

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas
medicinais do cerrado**

Isabel Cristina Otto Gonçalves

Belo Horizonte

2013

Isabel Cristina Otto Gonçalves

**Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas
medicinais do cerrado**

Monografia apresentada ao departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos– ICB/UFMG.

Co-orientadora: MSc. Camila Rodrigues de Carvalho
Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos– ICB/UFMG.

Belo Horizonte

2013

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela sua infinita bondade, misericórdia e por me sustentar diante dos obstáculos e dificuldades.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação.

A Msc. Camila Rodrigues Carvalho pela dedicação, paciência e orientação, suas contribuições foram valiosas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Especialização em Microbiologia e funcionários do departamento, Douglas, Gina e Thiago, pelos ensinamentos, ajuda e atenção.

Aos meus colegas de classe pelo aprendizado.

As minhas Amigas, Katia Rocha, Karina Nunes, Isabel Martins, Carolina Lobão, Juliana Colmenero, pelas boas risadas, pelo companheirismo e pelo carinho durante toda esta jornada.

Aos Professores e Amigos de trabalho da Pontifícia Universidade Católica pelo carinho, exemplo de profissionalismo, dedicação e amor à Educação e a Biologia.

A minha família e esposo pela compreensão, amor e carinho, pois sem vocês a conquista deste sonho não seria possível.

“Os conhecimentos nos dão meios para viver. A sabedoria nos dá razões para viver”.
(Rubem Alves)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. OBJETIVO GERAL	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3. METODOLOGIA	12
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
4.1 FUNGOS: UMA VISÃO GERAL DA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA....	13
4.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	17
<i>4.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</i>	<i>17</i>
<i>4.2.3 DIVERSIDADE E POTENCIALIDADE DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA A BIOPROSPECÇÃO.....</i>	<i>23</i>
<i>4.2.4 ISOLAMENTO, CULTIVO E PRODUÇÃO DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....</i>	<i>27</i>
4.3 DIVERSIDADE DE PLANTAS NO BRASIL	32
<i>4.3.1 PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO.....</i>	<i>34</i>
4.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS NATIVAS E OU DE OCORRÊNCIA NO CERRADO: POTENCIAL PARA BIOPROSPECÇÃO	39
5. CONCLUSÃO	46
6. BIBLIOGRAFIA	47

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AMBIENTE “TÍPICAMENTE CRIPTOGÂMICO”, DOMINADO POR FUNGOS. NESTA FIGURA É POSSÍVEL VERIFICAR AS MAIS DIVERSAS FORMAS E INTERAÇÕES COM O MEIO AMBIENTE (PARASITAS, SAPRÓBIOS E SIMBIONTES). PELO MENOS UMA ESPÉCIE DE CADA GRUPO É REPRESENTADA. A - B: *MYXOMYCOTA*; C: MICÉLIO; D – M: *ASCOMYCOTA*; N – P: LIQUENS; R - S: *ZYGOMYCOTA*; T – Z: *BASIDIOMYCOTA* (*GASTEROMYCETES*); 1 – 15: *BASIDIOMYCOTA* (OUTROS). MODIFICADO DE PUTZKE E PUTZKE, 2004..... 14
- FIGURA 2: A FIGURA INDICA O AUMENTO CONSTANTE NO NÚMERO DE PESQUISAS E PUBLICAÇÕES RELACIONADAS A PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS (ALY ET AL., 2010)..... 18
- FIGURA 3: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS. AS SETAS PRÓXIMAS E NO INTERIOR DE ESTÔMATOS DE FOLHAS DE CITROS REFEREM-SE A CÉLULAS LEVEDURIFORMES. A IMAGEM REPRESENTA UMA PORTA DE ENTRADA NATURAL PARA OS FUNGOS ENDOFÍTICOS (MACCHERONI, ARAÚJO E LIMA, 2010)..... 20
- FIGURA 4: ESQUEMA SOBRE A HIPÓTESE DE ANTAGONISMO BALANCEADO ENTRE PLANTA-FUNGO. APRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES COM ÊNFASE EM FUNGOS ENDOFÍTICOS. (A) MOSTRA A HIPÓTESE ANTAGONISMO EQUILIBRADO; (B) DOENÇA CAUSADA POR FUNGOS PATOGÊNICOS; (C) A RECIPROCIDADE ENDOFÍTICO- PATÓGENO. O PONTO DE INTERROGAÇÃO (?) INDICA QUE ESTE FENÔMENO PODE NÃO SER UNIVERSAL, E MAIS PESQUISAS SÃO NECESSÁRIAS PARA CONFIRMAÇÃO; (D) PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS POR PLANTA E FUNGOS; (E) SINERGIA EQUILIBRADA (KUSARI ET AL., 2012) 22
- FIGURA 5: A- PLACA DE PETRI PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS COM FRAGMENTOS DE FOLHAS EM MEIO DE CULTURA BDA; B – CRESCIMENTO DE DIFERENTES COLÔNIAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DO TECIDO DE ISOLAMENTO; C- COLÔNIAS FÚNGICAS PURIFICADAS (FONTE: A- I.C. OTTO; B - [HTTP://WWW.ESALQ.USP.BR](http://www.esalq.usp.br); C- [HTTP://WWW.UFF.BR/RVQ](http://www.uff.br/rvq)). 29
- FIGURA 6: ESQUEMA DE METODOLOGIA SUGERIDA PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS. A: METODOLOGIA BÁSICA DE ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS; B: METODOLOGIA BÁSICA PARA ENSAIO BIOLÓGICO: CULTIVO, OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

