo de isolamento, 246 isolados de endófitos foram obtidos (225 fungos filamentosos e 21 leveduras) e identificados espécies de *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota*, dos quais 26,01% apresentaram atividade antimicrobiana.

Santiago et al. (2012) isolaram o fungo endofítico *Phoma* sp. da planta *Cinnamomum mollissimum*, o qual teve seus metabólitos bioativos estudados. A fração bioativa do extrato de *Phoma* sp. foi purificado e caracterizado como 5-hydroxiramulosin (Figura 2), o qual apresentou atividade antifúngica contra o fungo *Aspergillus niger* com  $IC_{50} = 1,56 \mu\text{g/ml}$ .



**Figura 2.** 5-hydroxiramulosin produzido pelo fungo endofítico *Phoma* sp.

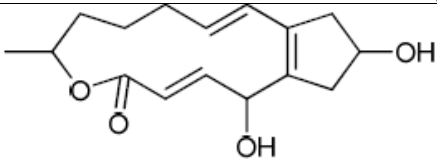
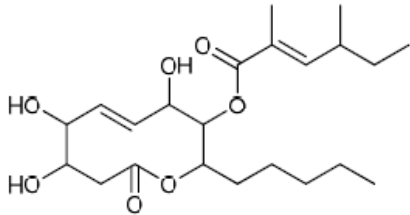

Zou et al. (2000) isolaram um fungo endofítico da planta *Artemisia mongolica*, o qual foi identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* que produziu uma substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico. Ainda no mesmo ano, Lu et al. (2000) caracterizaram 3 novos metabólitos antimicrobianos de uma cultura do fungo *Colletotrichum* sp., endófito isolado da planta medicinal *Artemisia annua*, produtora de artemisinina, droga antimalárica e utilizada na China.

A maioria dos micro-organismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo, dos quais muitos com propriedades de uso na agricultura e na

medicina, entre os quais se destacam espécies de *Penicillium* e *Cephalosporium* (STROBEL & DAISY, 2003). A proporção de estruturas inéditas e extratos bioativos produzidos por endofíticos é consideravelmente superior à quantidade produzida por outros micro-organismos de outros habitats (STROBEL et al., 2009). Isso pode ser devido ao fato de que a síntese de metabólitos ativos pode ser favorecida pela interação simbiótica (SCHULZ et al., 2002). Assim, com mais estudos é possível esperar substâncias bioativas inéditas a partir destes micro-organismos.

Borges et al. (2009) ilustraram uma ampla variedade de novos metabólitos, bem como substâncias bioativas isolados recentemente de fungos endofíticos. Além disso, abordam a importante contribuição destes fungos como agentes de biotransformação, o que tem sido bastante valorizado em processos biotecnológicos quanto à obtenção de moléculas biotransformadas que seriam dificilmente obtidas via síntese convencional em laboratório. A Tabela 1 ilustra alguns dos principais metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

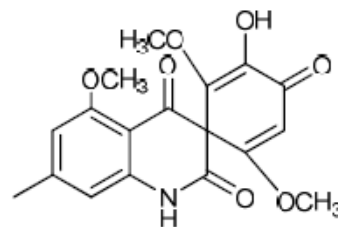
**Tabela 1.** Alguns dos principais metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabólito secundário/ Atividade biológica	Referência
<i>Phoma medicaginis</i>	Medicago sativa Medicago lupulina	 <p><b>58</b> brefeldina A</p> <p>Antibiótica</p>	WEBER et al. (2004)
<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Erythrina crista-galli</i>	 <p><b>60</b> fomol</p> <p>Antifúngica, antibacteriana</p>	WEBER et al., (2004)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	 <p><b>62</b> isopestacina</p> <p>Antimicrobiana</p>	HARPER et al., (2003)



*Aspergillus fumigatus*

*Cynodon dactylon*



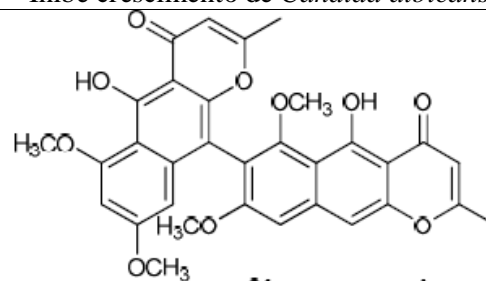
LIU et al., (2004)

**63 asperfumoidina**

Inibe crescimento de *Candida albicans*

*Aspegillus niger*

*Cynodon dactylon*



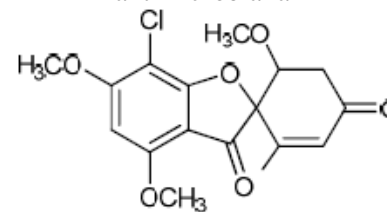
SONG et al., (2004)

**64 aurasperona A**

antimicrobiana

*Xylaria* sp.

*Abies holophylla*



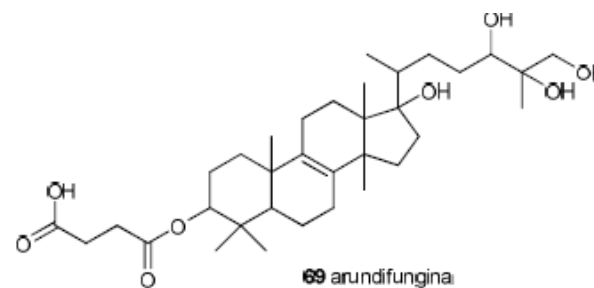
PARK et al., (2005)

**66 griseofulvina**

Antibiótica

Endofítico não  
identificado

*Cistus salvifolius*



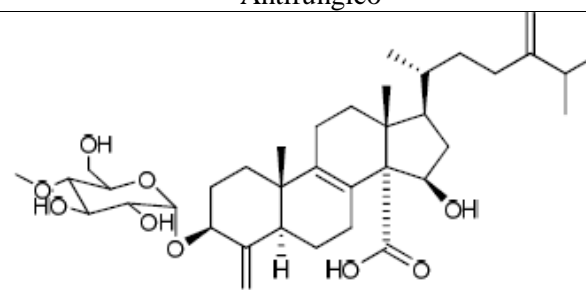
WEBER et al.,  
(2007)

Antifúngico

---

Endofítico não  
identificado

*Cistus salvifolius*



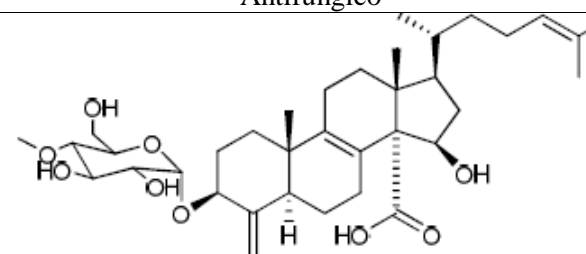
WEBER et al.,  
(2007)

Antifúngico

---

Endofítico não  
identificado

*Cistus salvifolius*



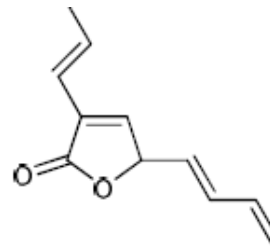
WEBER et al.,  
(2007)

Antifúngico

---

Endofítico não  
identificado

*Cistus salvifolius*



WEBER et al.,  
(2007)

72 5-(1,3-butadien-1-yl)-3-(propen-1-yl)-2(5H)-furanona

Antifúngico

---

Outro aspecto importante refere-se à produção de substâncias capazes de inibir fitopatógenos de plantas de interesse na agricultura pelos fungos endofíticos (STROBEL et al., 2002; SCHULZ et al., 2005; WANG et al, 2007). Xiao et al. (2013) estudaram a presença de 80 fungos endofíticos isolados de *Ginkgo biloba* e sua capacidade de inibir fitopatógenos como *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora capsici*. Estes autores obtiveram 15 fungos ativos contra pelo menos um dos fungos selecionados. Pimenta et al. (2012) avaliaram a atividade de fungos endofíticos isolados das folhas de *Prunus domestica* contra *Monilinia fructicola*, fungo causador da podridão parda, ferrugem nas flores e galho e apodrecimento em frutas, bem como *Colletotrichum gloeosporioides*, que provoca antracnose em uma variedade de culturas de fruta. Quatro endófitos produziram substâncias voláteis que inibiram o crescimento de *M. fructicola*. Os voláteis produzidos por estes fungos foram identificados como: 3-metil-1-butanol, ácido acético, 2-propin-1-ol e 2-propenonitrilo, os quais promoveram a inibição de crescimento dos fitopatógenos, causando a desintegração do conteúdo de suas hifas.

Rosa et al. (2012) avaliaram a associação dos fungos endofíticos com a *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. e *Smallanthus uvedalius* (L.) Mack. ex Small. Como resultado, 25 isolados fúngicos foram identificados como espécies de *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Hypocrea*, *Lecythophora*, *Nigrospora*, *Plectosphaerella* e *Trichoderma*, destes 10, 41,6% dos extratos avaliados apresentaram atividade antifúngica com fungos de interesse na agricultura. Rosa et al. (2012) estudaram a diversidade da microbiota endofítica associada plântulas obtidas de culturas de tecidos da planta medicinal *Echinacea purpurea*; 39 endófitos dos seguintes gêneros *Ceratobasidium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomerella* e *Mycoleptodiscus*; destes 16 extratos 41% foram ativos contra fungos fitopatogênicos.

#### ***1.4 Araucaria angustifolia: única gimnosperma endêmica do Brasil***

A *Araucaria angustifolia* (Figura 3) representa a espécie de gimnosperma arbórea dominante da floresta ombrófila na região sul do Brasil, bem como leste e sul do estado de São Paulo, extremo sul do de Minas Gerais e em pequenos trechos da Argentina e Paraguai (SCHUMACHER et al., 2005). *Araucaria angustifolia* foi descrita inicialmente como *Columbea angustifolia* por Giuseppe Bertolini em 1819 e *Araucaria brasiliana* por Achille Richard em 1822 (FORJAN, 1998). Hoje sua denominação

oficial é *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze 1898, nome genérico derivado de Arauco, uma região do Chile e seu nome específico é uma palavra latina significando “Folha Estreita” (CARVALHO et al., 2003).



**Figura 3.** Exemplos de amostras da *Araucaria angustifolia* em (A) folhas, (B) árvore adulta, (C) sementes conhecidas como pinhão e (D) cascas.

*Araucaria angustifolia* pertence à ordem *Coniferae*, classe *Coniferopsida*, família *Araucariaceae* (BASSO, 2010). A espécie se divide em 9 subespécies: *elegans*, *sacti*, *fosephi*, *angustifolia*, *coiova*, *indehiscens*, *nigra*, *striata*, *semi-alba* e *alba* (VASCONCELOS, 2009). Popularmente é conhecido como pinheiro-do-paraná, pinheiro-brasileiro, araucária, pinheiro-branco, pinheiro-chorão, curuíva, pinheiro-elegante, pinheiro-de-ponta-branca, pinheiro-preto, pinheiro rajado, pinheiro-são-jose, pinheiro-macaco, pinheiro-caiová, pinheiro-das-missões, os índios a chamavam de Curi, no comércio internacional é conhecida como *Brazilian pine* ou *Paraná pine* (CAMPOS, 2002; CARVALHO, 2003; ANGELI, 2003). Dentre o costume popular, o pinhão é conhecido por combater azia, anemia e debilidade do organismo. As folhas cozidas são usadas no combate à anemia e tumores provocados por distúrbios linfáticos (FRANCO

& FONTANA, 1997). A infusão da casca em álcool é empregada para tratar “cobreiro”, reumatismo, varizes e problemas musculares (CARVALHO, 1994).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Caracterizar a diversidade de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze e avaliar seu potencial como fonte de metabólitos antimicrobianos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Coletar e isolar fungos endofíticos associados a *A. angustifolia* presentes no estado de Minas Gerais;
- Depositar todos os fungos obtidos na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais para preservação *ex situ* da biodiversidade de fungos de ecossistemas brasileiros;
- Identificar em nível de espécie os fungos obtidos;
- Avaliar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *A. angustifolia*;
- Cultivar e preparar extratos dos fungos endofíticos e armazená-los de forma adequada em uma coleção de extratos;
- Testar todos os extratos obtidos em ensaios biológicos utilizados bactérias, leveduras e fungo filamentosos de interesse clínico, alimentício e na agricultura.

### ***3 Material e Métodos***

#### ***3.1 Coleta das amostras vegetais***

A coleta foi realizada em agosto de 2011, no distrito de Monte Verde, Município de Camanducaia, localizada no sul do estado de Minas Gerais, que se localiza a 480 km de Belo Horizonte. A região possui altitude 1.550 a 2.082 m e está inserido na Serra da Mantiqueira (22°51'S e 46°02'W). No total foram coletados 30 indivíduos de aparência saudável. De cada indivíduo foram coletados dois ramos em diferentes locais da planta de onde foram extraídos 5 folhas de cada ramo, totalizando 300 fragmentos de folhas. Dos caules de cada indivíduo foram coletados 5 fragmentos, totalizando 150 fragmentos de caules. Todas as amostras armazenadas em sacos plásticos identificados com a localização por *Global Positioning System* (GPS) e armazenadas e processadas dentro de um período de 48 horas após término da coleta.

#### ***3.2 Isolamento e preservação dos fungos***

Cinco folhas e 5 fragmentos dos caules coletados foram retirados com auxílio de pinça e tesoura previamente esterilizados e submetidas a um processo de desinfestação em 2% de detergente neutro Extran (Merck/EUA) por 2 minutos, em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 minutos e água destilada esterilizada por 2 minutos. Após desinfestação superficial, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo Agar Batata Dextrosado (BDA/Difco) suplementado com 200 µg/ml de cloranfenicol (Sigma/EUA) para inibir o crescimento de bactérias contaminantes. Alíquotas da água destilada esterilizada utilizada ao final do processo de desinfestação foram plaqueadas em meio BDA para avaliar se o processo de desinfestação foi bem sucedido e assegurar que somente os fungos endofíticos seriam isolados. As placas foram incubadas a 25 °C por um período de até 60 dias e os isolados foram purificados em novas placas de Petri contendo somente o meio BDA (COLLADO et al., 1996).

Os isolados de fungos filamentosos obtidos foram preservados em duplicata em glicerol 15% a -80 °C e em frascos de vidros contendo água destiladas autoclavada segundo método Castellani, armazenados em temperatura ambiente (CASTELLANI, 1967). Todos os isolados obtidos durante o estudo foram depositados na Coleção Microorganismos e Células do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais com o código UFMGCB.



### ***3.3 Crescimento micéial para extração de DNA***

Para extração de DNA e identificação molecular dos fungos, de aproximadamente 5 mm de diâmetro de cada fungo obtido foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio líquido de extrato de Malte (0,5 % extrato de Malte, 1,5% de Agar). Os tubos foram armazenados em estufa BOD a 25-28 °C por 15 dias. Após este período, o micélio produzido foi retirado com auxílio de alças esterilizadas e inoculado em tubo eppendorf contendo 400 µl solução de tampão de lise (Tris-HCl-trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA- ácido etilenodiamino tretra-ácético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS- sódio dodecetil sulfato 1%) e mantido a -20 °C até a realização de procedimento de extração de DNA total.

### ***3.4 Identificação dos fungos***

#### ***3.4.1 Extração do DNA total***

A extração do DNA total foi realizada de acordo com Rosa et al. (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por 15 dias em Agar Extrato de Malte e acrescidos de 400 µl de tampão de lise (Tris-HCL - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético 0,005 M, NaCL 0,1M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e deixado a – 20 °C por aproximadamente 10 minutos. O micélio foi macerado e acrescidos 5 µl de Proteinase K 50 µg/mL. Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60 °C em banho seco. Após esta etapa, foram adicionados 162 µl de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização em vortex e incubação por 10 minutos a 65 °C. Em seguida, foram acrescentados 570 µl da mistura clorfórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos à -20 °C. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml e acrescentado 10% do volume de uma solução de Acetato de Sódio 3M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a -20 °C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 50% do volume de isopropanol e centrifugado a 13.200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 µl de etanol (Merck) 70% resfriado e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5

minutos e o sobrenadante desprezado por inversão. A amostra foi seca em temperatura ambiente, para evaporação do excesso de etanol, e 50 µl de Tris-EDTA (Tris-HCL 0,01M e EDTA 0,001M) foram adicionados e a mesma foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C.

### **3.4.2 PCR com iniciador (GTG)<sub>5</sub>**

Para confirmação do agrupamento em macromorfologia dos fungos filamentosos, os isolados foram submetidos à análise molecular, por meio de PCR utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 3 µl de DNA, 2 µl do iniciador (GTG)<sub>5</sub> µmol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 2,5 µl de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µl de dNTP 10 mM, 0,3 µl de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR (Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 93 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X resolvidos, em tampão de corrida 6X e Gel Red, durante aproximadamente 35 minutos a 120V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

### **3.4.3 Obtenção dos amplicons**

Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTGATATGC-3) foram utilizados para amplificação das regiões ITS do rDNA, conforme descrito por White et al. (1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 µl contendo 2 µl de DNA, 1 µl de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 5 µl de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2 µl de dNTP 10 mM, 0,3 µl de TaqDNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR (Biosystems). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR

foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, resolvidos em tampão de corrida 6X e Gel Red, durante aproximadamente 30 minutos a 120V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

#### ***3.4.4 Purificação dos amplicons***

Os amplicons gerados a partir da reação de PCR foram purificados utilizando 11,25 µl de ETDA a 5 M e 135 µl de Etanol 96% (PA) e deixado em bancada por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos, tendo seu sobrenadante retirado e descartado. A seguir foi adicionado 120 µl de Etanol (PA) 70% resfriado e levado a centrifuga por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e o tubo foi deixado à temperatura ambiente em overnight, para evaporação do excesso de Etanol. Após foi adicionado 10 µl de água deionizada esterilizada. O produto foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDropThecnologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

#### ***3.4.5 Reação de sequenciamento***

O sequenciamento foi realizado utilizando o Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000, no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM-UFMG). Para a reação de sequenciamento foram utilizados 100-150 ng do DNA purificado, os reagentes presentes no kit e iniciadores. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µl contendo 4 µl do pré-mix (presente no kit de sequenciamento) e 1 µl do iniciador ( $5 \mu\text{mol}^{-1}$ ), completando-se o volume final com água deionizada estéril. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95 °C por 25 minutos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50 °C e 3 minutos de extensão a 60 °C, em seguida, os produtos da reação foram transferidos para uma placa de sequenciamento de 96 poços para serem precipitados.

#### ***3.4.6 Precipitação da reação de sequenciamento***

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 µl de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada

para que as gotas do acetato de amônio se misturassem à reação. Em seguida, foram adicionados 28 µl de etanol absoluto (Merck/EUA). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado virando-se a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 150 µl de etanol 70% Merck/EUA). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante 1 segundo. Em seguida a placa foi mantida em repouso durante 20 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol. O DNA das amostras precipitado em cada poço da placa foi então ressuscitado em 10 µl de *Loading buffer* (presente no kit de sequenciamento). A placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, centrifugada por 1 segundo a 900 rpm e armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACE™ 1000.

### **3.4.7 Análise computacional das sequências**

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de culturas depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology e disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

De acordo com Gazis et al. (2011), sequências obtidas a partir da região ITS podem apresentar problemas na identificação de táxons pertencentes ao filo *Ascomycota*. Por esta razão, os critérios sugeridos por Gonçalves et al. (2012) foram utilizados para interpretação das sequências obtidas em comparação às sequências de fungos depositadas no GenBank: para as sequências com identidade  $\geq$  a 99%, os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero; para as sequências com identidade igual a 98%, os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero, porém, o termo “cf.” (*confers* = “comparar com”) foi utilizado. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade entre 95 e 97%, somente o gênero foi aceito; para sequências com identidade  $<$  95% os isolados foram identificados em nível de família, classe ou ordem ou como “não identificado”.

Informações sobre os níveis taxonômicos dos fungos foram obtidas nos bancos de dados *Mycobank* ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)) e *Index Fungorum* ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)).

### **3.5 Preparo dos extratos**

#### **3.5.1 Preparo dos extratos vegetais**

As folhas e cascas da *Araucaria angustifolia* foram inoculados em tubos cônicos de 50 ml com 35 ml de Etanol PA (Vetec). Os tubos foram mantidos ao abrigo da luz e após 7 dias, o sobrenadante foi filtrado e transferido para frascos de cintilação. Todos os extratos brutos obtidos foram secos em centrífuga a vácuo “Speed Vac” (Savant) com temperaturas inferior a 35 °C, solubilizados em DMSO, a um concentração de 100 mg/ml para realização de ensaios biológicos.

#### **3.5.2 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos etanólicos**

Todos os fungos obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA a 25 °C por 15 dias. Após crescimento todo o meio de cultura e crescimento micelial de cada fungo foi picotado e transferido para tubo cônico de 50 ml e adicionado 35 ml de etanol P.A (Vetec). Os tubos foram incubados por 7 dias ao abrigo da luz e o sobrenadante de cada tubo foi filtrado e transferido para frascos de vidro de 30 ml. Todos os extratos obtidos foram secos em centrífuga a vácuo Speed Vac (Savant), com temperatura inferior a 35 °C, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 100 mg/ml e mantidos a -20 °C até utilização no ensaios biológicos.

### **3.6 Ensaios Biológicos**

A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi inicialmente avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com a metodologia descrita nas normas do *Clinical and laboratory Standards Institute* (CLSI M7 – A 6, vol. 23 nº 2) para bactérias, com modificações; e 7.1 *Antifungal Susceptibility testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS- EUCAST, 2002) para leveduras, com modificações e “Método de Referência para testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à terapia Antifúngica dos filamentosos” (CLSI M38 – A2, vol.22 , nº 16) para fungos filamentosos, com adaptações. Os microorganismos alvos são: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Escherichia coli* ATCC

11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 60193, *C. krusei* ATCC 6258 e *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740.

### **3.6.1 Padronização dos inóculos**

Bactérias e leveduras foram previamente crescidas a 35° e 37 °C nos meios Muller-Hinton (Difco) a Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia) respectivamente, por um período 24 h para espécies de bactérias e de 48 h para as espécies de *Candida*, o fungo filamentoso *Cladosporium* foi crescido em meio BDA a temperatura de 28 °C por 7 dias. Com auxílio de alças descartáveis foram coletadas colônias das *Candida* que foram ressuspensas em 6 ml de solução fisiológica esterilizada, homogeneizada em vórtex e ajustadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm e o inóculo foi padronizado à 70% em transmitância. Após a padronização do inóculo 2 ml da solução foi adicionado a 18 ml de meio RPMI com Glicose para realização do ensaio.

Para padronização dos inóculos de bactéria duas a cinco colônias foram ressuspensas em 6 ml de solução fisiológica estéril, homogeneizada em vórtex e sua absorbância foi medida em comprimento de onda de 625 nm, sendo ajustada a leitura do inóculo para 0,08 a 0,1. Da suspensão foi tirada 2 ml e acrescentado 18 ml de meio Muller-Hinton para realização do ensaio.

As culturas do *C. sphaerospermum* fungo filamentoso, foi colhida uma alçada dos esporos e transferida para 6 ml de solução fisiológicas estéril, homogeneizada em vórtex, foi feita a medida do comprimento de onda em transmitância de 620 nm e ajustada a leitura no inóculo. Após padronização e leitura 2 ml de solução foi adicionado 18 ml de RPMI.