BRUTOS, ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS E TESTES FUNCIONAIS. MODIFICADO DE CHAPLA, BIASETTO E ARAUJO, 2012.....	31
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO DA EXTENSÃO DO BIOMA CERRADO NO BRASIL (SANO ET AL., 2007).....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: APLICABILIDADE DE PRODUTOS FÚNGICOS NA INDÚSTRIA.	16
TABELA 2: EXEMPLOS DE ALGUNS PAÍSES MEGADIVERSOS ORDENADOS POR MAIOR NÚMERO ABSOLUTO DE ESPÉCIES ENDÊMICAS OU PELO NÚMERO TOTAL DE ESPÉCIES DE PLANTAS VASCULARES.	33
TABELA 3: INDICAÇÕES POPULARES DE RAIZEIROS DE ESPÉCIES DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO DE USO MEDICINAL.	36

RESUMO

Os fungos são organismos que apresentam uma diversidade morfológica e fisiológica, sendo amplamente utilizados em processos biotecnológicos. Neste grupo destacam-se os micro-organismos classificados como endofíticos. Os fungos endofíticos são aqueles que, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais sem causar sintomas aparentes de doença e podem ser encontrados em diferentes tipos vegetais, desde gramíneas a árvores de grande porte, sendo que de uma única espécie vegetal pode-se isolar um expressivo número de fungos. Estes micro-organismos desempenham um importante papel nas relações do seu hospedeiro vegetal com o meio abiótico e biótico e possuem propriedades como a capacidade de produzir metabólitos idênticos ou semelhantes aos de seus hospedeiros e metabólitos distintos. Esta capacidade os tornaram uma promissora e interessante ferramenta nas aplicações biotecnológicas, como na produção de antibióticos, agentes de controle biológico de pragas e doenças vegetais, bioherbicidas, vetores para inserção de genes de interesse em plantas hospedeiras e produção de fito hormônios. Diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de conhecer a diversidade e a potencialidade dos fungos endofíticos para a produção de novos fármacos, podendo destacar os estudos relacionados à bioprospecção de fungos isolados de plantas medicinais. Neste contexto o ecossistema brasileiro é uma fonte promissora para a descoberta de novos fungos endofíticos associados principalmente a espécies vegetais de uso medicinal, pois o país além de possuir uma diversidade vegetal, possui uma significativa e alta taxa de endemismo de espécies. O Cerrado brasileiro destaca-se dentre os diversos biomas encontrados no Brasil, por apresentar características únicas que refletem em sua vegetação, bem como por existir uma deficiência em estudos sobre sua diversidade vegetal e a diversidade química pertencente a estas espécies, assim como pelos fungos associados a elas. Desta forma a busca por metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados principalmente a plantas medicinais do cerrado ganha espaço e se faz necessária, ao considerar estes micro-organismos como uma fonte inesgotável de novas estruturas de importância farmacológica.

Palavras Chave: Fungos Endofíticos, Plantas Mediciniais, Cerrado.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da incidência de infecções microbianas, bem como o surgimento de novas doenças somado a resistência de micro-organismos patogênicos aos medicamentos atuais, reforçam a importância de estudos de bioprospecção. Considerando que, por milhares de anos, os produtos naturais têm desempenhado um importante papel em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas, as plantas medicinais e os micro-organismos se apresentam como uma importante ferramenta de estudo, a fim de obter novas moléculas bioativas que sirvam como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Produtos naturais, ou seja, compostos químicos ou substância com atividade biológica produzidos por fungos endofíticos, aqueles que vivem assintomaticamente no interior de tecidos vegetais, têm sido descritos como capazes de inibir ou matar uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos que afetam humanos e animais, como bactérias, fungos, vírus e protozoários. Estes micro-organismos podem ser encontrados em diferentes tipos vegetais, desde gramíneas a árvores de grande porte, e são de grande importância biotecnológica, uma vez que, além de novos fármacos e agroquímicos, podem atuar como agentes de controle biológico.

A literatura sobre o tema afirma que é possível isolar de uma única espécie vegetal um expressivo número de fungos endofíticos e que todas as plantas estudadas até o momento possuem tais micro-organismos. Baseando-se nestes dados é de extrema relevância estudos que busquem a extensão da variabilidade de espécies endofíticas, tipos de associações existentes entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras, bem como o conhecimento de seus produtos secundários (metabólitos) provenientes ou não da interação com o vegetal.

As plantas medicinais exercem importância fundamental para a humanidade, sendo utilizadas pela medicina clássica e popular como fitoterápicos, em substituição aos medicamentos sintéticos e apresentam elevados teores de óleos essenciais, os quais são empregados nas indústrias. Neste contexto o ecossistema brasileiro é uma fonte promissora para a descoberta de novos fungos. A probabilidade de se encontrar fungos endofíticos capazes de produzir substâncias bioativas com atividade biológica é alta, uma vez que o Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas – quase 20 por cento da flora mundial.