### **3.6.2 Ensaio de triagem**

Os ensaios de triagem foram realizados em placa de 96 poços. Para ensaios com extratos brutos obtidos da *A. angustifolia* foram adicionados em cada poço usado para controle teste, 25 µl do extrato dissolvido em DMSO, 25 µl do meio de cultura e 50 µl do inóculo padronizado. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µl e as concentrações das drogas usadas como controles positivos de 2 µg/µl (Anfotericina B-Sigma/USA) para Leveduras e bactérias 32 µg/ml (Cloranfenicol – Sigma/ USA) para o fungo filamentoso. A concentração final dos extratos em cada poço foi de 250 µg/ml.

Após o preparo das placas as mesmas foram agitadas por cerca de 20 minutos a 200 rpm e em seguida foram incubadas por 24 h a 35 °C para bactérias e 24-48 h a 37 °C para leveduras do gênero *Candida*, para o fungo filamentoso por 48 h a 25 °C. Após período de incubação para as bactérias e leveduras, em cada poço foram acrescentados 10 µl de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT/ Amresco – 5 mg/ml), o conteúdo homogeneizado por cerca de 20 minutos a 200 rpm, as placas foram novamente incubadas por 4 horas. Nas mitocôndrias das células alvo, o MTT é metabolizado em formazan, revelando a presença de células metabolicamente ativas, ocorrendo ao meio uma alteração da cor. Após metabolismo do MTT, foi adicionado 100 µl/poço de SDS/Isopropanol (5%), que tem por objetivo promover lise da membrana celular dos micro-organismos alvos liberando o formazan.

A leitura das placas foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT pelo programa softmax<sup>®</sup> Pro 5 (molecular Devices), com absorvância de 570 nm para as placas contendo bactérias, para as *Candida* e o *C. sphaerospermum* a um comprimento de onda a 620 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância controle contendo apenas micro-organismos.

### ***3.7 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância***

A abundância de cada táxon foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: porcentagem de abundância do táxon A = número de isolados do táxon A x 100/soma de isolados de todos os táxons. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades fúngicas na área de coleta.

Para avaliar a diversidade de espécies no local de coleta, foram utilizados os seguintes índices: (a) Fisher- $\alpha$  (diversidade), (b) Margalef's (riqueza) e (c) Simpson's (dominância). O índice de diversidade de Fisher- $\alpha$  é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória onde, comumente algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (FISHER et al., 1943). Este índice é calculado pela fórmula  $S = a \cdot \ln(1+n/a)$  onde,  $S$  é o número de táxons presente na amostra,  $n$  é o número de indivíduos e  $a$  representa o índice de Fisher- $\alpha$ . O Índice de Margalef é uma medida utilizada em ecologia para estimar a riqueza de espécies de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies

em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por  $S = (n-1)/\ln(N)$ , onde  $n$  é o número de táxons encontrados e  $N$  representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de  $S$  maior a riqueza de espécies do local amostrado. O índice de Simpson é muitas vezes utilizado para quantificar a biodiversidade de um ecossistema. Ele leva em conta o número de espécies presentes no local, bem como a abundância de cada espécie. Trata-se de um índice de dominância que mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson é dado pela fórmula  $D = \sum(n/N)^2$ , onde  $n$  é o número total de organismos de uma mesma espécie e  $N$  o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de  $D$  pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o máximo de diversidade e 1 o mínimo de diversidade. Sendo assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de Mao Tau, o qual interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Este cálculo permite uma comparação estatística direta entre a riqueza e os conjuntos de dados (COLWELL et al., 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (RYAN et al., 2001).

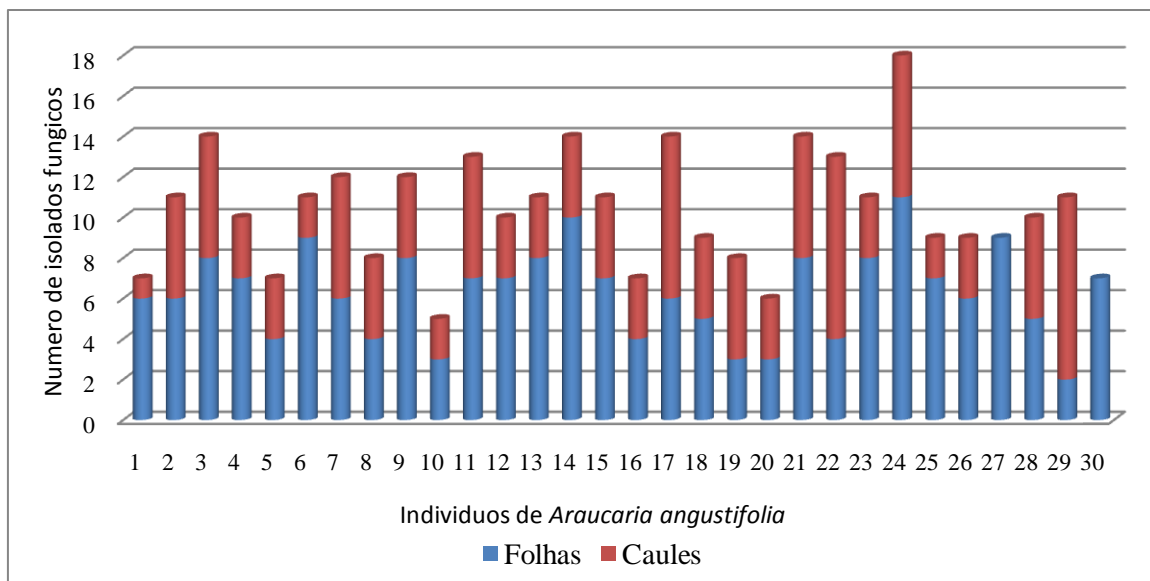


## **4. Resultados e discussão**

### **4.1 Coleta e isolamento dos fungos endofíticos**

Neste estudo foram coletadas 300 folhas (10 folhas obtidas de 2 ramos por indivíduo) e 150 fragmentos de caules (5 fragmentos de caules por indivíduo) de 30 indivíduos de *A. angustifolia*. Os fragmentos de folhas e caules de cada indivíduo foram transferidos para placas de Petri contendo o meio BDA, totalizando 450 fragmentos/coleta. Ao final do processo de isolamento foram obtidos 316 isolados de fungos filamentosos, dos quais 204 foram obtidos das folhas e 112 dos caules (Figura 6). Não foram obtidos isolados de levedura endofíticas, o que pode ter sido influenciado por fatores, como pH, temperatura e umidade, meio de cultura, técnica de isolamento, entre outros. Outro ponto a ser considerado é que muitos fungos filamentosos apresentam rápido desenvolvimento após emergirem dos fragmentos de folhas e caules, sobrepondo, no meio de cultura, o crescimento das colônias de leveduras, o que dificulta o isolamento das mesmas (WANG et al., 2007). Além disso, de acordo com o mesmo autor acima, leveduras podem constituir um grupo escasso dentro da comunidade de micro-organismos endofíticos de folhas e caules, justificando, assim, o fato de não ter sido obtido nenhum isolado de levedura por meio do método empregado.

Neste trabalho, o número de isolados fúngicos obtidos por indivíduo vegetal variou de 0 a 18 (Figura 6). Entretanto, a quantidade de isolados de fungos em relação ao número de indivíduo de *A. angustifolia* pode ser ainda maior, uma vez que o isolamento destes micro-organismos pode ser influenciado pela habilidade dos mesmos de crescerem fora do tecido vegetal em meios de cultura convencionais (LIU et al., 2007). Além disso, fungos que crescem lentamente, ou mesmo que não crescem em BDA, podem não ter sido obtidos (PROMPUTTHA et al., 2007).



**Figura 4.** Número de isolados de fungos endofíticos isolados por indivíduo de *Araucaria angustifolia*.

Poucos estudos citam a associação de fungos endofíticos com gimnospermas. Hormazabal e Piontelli (2009) isolaram 36 fungos endófitos de gimnospermas nativas do Chile (*Araucaria araucana*, *Austrocedrus chilensis*, *Fitzroya cupressoides*, *Pilgerodendron uviferum*, *P. nubigena*, *P. saligna*, *Prumnopitys andina* e *Saxegothaea conspicuaos*), os quais foram avaliados quanto à capacidade de produzir metabólitos com atividade antibacteriana contra as bactérias *Micrococcus luteus* e *S. aureus*; como resultado, o extrato do fungo *Curvularia protuberata* inibiu o crescimento do *S. aureus*. Garcia et al. (2012) avaliaram o potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados com a *Sapindus saponaria*, gimnosperma conhecida na medicina popular no Brasil por suas atividades ansiolítica, diurética, adstringente, antifúngica e larvicida. Os autores acima detectaram que os táxons *Cochliobolus intermedius* e *Phomopsis* sp. foram ativos contra *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *M. luteus* e *Enterococcus hirae*.

## 4.2 Identificação dos fungos endofíticos

Todos os isolados de fungos endofíticos foram agrupados em morfotipos de acordo com as características morfológicas da frente e verso da colônia tais como velocidade de crescimento, aspectos da borda (regulares, irregulares e radiadas), cor, textura (cremosa, butirosa ou mucóide, cotonosa, aveludada, serosa, camurça, granulosa, pulverulenta, membranosa, coriácea e verrucosa) e produção de pigmentos. Além disso, os isolados foram agrupados utilizando o perfil eletroforético dos produtos da PCR amplificados com o iniciador (GTG)<sub>5</sub>.

Ao final do agrupamento foram caracterizados 140 morfotipos distintos, dentro dos quais um isolado de cada morfotipo foi selecionado para sequenciamento da região ITS do gene do rDNA. As sequências dos táxons analisados foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBak e identificados como integrantes dos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota* e pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Biscogniauxia*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaphorte*, *Mucor*, *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Pezicula*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Preussia*, *Trichoderma* e *Xylaria* (Tabela 1). Dentre os gêneros identificados, *Pestalotiopsis* foi obtido com maior frequência, seguido de *Xylaria*, *Penicillium*, *Diaporthe* e *Neofusicoccum*. Além disso, para comparar a filogenia das sequências obtidas pela região ITS, foram construídas árvores filogenéticas (Figuras 2 e 3) para inferência das possíveis espécies.

**Tabela 2.** Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia*.

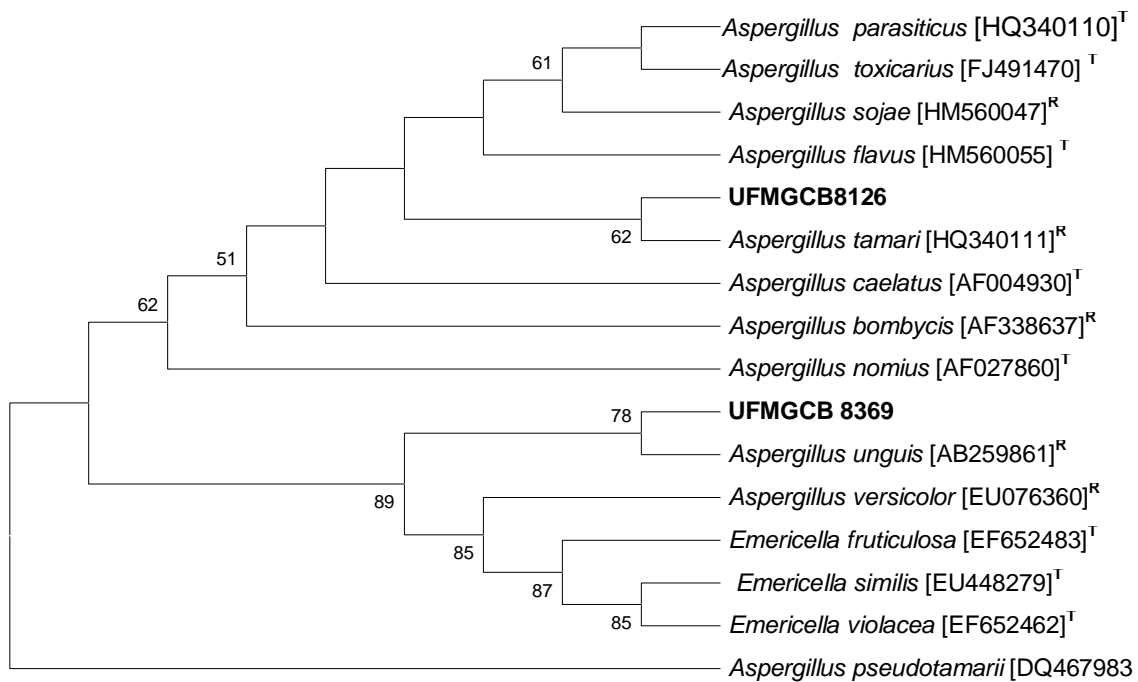
Código UFMGCB <sup>a</sup>	Nº de isolados	Parte de vegetal	Espécie de referência [nº de acesso no GenBank]	Nº de pb	Identidade (%)	Identificação Proposta <sup>b</sup>
8126	8	F <sup>d</sup>	<i>Aspergillus tamari</i> [HQ340111]	423	99	<i>A. tamari</i>
8154	6	C <sup>c</sup>	<i>Neofusicoccum parvum</i> [EU650672]	440	99	<i>Neofusicoccum</i> sp.
8217	5	F	<i>Penicillium chrysogenum</i> [JQ781817]	481	100	<i>Penicillium</i> sp.
8163	5	F	<i>Sordariomycetes</i> sp. [JQ760623]	450	97	<i>Sordariomycetes</i> sp.
8283	5	C	<i>Xylaria polymorpha</i> [AB274817]	492	99	<i>Xylaria</i> sp.
8137	4	F	<i>Penicillium sizovae</i> [GU944587]	506	98	<i>P. cf. sizovae</i>
8159	3	C, F	<i>Pestalotiopsis bicilia</i> [AF409973]	465	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8239	3	C	<i>Pestalotiopsis leucothoes</i> [AF409969]	545	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8330	3	C, F	<i>Pestalotiopsis palmarum</i> [AF409990]	476	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8257	3	C	<i>Pestalotiopsis unicolor</i> [JX398999]	463	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8260	3	F	<i>Xylaria plebeja</i> [GU324740]	408	98	<i>Xylaria</i> sp.
8248	2	C	<i>Botryosphaeria dothidea</i> [EU650670]	497	97	<i>Botryosphaeria</i> sp.
8372	2	F	<i>Cladosporium tenuissimum</i> [HM148210]	321	99	<i>C. tenuissimum</i>
8400	2	F	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [JX010148]	422	100	<i>C. gloeosporioides</i>
8256	2	C, F	<i>Diaporthe caulivora</i> [HM347712]	483	97	<i>D cf. caulivora</i>
8164	2	C	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i> [JN814471]	476	99	<i>Neofusicoccum</i> sp.
8166	2	C, F	<i>Pestalotiopsis aquatica</i> [AF409956]	398	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8390	2	F	<i>Pestalotiopsis ixorae</i> [AB491975]	456	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.

8332	2	C, F	<i>Pestalotiopsis rosea</i> [JX399005]	564	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8387	2	C	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i> [AF409970]	345	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8257	2	C, F	<i>Pestalotiopsis uvicola</i> [HQ288237]	485	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8422	2	C, F	<i>Pestalotiopsis versicolor</i> [AF405298]	302	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8312	2	C	<i>Phomopsis chimonanthi</i> [EU878432]	456	98	<i>P. cf. chimonanthi</i>
8101	2	F	<i>Xylaria castorea</i> [JN225908]	375	97	<i>Xylaria</i> sp.
8097	2	F	<i>Xylaria crozonensis</i> [GU324748]	394	98	<i>X. cf. crozonensis</i>
8379	2	F	<i>Xylaria digitata</i> [AY909006]	481	99	<i>Xylaria</i> sp.
8228	2	C	<i>Xylaria grammica</i> [AB625421]	295	98	<i>X. cf. grammica</i>
8408	2	F	<i>Xylaria laevis</i> [GU324747]	512	97	<i>Xylaria</i> sp.
8156	2	F	<i>Xylaria longipes</i> [AY909017]	493	97	<i>Xylaria</i> sp.
8369	1	F	<i>Aspergillus unguis</i> [AB259861]	462	98	<i>Aspergillus cf. unguis</i>
8355	1	F	<i>Biscogniauxia</i> sp. [HI678098]	502	99	<i>Biscogniauxia</i> sp.
8207	1	F	<i>Cladosporium myrtacearum</i> [HM148117]	415	99	<i>C. myrtacearum</i>
8404	1	F	<i>Cladosporium phaenocomae</i> [JF499838]	367	99	<i>C. phaenocomae.</i>
8206	1	F	<i>Cladosporium pini-ponderosae</i> [FJ936160]	382	99	<i>Cladosporium</i> sp.
8122	1	F	<i>Colletotrichum colombiense</i> [JQ005174]	489	99	<i>C. colombiense</i>
8398	1	F	<i>Colletotrichum boninense</i> [JQ005158]	506	99	<i>C. gloeosporioides</i>
8300	1	F	<i>Diaporthe helianthi</i> [AF512900]	304	98	<i>Diaporthe</i> sp.
8335	1	C	<i>Diaporthe leucospermi</i> [JN712460]	502	97	<i>Diaporthe</i> sp.
8226	1	C	<i>Diaporthe novem</i> [HM347710]	465	100	<i>Diaporthe</i> sp.

8295	1	C	<i>Diaporthe pasiflorae</i> [HM347707]	354	99	<i>Diaporthe pasiflorae</i>
8308	1	F	<i>Diaporthe phaseolorum</i> [HM347707]	413	98	<i>D. cf. phaseolorum</i>
8269	1	C	<i>Diaporthe rhusicola</i> [JF951146]	465	96	<i>Diaporthe</i> sp.
8189	1	C	<i>Diaporthe</i> sp. [JN712460]	502	100	<i>Diaporthe</i> sp.
8165	1	C	<i>Mucor cirnelloides</i> [HI907654]	390	99	<i>M. cirnelloides</i>
8161	1	F	<i>Muscodor albus</i> [AY527046]	495	99	<i>Muscodor</i> sp.
8181	1	F	<i>Muscodor crispans</i> [EU195297]	493	99	<i>Muscodor</i> sp.
8377	1	C	<i>Neofusicoccum batangarum</i> [HM357636]	308	98	<i>Neofusicoccum</i> sp.
8153	1	C	<i>Neofusicoccum grevilleae</i> [JF951137]	465	98	<i>Neofusicoccum</i> sp.
8415	1	C	<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i> [EU301018]	483	99	<i>Neofusicoccum</i> sp.
8110	1	C	<i>Neofusicoccum occulatum</i> [EU301034]	479	100	<i>Neofusicoccum</i> sp.
8141	1	C	<i>Neurospora tetrasperma</i> [GQ922530]	484	99	<i>N. tetrasperma</i>
8394	1	F	<i>Penicillium dipodomyicola</i> [AY371616]	290	98	<i>Penicillium</i> sp.
8189	1	C	<i>Penicillium steckii</i> [GU944595]	297	99	<i>Penicillium</i> sp.
8399	1	F	<i>Penicillium sumatrense</i> [HM469404]	423	99	<i>P. sumatrense</i>
8233	1	F	<i>Penicillium terrigenum</i> [JN617684]	306	99	<i>P. terrigenum</i>
8261	1	F	<i>Penicillium tropicum</i> [GU944582]	478	99	<i>Penicillium</i> sp.
8219	1	F	<i>Penicillium vinaceum</i> [AF033461]	499	100	<i>Penicillium</i> sp.
8336	1	C	<i>Pestalotiopsis gracilis</i> [AF409962]	465	99	<i>P. gracilis</i>
8268	1	C	<i>Pestalotiopsis longisetula</i> [AF409971]	398	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
8317	1	C	<i>Pestalotiopsis maculans</i> [AF405296]	321	97	<i>P. maculans</i>
8320	1	C	<i>Pestalotiopsis microspora</i> [AY924279]	390	97	<i>Pestalotiopsis</i> sp.

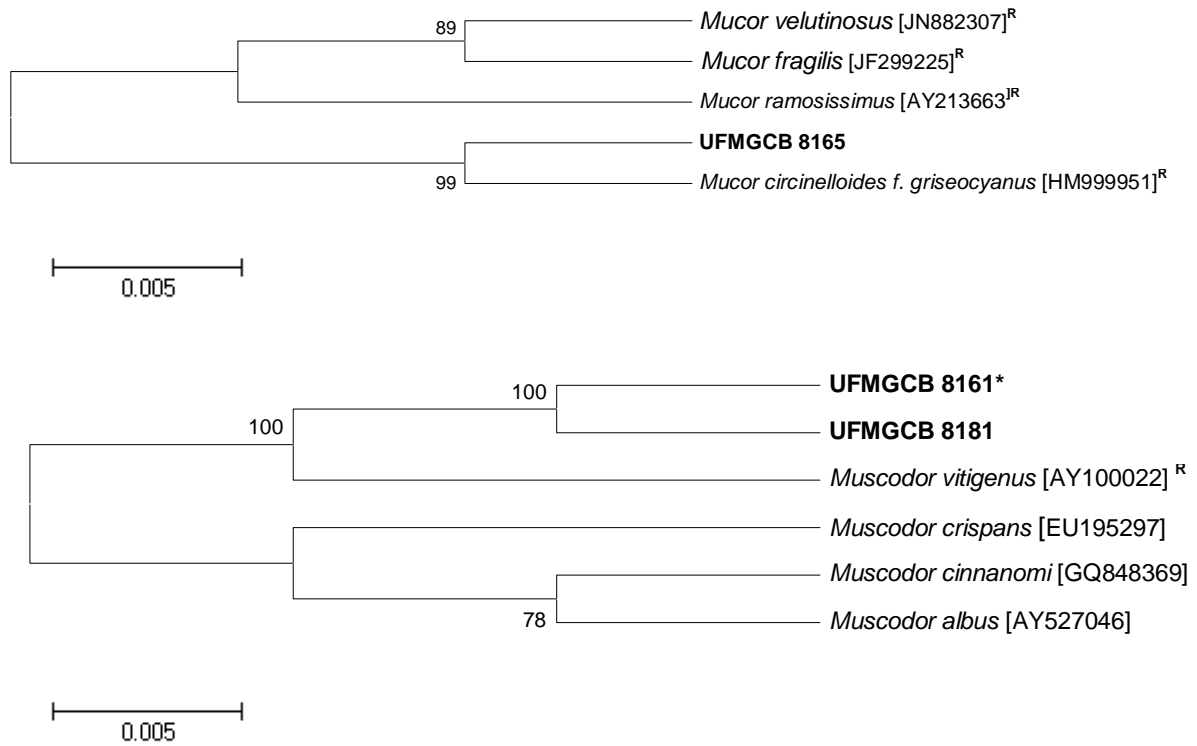
8107	1	C	<i>Pezicula aurantiaca</i> [AH132978]	420	98	<i>P. cf. aurantiaca</i>
8290	1	F	<i>Pezicula eucrita</i> [AF141194]	466	98	<i>P. cf. eucrita</i>
8407	1	F	<i>Preussia ismera</i> [AY943058]	441	98	<i>Preussia</i> sp.
8205	1	F	<i>Preussia minima</i> [DQ468026]	465	99	<i>Preussia</i> sp.
8238	1	F	<i>Preussia pseudominima</i> [JN159706]	465	99	<i>Preussia</i> sp.
8203	1	C	<i>Trichoderma konilangbra</i> [HQ608035]	539	99	<i>Trichoderma</i> sp.
8348	1	C	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> [EU280095]	534	97	<i>Trichoderma</i> sp.
8408	1	F	<i>Xylaria allantoidea</i> [AY909005]	439	99	<i>X. allantoidea</i>
8340	1	F	<i>Xylaria arbuscula</i> [AF163029]	464	97	<i>Xylaria</i> sp.
8277	1	C	<i>Xylaria bambusicola</i> [GU300088]	498	99	<i>Xylaria</i> sp.
8095	1	F	<i>Xylaria berteri</i> [GU324749]	340	99	<i>X. berteri</i>
8324	1	F	<i>Xylaria curta</i> [EU715621]	512	99	<i>X. curta</i>
8417	1	F	<i>Xylaria intracolorata</i> [GU324741]	484	97	<i>Xylaria</i> sp.
8246	1	F <sup>c</sup>	<i>Xylaria liquidambaris</i> [HI986754]	503	99	<i>X. liquidambaris</i>
8319	1	F	<i>Xylaria luteostromata</i> [GU324739]	453	98	<i>Xylaria</i> sp.
8116	1	F	<i>Xylaria mellissii</i> [FJ175173]	387	97	<i>Xylaria</i> sp.
8342	1	F	<i>Xylaria venosula</i> [EF026149]	456	97	<i>X. venosula</i>

<sup>a</sup>UFMGCB= Código de Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>b</sup>Identificação proposta, realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região ITS1- 5.8S-ITS2 do gene do rDNA <sup>c</sup>C = caule e <sup>d</sup>F = folhas de *Araucaria angustifolia*.