Trabalhos demonstram que algumas propriedades medicinais atribuídas aos vegetais podem estar relacionadas ao produto do metabolismo secundário de seus fungos endofíticos, como por exemplo, a descoberta de que o antitumoral taxol (ou paclitaxel), não era produzido

exclusivamente pelo vegetal *T. brevifolia*, mas também pelo fungo endofítico *T. andreana*. Do ponto de vista ecológico, esta descoberta possibilita minimizar as limitações associadas com a produtividade e vulnerabilidade de espécies vegetais (perigo de extinção) como fontes de novos metabólitos. Além de ser economicamente mais viável e prático utilizar o fungo endofítico como produtor da substância em questão, uma vez que métodos tradicionais de extração do taxol a partir das cascas de *T. brevifolia* são ineficientes e caros: 1 kg de taxol é suficiente para tratar apenas 500 pacientes, e sua produção requer 10 toneladas de casca ou 300 árvores.

Considerando que um dos critérios utilizados para seleção de plantas a fim de isolar fungos endofíticos é o seu uso como fonte medicinal, comprovada cientificamente ou apenas de uso popular, se faz necessário estudos que visem à diversidade e bioprospecção de novas moléculas bioativas oriundas deste grupo de micro-organismos associados a plantas medicinais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento bibliográfico sobre a diversidade e o potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas medicinais do cerrado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Discorrer sobre a importância ecológica e biotecnológica dos fungos em geral, dando enfoque aos fungos endofíticos;
- Mostrar o papel das interações dos fungos endofíticos com seus hospedeiros e sua capacidade de produção de substâncias biologicamente ativas;
- Descrever a diversidade de plantas no Brasil, bem como a importância do Cerrado e as plantas medicinais;
- Realizar um levantamento dos estudos de bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas medicinais do cerrado brasileiro.

3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para a realização deste trabalho constituiu-se de levantamentos bibliográficos de publicações disponíveis em bases de dados, tais como: PubMed, Medline, SciELO, Science Direct, portal de periódicos CAPES, dentre outros de acesso público via Internet como sites de órgãos federais e estaduais. Houve a utilização de livros didáticos, dissertações e teses relacionados com o tema. Pesquisaram-se publicações científicas nos períodos de 1996 a 2012 referentes à diversidade endofítica, fungos endofíticos com potencial para a bioprospecção, fungos endofíticos isolados de plantas medicinais, fungos endofíticos isolados de plantas do cerrado, o bioma cerrado, biodiversidade brasileira, dentre outros.

Utilizaram-se como base para pesquisa dos artigos palavras chaves e os seguintes temas: cerrado, plantas medicinais do cerrado, fungos endofíticos associados a plantas medicinais, fungos endofíticos, endofíticos, taxonomia de fungos endofíticos, metabólitos secundários, substâncias bioativas, bioprospecção de fungos “diversity endophytic”, “fungal endophytes”, “endophytic association”, “endophytic fungi and biotechnology”, “bioprospecting”, atividade biológica antibacteriana, antioxidante, antiinflamatória, antiviral, antifúngica, dentre outras. Os artigos e textos foram selecionados de acordo com a relevância e as informações foram reunidas para o desenvolvimento da monografia.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 FUNGOS: UMA VISÃO GERAL DA IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E BIOTECNOLÓGICA

Há muitas décadas se sabe a grande importância que os fungos têm na preservação da diversidade biológica, na manutenção de ecossistemas e seu papel nas interações com o homem, animais e plantas. Tais micro-organismos são componentes cruciais nos ciclos biogeoquímicos e se revelam importantes agentes no estudo de ecologia microbiana, na compreensão dos processos genéticos e evolutivos, no controle ambiental e nas aplicações biotecnológicas (PEREIRA, 2009; BASSO, GALLO e BASSO, 2010; DELABONA, 2011; LOPES, 2011).

O importante papel dos fungos nos nichos ecológicos está relacionado com a maneira pela qual os fungos interagem com o meio ambiente e de como estabelecem relações com outros organismos vivos (parasitas, sapróbios e simbiontes), sendo que dois terços das espécies conhecidas estabelecem íntimas relações com outros organismos (BARBIERI e CARVALHO, 2001). Os fungos formam assim um grupo de organismos com grande diversidade morfológica, fisiológica e ecológica (Figura 1) (PUTZKE e PUTZKE, 2004).

De maneira geral podemos classificar os fungos como organismos eucarióticos, aclorofilados, heterótrofos e quimiorganotróficos, possuem parede celular definida, constituídas principalmente por quitina, glucanas e manana (ALEXOPOULOS, 1996). Sua membrana celular é rica em ergosterol, um componente responsável pela estruturação da membrana, permeabilidade e modulação da fluidez (LOGUERCIO-LEITE, 2006). Podem ser unicelulares ou pluricelulares reproduzindo-se nas formas assexuadas e/ou sexuadas, que originam os esporos principais responsáveis pela propagação das espécies (PUTZKE e PUTZKE, 2004; MAIA e CARVALHO JUNIOR, 2010; TERÇARIOLI et al., 2010). As estruturas somáticas filamentosas, conhecidas como hifas, são diferenciadas das reprodutivas exibindo variedades de formas o que possibilita sua identificação e classificação (MAIA E CARVALHO JUNIOR, 2010).