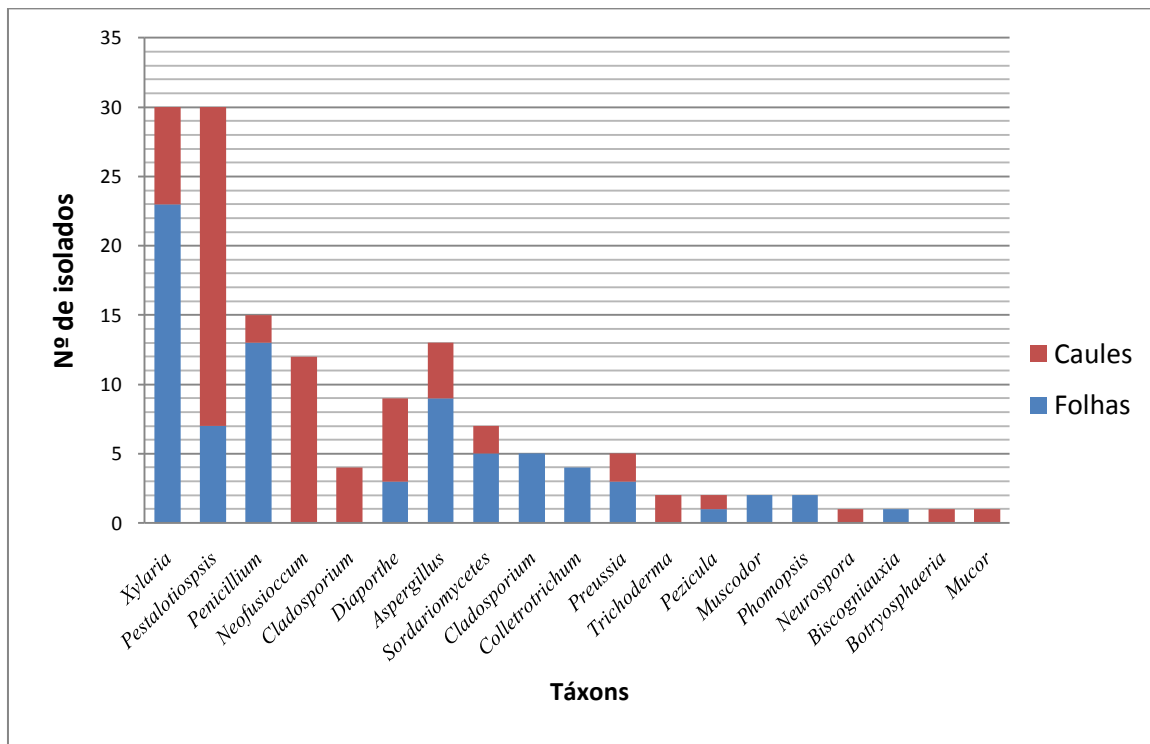
**Figura 5.** As árvores foram construídas baseado em fragmentos da região ITS do rDNA mostrando a relação entre isolados dos fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Aspergillus* isolados da *Araucaria angustifolia*. A análise de *bootstrap* foi realizada com 1.000 repetições.





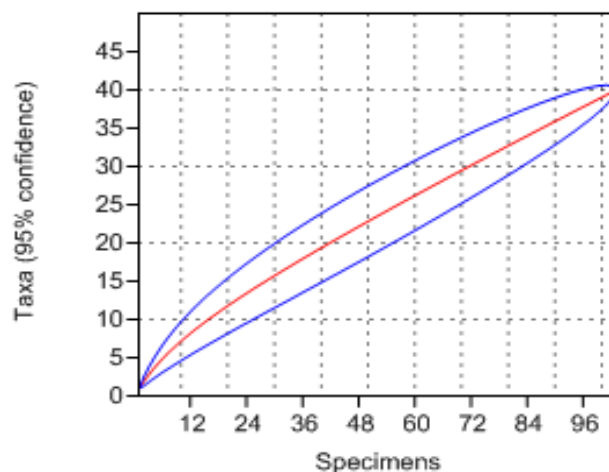
**Figura 6.** A árvore foi construída baseado em fragmentos da região ITS do rDNA mostrando a relação entre isolados dos fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Muscodor* e *Mucor*, sendo a análise de *bootstrap* foi feita com 1.000 repetições.

No geral, nas folhas de *A. angustifolia* foram encontrados mais táxons em comparação com o caule (Figura 6). De acordo com Oki et al. (2009), as folhas apresentam uma área maior para captura de inóculo em sua superfície; além disso, existem outras características do tecido vegetal, como espessura da dos fragmentos do caule que dificultaria a entrada dos endófitos. Entretanto, as folhas têm sido as partes vegetais mais utilizadas para a obtenção de fungos endofíticos em estudos de diversidade e bioprospecção (RODRIGUES, 1994; SURYANARAYANAN et al., 2002; SANTOS et al., 2003; LIU et al., 2004; SANTAMARÍA E BAYMAN, 2005; RAVIJARA et al., 2006; GOND et al., 2007; PROMPUTTHA et al., 2007; RAKOTONIRIANA et al., 2007; WANG et al., 2007).



**Figura 7.** Número de isolados fúngicos por gêneros obtidos de folhas e cascas de *Araucaria angustifolia*.

A comunidade de fungos endofíticos de *A. angustifolia* apresentou elevados valores de diversidade (Fisher- $\alpha$  = 24,01), riqueza (Margalef's = 8,42) e baixa dominância (Simpson's = 0,9). Além disso, a curva de rarefação de espécies (Figura 7) não atingiu uma assíntota, indicando que o número amostral não conseguiu cobrir toda a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *A. angustifolia*.



**Figura 7.** Curva de acumulação de espécies (Mao Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados *Araucaria angustifolia*.

*Pestalotiopsis* foi o gênero mais abundante (22,4%) entre os fungos endofíticos associados a *A. angustifolia*. Espécies de *Pestalotiopsis* já foram descritas como endófitos em várias plantas, mas para poucas gimnospermas. Gonthier et al. (2006) descreveram a ocorrência de cancro provocado por *P. funerea* em gimnospermas adultas de *Cupressocyparis leylandii* na Itália; Yang et al. (2011) isolaram *P. photiniae* da gimnosperma chinesa *Podocarpus macrophyllus*. Entretanto, alguns estudos demonstraram a presença de espécies de *Pestalotiopsis* como fitopatógenos. Joshi et al. (2009) caracterizaram isolados de *Pestalotiopsis* capazes de causar apodrecimento das folhas e caules de *Camellia sinensis* no sul da Índia. No Brasil foram detectadas espécies de *Pestalotiopsis* como um dos causadores da podridão branca em florestas de eucaliptos nos estados Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná (ALONSO et al., 2007).

O segundo gênero mais frequente foi *Xylaria* com 21,64% do total de isolados obtidos. Espécies de *Xylaria* foram isoladas de diferentes famílias vegetais (PETRINI, 1986; MARIANO et al., 1997; PEREIRA et al., 1999; PHOTITA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2001). De acordo com Nghi et al. (2012), espécies de *Xylaria* são obtidas de plantas tropicais com maior frequência em comparação com plantas de clima temperado. Alguns estudos citam espécies de *Xylaria* como endofíticos; entre eles, Silva et al. (2010) descreveram espécies de *Xylaria* em folhas da *Ginkgo biloba* e *Piper aduncum*; Souza et al. (2004) estudaram as plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* e encontraram espécies de *Xylaria* em fragmentos de folhas, caule e raiz.

Quinze isolados (11,2%) foram identificados como espécies de *Penicillium* e 8 (5,98%) como *Aspergillus*. Entre eles foram identificados *P. terrigenum*, *P. sumatrense* e *P. sizovae*. *Penicillium* endofíticos foram isolados de diferentes plantas tais como *Azadirachta indica*, *Oryza sativa*, *Melia azedarach* e *Prumnopitys andin* (SANTOS et al., 2003; TIAN et al., 2004; SCHMEDAHIRSCHMANN et al., 2005; MAHESH et al., 2005). Souza et al. (2004) estudaram a comunidade endofítica da planta amazense *P. longiflora* e *S. cogens* e obtiveram 571 isolados de fungos endofíticos, entre eles, o gênero *Aspergillus* foi o de maior frequência de isolamento. Silva et al.(2006) analisaram a microbiota endofítica das folhas e caules da *Annona squamosa* e obtiveram 10 espécies *Aspergillus*.

Quatro isolados (2,99%) foram identificados pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, incluindo *Colletotrichum gloeosporioides*. Espécies de *Colletotrichum* foram descritas como endófitos de várias plantas medicinais como tais como *Copernicia prunifera*, *Anacardium occidentale*, *Mangifera indica*, *Spondias purpurea*, *Spondias tuberosa*, *Manihot esculenta*, *Malpighia emarginata*, *Punica granatum* e *Ricinus communis* (SURYANARAYANAN et al., 2000; BUSSABAN et al., 2001; GUO et al., 2001; PHOTITA et al., 2001; FREIRE et al., 2001; FARR et al., 2006; RAVIJARA et al., 2006; PHOMPUTTHA et al., 2007). Outras evidências filogenéticas obtidas por Suryanarayanan et al. (2000) em seus estudos indicaram que algumas espécies de *Colletotrichum* podem ocorrer tanto como endófitos quanto sapróbios.

### ***4.3 Cultivos, produção dos extratos e atividade antimicrobiana***

Todos os isolados de fungos endofíticos foram crescidos em BDA e 316 extratos brutos foram preparados. Além disso, foram produzidos 30 extratos das folhas e 30 de cascas de cada indivíduo (total de 60 extratos vegetais). O rendimento obtido dos extratos brutos variou de 0,11 a 0,35 mg/ml e foi suficiente para realização de todos os ensaios de triagem e determinação das suas respectivas CIM contra os micro-organismos alvos. Todos os 316 extratos obtidos, bem como os 60 extratos vegetais foram submetidos aos ensaios antimicrobianos e considerados ativos os que apresentaram valor de inibição  $\geq 60\%$ . Dentre os extratos fúngicos avaliados, 25 (8%) foram ativos contra pelo menos um dos micro-organismos alvos (Tabela 2). Entretanto, nenhum extrato foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*. Dos extratos ativos, 20 foram capazes de inibir o crescimento de *C. krusei*, 1 *E. coli*, 5 *C. albicans*, 2 *C. sphaerospermum* e 1

*Staphylococcus aureus*. Estudos de triagem utilizando fungos como fonte de metabólitos bioativos demonstram que a porcentagem de fungos ativos pode variar de 10 a 40% (HUANG et al., 2008; VAZ et al., 2009, ROSA et al., 2010; VIEIRA et al., 2012; CARVALHO et al., 2012). Desta forma, os valores de atividade encontrados neste trabalho podem ser considerados dentro da faixa obtida de outros estudos.