Os fungos são classificados em cinco filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* (ALEXOPOULOS et al., 1996), e *Glomeromycota*, um grupo anteriormente descrito como pertencente ao filo *Zygomycota*, classe *Glomales*, e reclassificado como clado irmão de *Ascomycota* e *Basidiomycota* (SCHUBLER et al., 2001). Estes micro-organismos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, aquáticos ou

terrestres, dos trópicos às regiões árticas e antárticas, fontes hidrotermais, sedimentos de rochas profundas, e em desertos sendo considerados, portanto, como cosmopolitas (LOGUERCIO-LEITE, 2006; MAIA e CARVALHO JUNIOR, 2010; TERÇARIOLI et al., 2010).



Figura 1: Representação esquemática de ambiente “tipicamente criptogâmico”, dominado por fungos. Nesta figura é possível verificar as mais diversas formas e interações com o meio ambiente (parasitas, sapróbios e simbiotes). Pelo menos uma espécie de cada grupo é representada. a - b: *Myxomycota*; c: micélio; d – m: *Ascomycota*; n – p: Líquens; r - s: *Zygomycota*; t – z: *Basidiomycota* (*Gasteromycetes*); 1 – 15: *Basidiomycota* (outros). Modificado de PUTZKE e PUTZKE, 2004.

Segundo Maia e Carvalho Junior (2010), devido à vasta diversidade encontrada, delimitar os fungos como um grupo foi um grande desafio para os taxonomistas. Porém, as

controvérsias e dificuldades, em determinar características que englobem todos os indivíduos, estão sendo sanadas pelos esforços em estabelecer uma definição filogenética baseada na análise de DNA, principalmente nas seqüências relevantes. Genes ribossomais são mais frequentemente empregados na análise filogenética de fungos. Dentro do rDNA loci, a região ITS tem sido particularmente útil para análise de espécies de fungos intimamente relacionados em muitos gêneros (GARCÍA et al., 2012). A sensibilidade e especificidade das técnicas de biologia molecular para a diferenciação genética das espécies têm promovido grandes avanços na identificação de espécies de fungos, porém, análises da morfologia, dos aspectos ecológicos e fisiológicos, como produção de açúcares e outros compostos são de igual importância (ORLANDELLI et al., 2012). Na taxonomia polifásica há uma integração de caracteres fenotípicos à seqüências de DNA, nela os aspectos micromorfológicos, macromorfológicos, fisiologia, metabólitos e estruturas moleculares são de igual relevância e importância para a determinação estável de uma dada (SILVA, 2012).

As estimativas com relação ao número de espécies de fungos existentes no mundo são distintas na literatura. Segundo Alexopoulos e colaboradores (1996) existem aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos, dos quais somente cerca de 70 mil já foram descritas.

No Catálogo sobre a diversidade das plantas e fungos do Brasil realizado por Forzza e colaboradores (2010), foi registrado um total de 3.608 mil espécies de fungos, sendo 523 endêmicas, representando uma taxa de 14,5% de endemidade das espécies do Brasil. Para estes pesquisadores, a baixa porcentagem de fungos (cerca de 5%) presente neste estudo, deve-se entre outros fatores, a problemas de coleta, análise e delimitação taxonômica. Eles ressaltam ainda que grande parte das espécies seja microscópica e pouco estudada, dificultando assim a estimativa. É certo para estes pesquisadores que a inclusão de dados ainda não aferidos e a realização de um maior número de coletas e estudos ocasionará concomitantemente o aumento no número desses organismos registrados no Brasil.

Os fungos são amplamente utilizados em processos biotecnológicos, em grande parte, devido a sua habilidade de crescer em substratos simples e de serem capazes de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários. Vários são os exemplos que comprovam a utilização de seus recursos em bioprocessos com a finalidade de prover bens ou serviços de suma importância nas atividades socioeconômicas tais como: (BASSO, GALLO e BASSO, 2010; LOPES, 2011):

- Área Ambiental: a recuperação de áreas degradadas por meio da biorremediação;

- Agropecuária: destacam-se os organismos fixadores de nitrogênio e os empregados no controle biológico de pragas;
- Área de alimentos: empregados na produção de bebidas, panificação, queijos, dentre outros;
- Indústria: utilização para transformação de substratos em produtos de maior valor agregado e principalmente na produção de enzimas e antibióticos (DELABONA, 2011; COSTA et al., 2012). Exemplos de espécies fúngicas de importância industrial e suas aplicações são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Aplicabilidade de produtos fúngicos na indústria.

Compostos	Fungos Filamentosos	Principal área de aplicação
Quimosina	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria de alimentos
Celulase	<i>Trichoderma viride</i> ; <i>T. reesei</i> ; <i>Hemicola insolens</i> ; <i>Penicillium funiculosum</i>	Indústria têxtil e papelaria
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i>	Indústria de alimentos e de detergentes
Protease	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. melleus</i> ; <i>Rhizopus delemar</i> ; <i>Helicostylum piriforme</i>	Indústria de alimentos e de detergentes
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Indústria Farmacêutica (antibiótico)
Cilosporina	<i>Tolyocldium niveum</i>	Indústria Farmacêutica (imunossupressor)
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Indústria Farmacêutica (antifúngico)
Lovastatina	<i>Monascus ruber</i> , <i>A. terreus</i>	Indústria Farmacêutica (hipocolesterolemiantes)
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Indústria Farmacêutica (antibiótico)
Betacaroteno	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Choanephora curcubitarum</i>	Indústria de alimentos (corante e antioxidante)
Lentiano	<i>Lentinula edodes</i>	Indústria Farmacêutica (antitumoral e efeito contra HIV)
Krestin (polissacarídeo PSK)	<i>Trametes versicolor</i>	Indústria Farmacêutica (Tratamento de câncer mama e pulmão)
Asperlicina	<i>Petromyces alliaceus</i>	Indústria Farmacêutica (Tratamento de distúrbios gástricos)

Fonte: GUNATILAKA, 2006; TERÇARIOLI et al., 2010; LOPES, 2011. Modificado.

Considerando a grande utilização dos fungos, inúmeras são as expectativas para o descobrimento de novas espécies, em especial as endofíticas, capazes de produzir metabólitos biologicamente ativos. O Brasil pode contribuir significativamente para esta área de pesquisa, pois possui um grande potencial biológico a ser explorado. Ele detém cerca de 13% da biodiversidade do planeta, sendo grande parte ainda não estudada, possibilitando assim o desenvolvimento de pesquisas e produtos com utilidades nos mais diversos eixos industriais e no setor da bioprospecção. Tendo esta como método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local com objetivo a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (Azevedo, 2003).

4.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Micro-organismos endofíticos são aqueles que, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais sem causar sintomas aparentes de doença ou efeitos negativos a seus hospedeiros (BACON & WHITE, 2000; ARNOLD, 2007; MACCHERONI, ARAÚJO e LIMA, 2010). De acordo com Ferrara (2006) e Strobel et al. (2004) todos os vegetais estudados até o momento abrigam micro-organismos endofíticos, podendo ser isolados de modo geral em partes aéreas (folhas), caules, raízes e frutos (AZEVEDO, 1998; NETO, AZEVEDO e ARAÚJO, 2002).

Os micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez ainda no início do século XIX por Darnel (STROBEL, 2003), mas somente em 1866, o botânico Barry, propôs a distinção entre os micro-organismos endofíticos dos fitopatogênicos, causadores de patogenias em vegetais (NETO et al., 2004), distinguindo-se também dos micro-organismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (AZEVEDO, 1998).

Entre os micro-organismos endofíticos isolados, incluem principalmente fungos e bactérias, sendo que os fungos são isolados geralmente com maior frequência (TAN & ZOU, 2001; STROBEL & DAYSE, 2003; STROBEL et al., 2004). Rodriguez et al. (2009) divide os fungos endofíticos em dois grandes grupos, de acordo com diferenças taxonômicas, plantas hospedeiras e funções ecológicas: os endofíticos clavicipitaceos (C-endofíticos), que infectam somente gramíneas; e os endofíticos não clavicipitaceos (NC-endofíticos) que são isolados de tecidos assintomáticos de plantas não vasculares, samambaias e angiospermas. Contudo, o grupo dos NC-endofíticos são fungos altamente diversos que se divide em pelo menos três classes funcionais distintas.

Os estudos sobre a diversidade e papel dos endofíticos de forma geral, demonstram que estes micro-organismos não são meros habitantes de seus hospedeiros, mas possuem importantes propriedades e contribuem para a preservação da diversidade biológica. Com o acúmulo de informações sobre os endofíticos foi possível o estabelecimento de teorias relacionadas à sistemática de fungos, à bioquímica, fisiologia e ecologia das interações do endofítico com sua planta hospedeira (STROBEL e DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004; ARNOLD, 2007).

Os fungos endofíticos representam uma abundante e confiável fonte de novos compostos com potencial para a exploração. Isto os tornam uma promissora e interessante ferramenta nas aplicações biotecnológicas como: produção de antibióticos, agentes de controle biológico de pragas e doenças vegetais, bioherbicidas, vetores para inserção de genes de interesse em plantas hospedeiras e produção de fito hormônios (MAKI, 2006).

Segundo Azevedo (1998) os micro-organismos endofíticos ficaram esquecidos até meados dos anos de 1970, quando então ressurgiu o interesse pelos mesmos. O questionamento sobre possíveis benefícios ou prejuízos às plantas hospedeiras, capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, extensão da variabilidade de fungos endofíticos e as propriedades da relação endofítico hospedeiro, conduzem diversas investigações.

A enorme diversidade biológica, juntamente com a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, impulsionaram uma série de investigações sobre a extensão da variabilidade de fungos endofíticos (KUSARI, HERTWECK e SPITELLER, 2012), e o seu potencial como fontes de novas drogas. Como demonstrado na figura 2, tal dado pode ser evidenciado pelo aumento considerável no número de publicações sobre os fungos endofíticos (ALY et al., 2010).