Dois extratos dos táxons *Pestalotiopsis* sp. UFMGCB 8390 e UFMCB 8307 apresentaram atividade antifúngica contra *C. krusei*. A atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Pestalotiopsis* é bem documentada com diferentes táxons caracterizados como produtores de metabólitos secundários com atividades fitotóxica, antioxidante, antifúngica e antitumoral (OLIVEIRA et al., 2011). Pereira et al. (2004) analisaram extratos do endófito *P. guepini* e obtiveram ação antibacteriana frente à *S. aureus*, a qual exibiu CIM de 125 µg/ml. Filho-Rodrigues et al. (2008) avaliaram a produção de substâncias voláteis de isolados de *Pestalotiopsis* sp. associados à *Murraya paniculata*, os quais foram capazes de inibir espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*.

O extrato de *Neofusicoccum* sp. UFMGCB8248 apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. krusei*. Além disso, o extrato de *Neofusicoccum* sp. UFMGCB8110 apresentou atividade antifúngica (94,5% de inibição) e CIM de 250 µg/ml contra *C. shaerospermum*. Espécies de *Neofusicoccum* são conhecidas como fitopatógenos em diferentes espécies lenhosas; entretanto, espécies do gênero também foram descritas como sapróbios e endófitos (PENNYCOOK & SAMUELS, 1985; PHILLIPS et al, 2002;. DENNAN et al, 2003; NIEKERK et al, 2004; SLIPPERS et al., 2004, SLIPPERS et al., 2007). Porém existem poucos relatos de espécies de *Neofusicoccum* como produtoras de substâncias antimicrobianas.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos obtidos da *Araucaria angustifolia*.

Código UFMGCB	Espécie	Micro-organismos alvos				
		Ec <sup>b</sup>	Sa <sup>c</sup>	Ck <sup>d</sup>	Ca <sup>e</sup>	Cs <sup>f</sup>
8206	<i>Cladosporium</i> sp.	0±0	0±13	<b>60±0 (125)</b>	40,5±1	0±5
8122	<i>Colletotrichum colombiense</i>	51,2±5	0±17	<b>60±0</b>	21±7	0±53
8400	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	13,4±4	0±2	<b>60,2±2</b>	32,8±5	0±4
8269	<i>Diaporthe rhusicola</i>	0±9	0±3	<b>61,2±2</b>	53,5±1	0±3
8161	<i>Muscodor</i> sp.	0±12	0±2	<b>64,3±4</b>	53,2±4	0±5
8110	<i>Neofusicoccum</i> sp.	8,7±1	0±18	11,1±2	35,2±2	<b>94,5±1 (250)</b>
8248	<i>Neofusicoccum</i> sp.	1±0	2±1	<b>63,5±1</b>	<b>67±7 (250)</b>	23±0
8114	Não identificado	0±2	0±9	<b>62,5±0</b>	<b>60,5±2</b>	0±3
8180	Não identificado	0±7	1±18	<b>67,1±0</b>	<b>72,8±1</b>	9±3
8270	Não identificado	0±2	3±3	<b>63,5±2</b>	59,3±1	0±3
8278	Não identificado	0±3	0±10	<b>61±1</b>	60,5±1	8±2
8173	Não identificado	34±6	8±0	<b>63,9±7 (250)</b>	45,8±9	8±0
8401	Não identificado	2±2	0±0	<b>61,5±2</b>	32,1±4	17,4±8
8096	Não Identificado	0±0	0±13	<b>63,1±0</b>	46,7±6	0±9
8190	Não identificado	1±2	0±2	<b>61,3±1 (250)</b>	9±2	45±8
8326	Não identificado	17±2	1±3	<b>66,7±1</b>	9±6	34,8±3
8137	<i>Penicilium sizovae</i>	0±0	4±10	<b>61,2±2</b>	17±12	0±18
8399	<i>Penicilium sumatrense</i>	0±3	0±2	<b>61,5±2</b>	49,2±2	45,6±9
8134	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3,1±10	0±3	<b>63,5±0</b>	45,1±10	0±1
8390	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	43,2±1	0±7	<b>65,5±2</b>	23,3±1	0,7±5
8330	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	2±0	18	<b>60±0</b>	7±0	9±9
8307	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0±3	0±8	<b>60,5±0</b>	38±7	9±8
8290	<i>Pezicula eucrita</i>	4±3	0±1	0±0	<b>100±0 (62,5)</b>	9±0
8203	<i>Trichoderma</i> sp.	<b>73,3±1</b>	<b>73,8± 13</b>	51,1±1	38,2±0	<b>67,1±8</b>

<sup>a</sup>UFMGCB = Código da coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, <sup>b</sup>*Escherichia coli* ATCC 11775, <sup>c</sup>*Staphylococcus aureus* ATCC 12600, <sup>d</sup>*Candida krusei* ATCC 6258, <sup>e</sup>*Candida albicans* ATCC 60193, <sup>f</sup>*Cladosporium shaerospermum* CCT 1740. Entre parênteses valores da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml.

O extrato do isolado *Muscodor* sp. UFMGCB8161 apresentou atividade inibitória frente *C. krusei*. Yuan et al. (2011) identificaram 2 isolados de *Muscodor* sp. capazes de produzir metabólitos voláteis com atividade antifúngica. Macías et al. (2010) detectaram uma mistura de compostos voláteis (COV) antifúngicos de *M. yucatanensis* isolado das folhas de *Bursera* sp. contra *Guignardia Mangifera*, *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici* e *P. parasitica*.

Os extratos do isolados *Penicillium sizovae* UFMGCB8137 e *Penicillium sumatrense* UFMGCB8399 foram ativos contra *C. krusei*. Espécies de *Penicillium* vem sendo citadas como endófitos produtores de metabólitos secundários bioativos e com potencial de aplicação na indústria farmacêutica e química, tais como esteróides produzidos por *Penicillium* sp., endófito de *Melia azedarach* (MARINHO; MARINHO; RODRIGUES FILHO, 2009). Wang et al. (2008) descreveram a atividade de metabólitos secundários de *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Hopea hainanensis*, relatando a ação destes contra *C. albicans*, *C. krusei* e *Aspergillus niger*.

O extrato do fungo *Trichoderma* sp. UFMGCB 8203 apresentou ação antifúngica contra *C. sphaerospermum*, bem como atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Ding et al. (2012) avaliaram a atividade de metabólitos secundários de endófitos isolados da planta medicinal chinesa *Panax notoginseng* e o extrato do *Trichoderma gamsii* apresentou atividade antibacteriana contra *E.coli*. Bae et al. (2011) isolaram *Trichoderma* sp. como endófito em raízes de *Capsicum annuum*, o qual apresentou capacidade inibitória frente ao fungo fitopatogênico *Phytophthora capsici*. O extrato de *Pezicula eucrita* UFMGCB8290 apresentou atividade antifúngica de (100%) contra *C. albicans* com CIM de 62,5 µg/ml. Yuan et al.(2011) avaliaram a diversidade e atividade antimicrobiana da comunidade endofítica associada à gimnosperma *Abies beshanzuensis* e encontraram 84 táxons; entre estes, *Pezicula sporulosa* foi a mais frequente e apresentou atividade antifúngica.

Dentre os extratos vegetais avaliados, 24 apresentaram inibição  $\geq 60\%$  contra *E. coli* e *C. sphaerospermum* (Tabela 3). Gadelha et al. (2006) estudaram o efeito da lectina extraídas das folhas e sementes da *A. angustifolia*, as quais foram submetidas a ensaios de sua atividade antimicrobiana contra as bactérias fitopatogênicas *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Estes autores encontraram lectinas produzidas por *A. angustifolia* com ação antibacteriana. Não houve relação de atividade

antimicrobiana entre os espécimes ativos de *A. angustifolia* com seus respectivos fungos endofíticos.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de extratos vegetais da *Araucaria angustifolia*.

Indivíduo <sup>a</sup>	Micro-organismos alvo					
	S.a <sup>b</sup>	Pa <sup>c</sup>	Ca <sup>d</sup>	CK <sup>e</sup>	Cs <sup>f</sup>	Ec <sup>g</sup>
01R	0±5	0±6	0±1	0±1	0±6	<b>70±2</b>
01C	5,5±2	0±24	1±10	0±19	0±33	<b>83,2±1</b>
04R	0±4	0±14	33,5±0	0±5	30,2±7	<b>76,5±8</b>
05R	0±3	0±10	15,2±3	0±9	49,6±10	<b>81,9±2</b> <b>91,4±6</b>
05C	0±3	0±1	0±3	0±4	0±22	<b>(250)</b>
06R	0±1	25,4±0	0±4	49,7±4	9±6	<b>69,9±5</b>
06C	21,9±20	0±3	0±1	7±0	25,1±8	<b>83,3±3</b>
08C	0±2	5,3±7	41,2±1	0±0	29,5±1	<b>62,1±5</b> <b>99,2±5</b>
09R	0±8	0±12	0±0	0±30	0±6	<b>(250)</b>
10R	0±12	50,2±1	0±5	40,2±4	8±4	<b>94,5±2</b>
10C	50,2±10	0±12	50,2±1	0±5	40,2±2	<b>75,6±2</b>
13R	0±5	0±11	4,6±0	0±6	0±12	<b>97,8±4</b> <b>97,6±4</b>
14R	0±5	0±2	0±1	0±3	12,3±4	<b>(250)</b> <b>96,6±3</b>
15C	0±5	0±1	3,1±1	0±5	46,4±14	<b>(250)</b>
18R	0±4	0±0	45±1	0±7	6,9±4	<b>85,4±2</b> <b>97,9±5</b>
18C	0±0	3,8±16	39,9±2	0±5	46±28	<b>(125)</b>
19R	0±5	0±38	0±1	0±4	9,4±5	<b>92±4</b>
19C	0±5	7,2±19	26,9±1	0±1	60,9±1	<b>67,9±10</b>
20R	0±9	0±2	39±3	0±3	21,7±16	<b>93±5</b>
21R	29±6	0±39	40,9±1	0±54	0±3	<b>87,9±5</b>
21C	44,8±9	0±52	30,5±0	0±3	0±8	<b>78,9±7</b> <b>88,9±6</b>
22C	0±0	10,3±5	0±1	0±1	0±4	<b>(250)</b>
23R	0±6	0,4±7	13,7±7	0±0	51,9±10	<b>78,9±5</b>
25R	0±6	0±7	10,8±4	9,8±31	14±5	<b>90,8±1</b>
25C	0±7	4,2±31	23,6±1	0±3	0±75	<b>75,4±3</b>
27R	0±9	0±13	8,9±4	0±6	2,8±9	<b>88,9±7</b>
28R	0±3	0±6	18,6±8	0±1	18,9±5	<b>92,3±3</b>
28C	0±4	0±13	25,2±1	0±3	48,5±7	<b>90,9±6</b>
29R	0±4	0±18	17,1±8	0±10	0±4	<b>88,6±4</b>
30R	0±1	3,9±4	34,5±1	0±2	0±9	<b>85,8±9</b>

<sup>a</sup>Indivíduos, <sup>b</sup>*Staphylococcus aureus* ATCC 12600 *Pseudomonas aeruginosa*, <sup>d</sup>*Candida albicans* ATCC 60193, <sup>c</sup>*Candida krusei* ATCC 6258, <sup>f</sup>*Cladosporium shaerospermum* CCT 1740, <sup>e</sup>*Escherichia coli* ATCC 11775. Entre parênteses valores da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml.