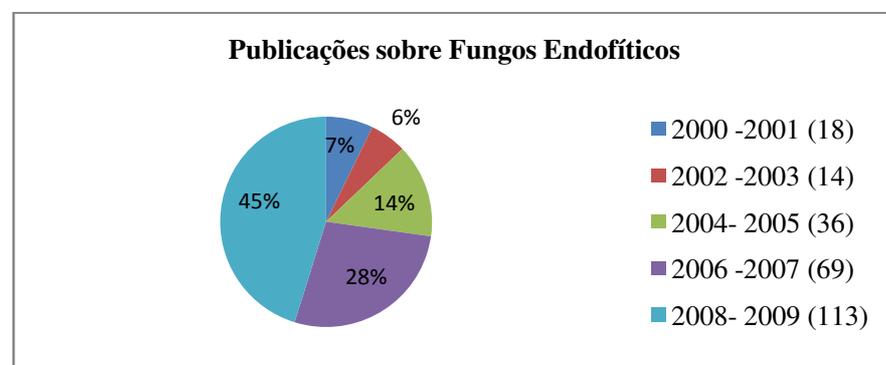


Figura 2: A figura indica o aumento constante no número de pesquisas e publicações relacionadas a produtos naturais bioativos produzidos por fungos endofíticos (ALY et al., 2010).

No Brasil, as pesquisas relacionadas a este grupo de micro-organismos e seus metabólitos bioativos foram iniciadas no começo da década de 1990, no Departamento de Genética da Universidade de São Paulo - ESALQ/USP (AZEVEDO et al., 2000). Atualmente no Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil/Plataforma Lattes/CNPQ 49 grupos estão envolvidos exclusivamente em pesquisas com fungos endofíticos, sendo que apenas 16 grupos estão relacionados com estudos voltados para metabólitos bioativos com potencial terapêutico provenientes destes micro-organismos.

4.2.2 INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS E HOSPEDEIRO

Segundo Maccheroni, Araújo e Lima (2010) a interação fungo endofítico- planta hospedeira é tão íntima que tem sido sugerido que esta interação seja resultante de processos co-evolutivos entre planta e patógenos. Evidências de micro-organismos associados a plantas foram encontradas em tecidos fossilizados de caule e folhas, provando a íntima união das plantas e fungos (ZHANG, SONG e TAN, 2006). Estruturas fúngicas bastantes visíveis foram encontradas em registros fósseis de quatrocentos milhões de anos (Período Devoniano) em raízes de *Rhynia*, consideradas as pioneiras no processo de ocupação terrestre. Evolutivamente, as plantas necessitam algumas associações, especialmente com micro-organismos, a fim de se adaptar a certos nichos ecológicos e manter seu crescimento e desenvolvimento normais (SINGH et al., 2011). A conquista do ambiente terrestre provavelmente estaria relacionada a esta associação com os fungos (RODRIGUEZ, 2009; TERÇARIOLI et al., 2010).

As associações e interação de fungos endofíticos com seus hospedeiros são complexas e variadas. Dependendo do modo pelo qual o fungo infecta seu hospedeiro e da extensão da resposta da planta, pode-se ter uma colonização sistêmica ou local, inter ou intracelular (MAKI, 2006). D'Amico e colaboradores (2008) relatam que os fungos endofíticos se propagam por dois diferentes modos, um vertical, em que o fungo endofítico infecta o óvulo da planta hospedeira, e assim propaga através das sementes; ou horizontalmente, em que o fungo endofítico não é transportado pelas sementes, mas é disperso pelo ar, água ou vento.

Para o estabelecimento da associação fungos endofíticos hospedeiro, os endofíticos devem ser compatíveis com a planta hospedeira e capazes de colonizar seus tecidos (DUDEJA et al., 2012), enquanto a planta deve apresentar uma predisposição para ser colonizada por estes micro-organismos (MACCHERONI, ARAÚJO e LIMA, 2010).

No início da colonização o fungo endofítico precisa penetrar na planta hospedeira e alcançar o interior de seus tecidos. Ele utiliza como porta de entrada ao vegetal os acessos naturais, como os poros e estômatos (Figura 3), ou artificiais como feridas causadas por insetos, fungos patogênicos ou até mesmo pelo desgaste das raízes em virtude do atrito com a terra durante seu crescimento (AZEVEDO, 1999; AZEVEDO, 2000; COSTA, 2003; NETO et al., 2004; FERREIRA, 2007; RODRIGUEZ et al. , 2009).

Os fungos endofíticos desenvolveram mecanismos especiais que os permitiram maior sucesso na colonização vegetal. Eles secretam uma variedade de enzimas, tais como enzimas hidrolíticas, como a celulase e pectinase (ZHANG, SONG e TAN, 2006) que atuam nas etapas de penetração, colonização e crescimento no interior do tecido hospedeiro (CHANDRA, 2012). É necessário o reconhecimento do hospedeiro, a germinação de esporos, a penetração da epiderme e colonização do tecido. Após a entrada na planta hospedeira, o fungo endofítico pode colonizar os espaços intercelulares, os vasos condutores (xilema e floema) e podem ser observados no interior das células (MACCHERONI, ARAÚJO e LIMA, 2010). Com o sucesso da colonização no tecido hospedeiro, o nicho endofítico torna-se estabelecido, e assim o micro-organismo obtém uma fonte viável de nutrição (DUDEJA et al., 2012).