## 5 Conclusão

Fungos endofíticos constituem uma riqueza em termos de diversidade e patrimônio genético em ecossistemas tropicais. A habilidade destes fungos em crescer em substratos simples e de baixo custo, bem como sua capacidade de produzir diversos metabólitos, tem despertado o interesse para o uso biotecnológico desses micro-organismos quanto a produção de metabólitos secundários bioativos. A partir dos resultados obtidos neste estudo, *A. angustifolia*, a única gimnosperma endêmica do Brasil, pode ser considerada uma rica fonte de fungos endofíticos tropicais, os quais demonstraram capacidade de produzir metabólitos bioativos e podem ser explorados como fontes de moléculas antimicrobianas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas.

### **PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO**

Como resultado deste estudo foram apresentados 3 trabalhos no XXI Congresso Latino-americano de Microbiologia (XXI ALAM), Santos, São Paulo, Novembro de 2012:

- Ação bactericida de extratos vegetais extraídos da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze presentes em Minas Gerais.
- Bioprospecção de substâncias bioativas com propriedades antifúngicas de fungos endofíticos de *Araucaria angustifolia* presentes em Minas Gerais.
- Bioprospecção de substâncias bioativas de fungos endofíticos com ação antibacteriana obtidos da *Araucaria angustifolia* presentes no estado de Minas Gerais.

## 6 Referências bibliográficas

- AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E. Two novel eremophilane sesquiterpenes from an endophytic Xylariaceae fungus isolated from leaves of *Cupressus lusitanica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 21, n. 8, p. 1446-1450, 2010.
- ANGELI, Aline. *Araucaria angustifolia* (Araucaria). Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP, 2003. Disponível no site do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba/SP.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVAL, P. T. Manual de isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba, 86p., 2002.
- ARDI, R.; KOBILER, I.; JACOBY, B.; KEEN, N. T.; PRUSKY, D. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 53, n. 5-6, p. 269-285, 1998.
- 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.). *Journal of Invertebrate Pathology* v. 96, p. 34-42, 2007.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, v. 3, p. 267-274, 2007.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasil Bot*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.
- AZEVEDO, J.L. 1999. Microrganismos endofíticos. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA. p. 117-137.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; LUIZ DE ARAÚJO, W. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, v. 46, p. 1-3, 2008.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- BACHMANN, J; ZIEROLD, R; PHIL, Y,T,C; HAUERT, R; PHYS-DIPL, C,S; GRUNDSCHMIDT, R; RHEINLANDER, B; GRUNDMANN, M; GOSELE, U; NIELSCH, K. Selbstkatalytische Atomlagenabscheidung von Siliciumdioxid. *Angewandte Chemie*. Volume 120, Issue 33, p. 6272-6274, August 4, 2008.
- BAE, H.; SICHER, R.C.; KIM, M.S.; KIM, S.H.; STREM, M.D.; MELNICK, R.L.; BAILEY, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009.
- BAKER S, HARDY J, SANDERSON KE, QUAIL M, GOODHEAD I, KINGSLEY R. A novel linear plasmid mediates flagellar variation in *Salmonella* Typhi. *PLoS Pathog*. 2007.
- BASSO, Clarissa Maria Grezzana. A araucária e a paisagem do planalto sul brasileiro. *Revista de Direito Público*. Londrina, v. 5, n. 2, p. 1-11, ago. 2010, p. 5.

- BARBOSA, M.A., 1958. O carvão do entrecasco *Hypoxylon mediterraneum* (de Not.) Ces. et de Not. Contribuição para o seu estudo. Publicações da Direcção Geral dos Serviços Florestais e Aquícolas XXV : 93-132.
- BAYAT, F.; MIRLOHI, A.; KHODAMBASHI, M. Effects of Endophytic Fungi on Some Drought Tolerance Mechanisms of Tall Fescue in a Hydroponics Culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 56, n. 4, pp. 510-516, 2009.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany* 98(3): 426–438. 2011.
- BROWN KB, KD Hyde, Visitante DI. 1998 Estudos preliminares sobre comunidades de fungos endofíticos de *Musa acuminata* complexo de espécies em Hong Kong e Austrália diversidade de fungos 1: 27 - 51.
- BRUNATI, m.; ROJAS, j.l.; SPONGA, f.; CICILIATO, i.; LOSI,d.; GOTTLICH, e.; HOOG, s.; Genilloud, o.; Marinelli, f. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics*, v. 2, p. 43–50, 2009.
- BUTLER, M. R. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, p.2141-2153, 2004.
- CAFEU, Mariana C. et al . Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Quím. Nova*, São Paulo, v. 28, n. 6, Dec. 2005
- CALIXTO, I. Workshop sobre fármacos & medicamentos. *Cadernos de Estudos Avançados*, Fiocruz, v. 2, p.59-75, 2005.
- CAMPOS, José María & CARIBÉ, José. Plantas que ajudam o homem: um guia prático para a época atual. *Pensamento*, 2002. p. 105
- CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira/ Paulo Ernani Ramalho Carvalho; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – Colombo: EMBRAPA – CNPF; Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994.
- CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho; MEDRADO, Moacir José Sales & HOEFLICH, Vitor Afonso. Cultivo do pinheiro-do-paraná. *Embrapa Florestas, Sistemas de Produção*, 7. Versão Eletrônica, Jan./2003.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p.181-184, 1967.
- CASTILLO, U.F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; HESS, W.M.; EZRA, S.; PACHECO, G.; EZRA, D. Biologically Active Endophytic Streptomycetes from *Nothofagus* spp. and Other Plants in Patagonia. *Microbial Ecology*, v. 53, p. 12-19, 2007.
- CASTILLO, U.F., J.K. HARPER, G.A. STROBEL, J. Sears; K. Alesi. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* NRRL 30566, an endophytic of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 224: 183-190.
- CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. *Mycologia*. v.81, p.1-19, 1989
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, v.432,p.829-837,2004.
- COLLADO, J.; PLATAS, G.& PELÁEZ. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from central Spain. *Nova Hedwigia*. V, 63, p.347-360, 1996.
- CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, v. 55, p.463-480, 2000.

- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, v.77, n.1, p.7-24, 2005.
- CREMASCO, M.A., B.J. HRITZKO & N.H. LINDA Wang. Experimental purification of paclitaxel from a complex mixture of taxanes using a simulated moving bed. Brazil. *J. Chem. Eng.* 2009. 26: 207-218.
- CROUS PW; BRAUN U, K Schubert; Groenewald JZ. 2007b Delimitação *Cladosporium* de gêneros morfológicamente semelhantes *Estudos em Micologia*
- DAVITT, A. J.; STANSBERRY, M.; RUDGERS, J. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist*, v. 188, p. 824-834, 2010.
- DAISY, B., STROBLE, G., EZRA, D., CASTILLO, U., BAIRD, G. & HESS, W. M. (2002). *Muscodor vitigenus* sp. nov., an endophyte from *Paullinia paullinoides*. *Mycotaxon* **84**, 39–50.
- DINGLE, J.; P.A. MCGEE. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f.sp. tritici in wheat. *Mycol. Res.* 2003, 107: 310-316.
- EL-MORSY EM. Fungos isolados da endorhizosphere de plantas halofytic da costa do Mar Vermelho do Egito diversidade fúngica 2000. 5: 43 - 54...
- EZRA, D.; STROBEL, G.A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobial produced by *Muscodor albus*. *Plant Science*, v. 165, p. 1229-1238, 2003.
- FARJON, Aljos. 1998. World Checklist and Bibliography of Conifers. Richmond, U.K.: *Royal Botanical Gardens at Kew*.
- FELLER, I.C. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological Monographs*, v. 65, p. 477-505, 1995.
- FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 73-79, 2006.
- FIRAKOVA, S., M. STURDIKOVA and M. MUCKOVA. Bio-active secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia* 2007. 62: 251-257.
- FRANCO, I.J.; FONTANA, V.L. Ervas & plantas: a medicina dos simples. Erechim: *Imprimax*, 1997. 177p.
- GADELHA, C. Sistema produtivo: Complexo Industrial da Saúde. *Projeto Perspectivas do Investimento no Brasil*, Rio de Janeiro, 2009.
- GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 52, p. 9-15, 2009.
- GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica*, Bulgária, v. 5, p. 1-4, 2008.
- GALLUCCI, N, Casero C, OLIVA, M, ZYGADLO, J, Demo M. Interactions between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta lactam antibiotics. *Mol Med Chemistry* 2006; 10: 30-2.

- GANDAVI, V. & J. Muthumary. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008. 24: 717-724.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plants-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and applications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 509-526, 2005.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 136- 142, 2008.
- HAMAYUN M; KHAN SA; IQBAL; AHMAD B, LEE IJ. Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium sp.* MH7) and growth promotion of Crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*). *J Microbiol Biotechnol.* 2010 Jan;20(1):202-7.
- HAWKSWORTH, David L. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.*, Madrid, Spain, v. 105, n. 12, p.1422-1432, 14 dez. 2001.
- HOFFMAN, M. T.; ARNOLD, A. E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*, v. 112, p. 331-344, 2008.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 31, p. 163-167, 2001.
- HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, v.33, p.163-173, 2008.
- INACIO, M.L.; G.H. SILVA; H.L. TELES; H.C. TREVISAN; A.J. CAVALHEIRO. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (Lauraceae). *Bioch. Syst. Ecol.* 2006, 34: 822-824.
- ISTIFADAH, N. & P.A. McGEE. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Aust. Plant Path.* 2006, 35: 411-418.
- IWEN PC, KELLY dm, REED EC, HINRICHS SH. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *Clin Infect Dis.* 1995;
- JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2011.
- KEE P. Ng; SU M. Y; CHAI L, C.; TUCK, S S-H, SHIANG, L, N; HAMIMAH, H; YUN, F,N; CHEE-CHOONG H; KOK-WEI; WAI-YAN. Sequencing of *Cladosporium sphaerospermum*, a Dematiaceous Fungus Isolated from Blood Culture Journal List . *Eukaryot Cell.*v.11(5); May 2012.
- KIM, H.Y.; G.J. CHOI; H.B. LEE; S.W. LEE; H.K. KIM. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007, 44: 332-337.
- KOBAYASCHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: C.W.BACON & J.F. WHITE (ed.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, p. 199-236, 2000.

- KOGEL, K-H.; FRANJKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite-what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, v.9, p.358-363, 2006.
- KUMARAM, R.S.; J. MUTHUMARY; B.K. HUR. Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Eng. Life Sci.* 2008, 8: 438-446.
- KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, v. 9, p. 81-91, 2002.
- LEVY, SB (2005), de resistência a antibióticos intensifica os problemas. *Adv. Drogas. Deliv. Rev.*, **57**, 1446-1450.
- LI, J.Y.; G.A. STROBEL; R. SIDHU; W.M. HESSE. Ford. Endophytic taxol producing fungi from bald cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology*, 1996. 142:
- LINNAKOSKI, R.; PUHAKKA, H.; PAPPINEN, A. Endophytic fungi isolated from *Khaya anthotheca* in Ghana. *Fungal Ecology*. v.12, n.3, p.444-453, 2011.
- LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, v. 105, p. 548-554, 2007.
- LIU, J.Y.; SONGA, Y.C.; ZHANGA, Z.; WANGA, L.; GUOB, Z.J.; ZOUA, W.X.; TANA, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, v. 114, p. 279–287, 2004.
- LIX, X., M. DONG, X. CHEN, M. JIANG, X. Lv; G. Yan. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem.*, 2007. 105: 548-554.
- MACÍAS-RUBALCAVA, M.L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B.E.; OROPEZA, F.; DUARTE, G.; GONZÁLEZ, M.C.; GLENN, A.E.; HANLIN, R.T.; ANAYA, A.L. Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodora yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *J Chem Ecol*, v. 36, p. 1122-1131, 2010.
- MAGALHÃES WCS, MISSAGIA RV, COSTA FAF, COSTA MCM (2008) Diversidade de fungos endofíticos em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) *MacLeish. Cerne* 14: 267-273.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Revista Ciências Exatas e Naturais*, Santa Cruz, v. 9, n. 2, p. 189-199, 2007.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae), *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1710-1712, 2009.
- MARTINEZ m, LOPEZ-Ribot JI, KIRKPATRICK WR, COCO BJ, BACHMANN SP, PATTERSON TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. *J Clin microbiol.* 2002.
- MÉNDEZ-ZAVALA, A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., LARA-VICTORIANO, F., RODRIGUÉZ-HERRERA, R., AGUILAR, C.N. Producción fúngica de un pigmento rojo

- empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6: 267-273, 2007
- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, J.E; ESPÍNDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p.165-170, 2007.
- MAYER AMS; GLASER KB; CUEVAS C; JACOBS RS; KEM W; LITTLE RD; et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010;31(6):255-65.
- MUSSI-DIAS, V et al . Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Rev. bras. plantas med.*, Botucatu, v. 14, n. 2, 2012.
- MUTHUVELAN, B.; RAJA, R.B. Studies on the efficiency of different extraction procedures on the anti microbial activity of selected medicinal plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of newdrugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v.66, p.1022-1037,2003.
- OLIVEIRA, Marilene N et al . Novel anthraquinone derivatives produced by *Pestalotiopsis guepinii*, an endophytic of the medicinal plant *Virola michelii* (Myristicaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 22, n. 5, May 2011
- OSÉS, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; SANFUENTES, E.; RODRIGUEZ, J. Fungal endophytes in xylem of healthy chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, v. 33, p. 77- 86, 2008.
- PANDI, M.; R. MANIKANDAN; . MUTHUMARY. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. *Biomed. Pharmacother*. 2010, 64: 48-53.
- PASTRE, R; MARINHO, A. M. R. ; FILHO-RODRIGUES.E; SOUZA. A. Q. L.; PEREIRA J.O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* E *Murraya paniculata*. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 8, 1867-1871, 2007.
- PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, v. 30, p. 981-990, 2006.
- PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JOGE, A. O. C.; UENO, M. *Rev.Saúde Pública*. 38 (2): 326-328, 2004.
- PETERS, A.F. Field and culture studies of *Streblonema-Macrocytis* new species *Ectocarpales Phaeophyceae* from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. *Phycologia*, v. 30 p. 365-377, 1991.
- PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*. v.1, p.185-196, 1992.
- PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 48, p. 367-372, 2006.
- PHONGPAICHIT, S.; NIKOM, J.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROJ, J.; HUTADILOKTOWATANA, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; KIRTIKARA, K.

- Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. *Immunology Medical Microbiol*, v. 51, p. 517-525, 2007.
- QIU-XIA.C .Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium sphaerospermum*. *Mycoses* 2008. 51:79–80
- RAKOTONIRIANA, E. F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E. J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A. M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007.
- REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, T.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, v. 298, 2002.
- REITHINGER, R.; DUAJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*, v. 7, n.9, p. 581–96, 2007.
- RIESEN T, T. 1985 Sieber fungos endofíticos em trigo de inverno (*Triticum aestivum* L.) Instituto Federal Suíço de Tecnologia, em Zurique.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, v. 151, p. 341–353, 2001.
- ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAN, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolites production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 55, p. 284-289, 2001.
- RODRIGUES, K. F. & SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, v. 39, p.131-135, 1999.
- ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p.967-974, 2003.
- ROSA, L.H.; VIEIRA, M.L.A.; SANTIAGO, I.F.; ROSA, C.A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 73, p. 178-189, 2010.
- SAIKKONEM, N.K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.J.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 29, p.319-343, 1998.
- SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 19, p. 767-770, 2003.
- SANTOS, L.S. et al . Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. *Planta daninha*, Viçosa, v. 26, n. 3, 2008.
- SANTIAGO, C; FITCHETT, C; MUNRO, M. H. G.; JALIL, J.; SANTHANAM, J. Cytotoxic and Antifungal Activities of 5-Hydroxyramulosin, a Compound Produced by an Endophytic Fungus Isolated from *Cinnamomum mollissimum*. *Evidence-Based*



- Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 689310, 6 pages, 2012.
- SCHUBERT K, U B, GRONEWALD JZ, CROUS PW. Cladosporium folha mancha e podridão de Paeonia spp. causada por Dichocladosporium chlorocephalum gen. novembro. *Estudos em Micologia*. 2007. 58: 95-104.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Reserch*, v.109, p. 661- 686, 2005.
- SCHUTZ, B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *British Mycological Society, International Symposium Proceedings, Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation*, University of Wales, Swansea, 2001.
- SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, v.327, p.639-648, 2004.
- SETTE, L.D.; PASSARINI, M. R. Z., DELARMELINA, C. SALATI, F.; DUARTE, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p.1185-1195, 2006.
- SHARMA, R.; KATOCH, M.; SRIVASTAVA, P.S.; QAZI, G.N. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:2083–2094, 2009.
- SILVA, Geraldo H. et al . Citocalasinas produzidas por Xylaria sp., um fungo endofítico de Piper aduncum (piperaceae). *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 10, 2010.
- SOCA-CHAFRE, G.; RIVERA-ORDUÑA, F.N.; HIDALGO-LARA, M.E.; HERNANDEZ RODRIGUEZ, C.; MARSCH, R.; FLORES-COTERA, L.B. Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. *Fungal Biology*, v. 115, p.143- 156, 2011.
- 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 de amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* benth. *Acta Amazônica*, v.31, p. 185-195, 2004.
- SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, Thailand, v. 1, n. 1, p. 67-80, jun. 2005.
- STINSON, A. M., ZIDACK, N. K., STROBEL, G. A. & JACOBSEN, B. J.(2003b). Effect of mycofumigation with *Muscodor albus* and *Muscodor roseus* on seedling diseases of sugarbeet and *Verticillium* wilt of eggplant. *Plant Dis* 87, 1349–1354
- STONE, J.K., BACON, C.W. & WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C.W. BACON & J.F. WHITE (Ed.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker.pp. 3-30, 2000.
- STROBEL, G.; MILLER, R.V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; HESS, W.M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology*, v.145, p.1919-1926, 1999.

- STROBEL, G.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v.5, p.535-544, 2003.
- STROBEL, G.A.; W.M. HESS; J.Y. Li; E. FORD; J. SEARS; R.S. SIDHU; B. SUMMERELL. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Aust. J. Bot.* 1997, 45: 1073-1082.
- STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, Great Britain, v. 142, p. 435-440, 1996.
- STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, v.5, p.39-41, 2000.
- SURYANARAYANAN TS; THIRUNAVUKKARASU N; GOVINDARAJULU MB, SASSE F; JANSEN R; MURALI TS. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*. 2009;In Press, Corrected Proof.
- TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, p. 448-459, 2001.
- TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, v.142, p. 335-346,1999.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: *Atheneu*, 2008. 780 p.
- UECKER FA (1988) A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir* 13: 1-231.
- UREN J.M.; DALLING, J.W.; GALLERY, R.E.; MADDISON, D.R.; DAVIS, E.C.; GIBSON, C.M.; ARNOLD, A.E. Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analyzing fungal environmental samples. *Mycological Research*, v.113, p. 432-449, 2011.
- URIZAR, N. L; LIVERMAN, A. B.; DODDS, D. T.; SILVA, F.V.; ORDENTLICH, P.;YAN, Y.; GONZALEZ, F. J.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; MOORE, D. D;A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligant for FXR. *Science*,v.296, p.1703-1706, 2002.
- VAN DER AA HA, VANEV S (2002) A revision of the species described in *Phyllosticta*. In: APTROOT A, SUMMERBELL RS, VERKLEY GJ (eds) Centraalbureau voor Schimmelcultures in Utrecht. *The Netherlands* p. 502.
- VASCONCELOS, Silvânia Maria Mendes et alii. Central action of *Araucaria angustifolia* seed lectin in mice. *Epilepsy & Behavior*. Volume 15, nº 3, jul 2009. pp. 291-293.
- VAZ, A.B.M.; BRANDÃO, L.R.; VIEIRA, M.L.A.; PIMENTA, R.S.; MORAIS, P.B.; SOBRAL, M.E.G.; ROSA, L.H.; ROSA, C.A. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. *African Journal of microbiology research*, (in press). 2012.
- VEEPORTE R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, v. 52, p.253-262, 2000.

- VERDINE, G. L. The combinatorial chemistry of nature. *Nature*, v.384, p.11-13 (supplement), 1996.
- VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, Apr. 2006.
- VIEIRA, M.L.A.; HUGHES, A.F.S.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A; 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*). *Canadian Journal of Microbiology*, v.58, p.54-66. 2012.
- VIZCAÍNO, J. A.; SANZ, L.; BASILIO, A.; VICENTE, F.; GUTIÉRREZ, S.; HERMOSA, M. R.; MONTE, E. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*, v. 109, p. 1397-1406, 2005.
- YUAN ZL, SU ZZ, MAO LJ, PENG YQ, YANG GM, LIN FC, ZHANG CL. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of Muscodor (*Xylariaceae*). *J Microbiol.* 2011 Feb;49(1):15-23
- YU, B-Z.; ZHANG, G-H.; DU, Z-Z.; ZHENG, Y-T.; XU, J-C.; LUO, X-D. Phomoeuphorbins A–D, azaphilones from the fungus *Phomopsis euphorbiae*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 2523–2526, 2008.
- WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 79- 83, 2006.
- WILSON, D. Endophyte - the evolution of a term, and clarification. *Oikos*, v. 73, p. 274-276, 1995.
- ZARDO V, MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. News laboratory. 2004
- ZHANG, B.; SALITURO, G.; SZALKOWSKI, D.; LI, Z.; ZHANG, Y.; ROYO, I.; VILELLA, D.; DÍEZ, M. T.; PELAEZ, F.; RUBY, C.; KENDALL, R. L.; MAO, X.; GRIFFIN, P.; CALAYCAY, J.; ZIERATH, J. R.; HECK, J. V. SMITH, R. G.; MOLLER, D. E. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, v. 284, p. 974-977, 2009.
- ZHANG, Y.; WANG, S.; LI, X-M.; CUI, C-M.; FENG, C.; WANG, B-G. New Sphingolipids with a Previously Unreported 9-Methyl-C20-sphingosine Moiety from a Marine Algous Endophytic Fungus *Aspergillus niger* EN-13. *Lipids*, v. 42, p. 759–764, 2007.
- ZHANG, W.; KROHN, K.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Bioactive Isocoumarins Isolated from the Endophytic Fungus *Microdochium bolleyi*. *J. Nat. Prod.*, v. 71, p. 1078–1081, 2008.
- WANG, B.; PRIEST, M. J.; DAVIDSON, A.; BRUBAKER, C. L.; WOODS, M.J.; BURDON, J.J. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. *Mycological Research*, v. 111, p. 347-354, 2007.

- WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in fungal fermentations, *Biotechnology Advances*, 23: 115–129, 2005.
- WANG, F.W., R.H. JIAO; A.B. CHENG; S.H. TAN; Y.C. SONG. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 23: 79-83.
- WANI , M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E. ;COGGON, P; MCPHAIL, A.T. .. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 1971. 93: 2325-2327.
- WEI, J.G.; XU, T. *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. *Fungal Diversity* v. 15, p. 247-254, 2007.
- WORAPONG, J., STROBEL, G. A., FORD, E. J., Li, J. Y., BAIRD, G. & HESS, W. M. (2001). *Muscodora albus* anam. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* **79**, 67–79.