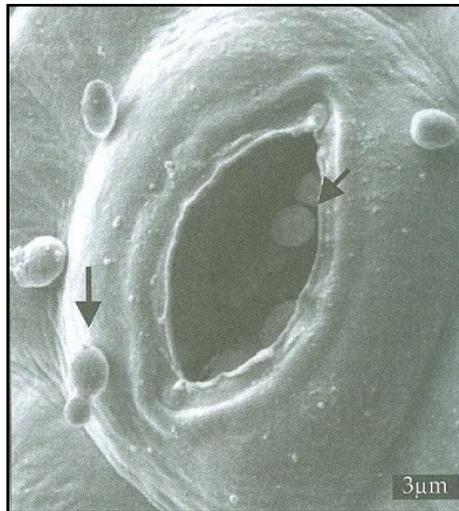


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura de células de leveduras endofíticas. As setas próximas e no interior de estômatos de folhas de citros referem-se a células leveduriformes. A imagem representa uma porta de entrada natural para os fungos endofíticos (MACCHERONI, ARAÚJO e LIMA, 2010).

Na planta é formada uma associação mutualística onde são encontradas trocas nos dois sentidos desta relação. A planta fornece ao fungo, nutrientes e proteção, em contra partida, o fungo endofítico confere a seu hospedeiro propriedade interessante, atuando como mediador

da planta com seu ambiente, tornando-a mais competitiva frente a estresse biótico ou abiótico (BARBIERI e CARVALHO, 2001; BACKMAN e SIKORA, 2008; MACCHERONI, ARAÚJO e LIMA, 2010; CHANDRA, 2012).

Além do mencionado acima, diversos benefícios podem ser conferidos ao vegetal por meio da relação entre o fungo endofítico – hospedeiro, como: modificações morfológicas da raiz para melhor captação e acumulação nutricional; ativação da resposta, mais rápida e eficiente, frente ao estresse hídrico; prevenção de infecções de agentes patogênicos através da produção de agentes antifúngicos ou antibacterianos, ou pela competição de nutrientes com outros patógenos; proteção contra herbivoria; regulação osmótica e estomática; propicia o crescimento da planta (podem acelerar a emergência das plântulas); auxilia a aquisição de nutrientes, por exemplo, nitrogênio via fixação de solubilização de fosfato, ou quelante de ferro e, atua na alocação desses recursos (ARNOLD, 2007; RODRIGUEZ, 2009; DUDEJA et al., 2012).

A presença do fungo endofítico *Fusarium moniliforme* em milho (*Zea mays*) leva a alterações bioquímicas e histológicas do vegetal, como a deposição acelerada de lignina (MACCHERONI et al., 2010) e outros compostos que reforçam as paredes celulares, tornando mais difícil para os elementos patogênicos a infecção do tecido, proporcionando assim o aumento da resistência da planta hospedeira. Esta estratégia vegetal também pode ser empregada em relação aos endofíticos, pois tal ação limitará o crescimento dos mesmos, impedindo-os de se tornarem virulentos (DUDEJA et al., 2012).

Existe um equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta. Se este equilíbrio for perturbado, por uma diminuição na defesa da planta ou por um aumento exacerbado do fungo, o estado de latência deste pode ser quebrado, gerando assim uma possível doença no hospedeiro (TAN e ZOU, 2001; CHANDRA, 2012). Kusari e colaboradores (2012) expõem em seu trabalho (Figura 4) a hipótese proposta por Schulz & Boyle (2005) sobre o “antagonismo equilibrado”.

Nesta hipótese a colonização assintomática é resultante de uma relação balanceada da resposta vegetal frente à virulência do fungo endofítico. Tanto os fungos endofíticos como os patógenos possuem vários fatores de virulência que são enfrentados pelos mecanismos de defesa da planta. Se a virulência do fungo endofítico e a defesa da planta são equilibradas, a associação continua aparentemente assintomática (A). Esta fase é apenas um período de transição, pressões de fatores ambientais podem desestabilizar o equilíbrio dos antagonistas. Se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência do fungo, este morrerá, porém, se a planta sucumbir a virulência do fungo, um relacionamento

planta- patógeno conduziria a doença da planta (B). Em alguns casos os fungos endofíticos podem tornar-se agentes patogênicos latentes (C), na medida em que são influenciados por certos fatores intrínsecos ou ambientais, como por exemplo, estresse ou idade da planta. De acordo com a hipótese da co-evolução planta – endofítico, pode ser possível que os endofíticos auxiliem a planta na defesa química através da produção de metabólitos secundários bioativos (D). Os fungos endofíticos, em um processo competitivo de espaço e nutrientes com os patógenos, podem sintetizar inúmeros compostos antagônicos que inibem o desenvolvimento destes. Outra forma de defesa proposta nesta figura é da ação sinérgica entre fungos endofíticos e as plantas. A ação combinada entre os dois contribuiria para a defesa da planta através da neutralização do patógeno (E).

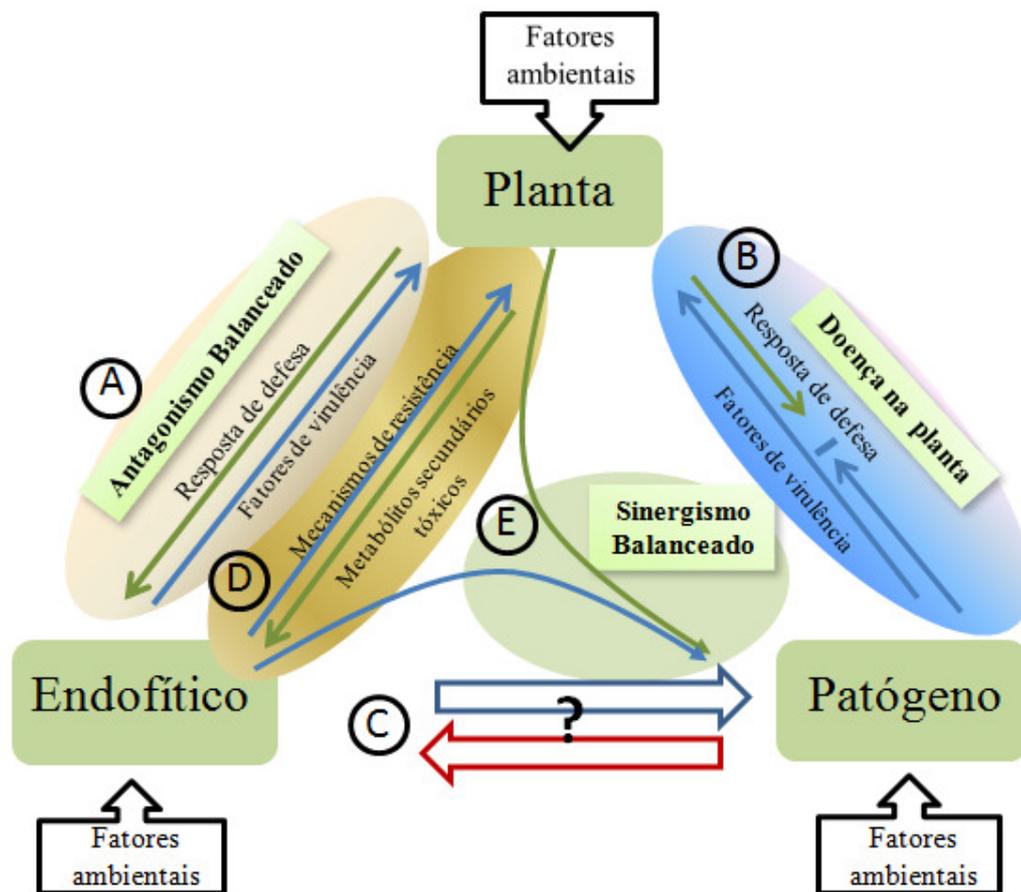


Figura 4: Esquema sobre a hipótese de antagonismo balanceado entre Planta-Fungo. Apresentação das interações com ênfase em fungos endofíticos. (A) Mostra a hipótese antagonismo equilibrado; (B) doença causada por fungos patogênicos; (C) a reciprocidade endofítico- patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que este fenômeno pode não ser universal, e mais pesquisas são necessárias para confirmação; (D) produção de metabólitos secundários bioativos por planta e fungos; (E) sinergia equilibrada (KUSARI et al., 2012).

Em alguns casos, fungos associados a plantas são capazes de produzir os mesmos compostos bioativos ou então metabólitos secundários semelhantes ao que a planta hospedeira produz. Esse argumento afirma a teoria de que, durante a co-evolução de fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras, os micro-organismos adaptaram-se à seus microambientes especiais por variação genética, incluindo absorção de partes do DNA hospedeiro em seus genomas próprios (ZHANG, SONG e TAN, 2006; CHANDRA, 2012). Esta transferência de gene pode ter causado a capacidade de certos endofíticos de biossintetizar alguns fitoquímicos originalmente produzido pela planta hospedeira (STROBEL et al., 1996; RODRIGUEZ, 2009).

É possível evidenciar esta estreita interrelação no caso da planta *Taxus brevifolia*. Inicialmente o diterpenóide paclitaxel, antitumoral de altíssimo valor econômico utilizado no tratamento do câncer de mama, era extraído exclusivamente do vegetal *T. brevifolia*. A partir dos estudos de Stierle e colaboradores (1995) foi possível evidenciar a produção do taxol também pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*.

Apesar de muitos fungos estabelecerem uma relação íntima com seu hospedeiro como citado anteriormente, alguns estudos posteriores revelaram que a síntese do paclitaxel era realizada por outros fungos endofíticos, incluindo *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Monochaetia* e outros (STROBEL, 1996; NETO et al., 2004).

Outro fator importante que atua na diversidade endofítica está relacionado a espécie hospedeira, como por exemplo as condições ambientais ao qual a planta está adaptada. Oscilações de fatores abióticos, tais como temperatura, regime de chuvas, ou bióticos, como a predominância de determinadas espécies de micro-organismos presentes naquele hospedeiro podem interagir e interferir nos metabólitos secundários de ambos (MAKI, 2006).

4.2.3 DIVERSIDADE E POTENCIALIDADE DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PARA A BIOPROSPECÇÃO

Diversos autores afirmam que um expressivo número de fungos endofíticos pode ser isolado de uma única espécie vegetal, sendo que, pelo menos um é específico ao hospedeiro (TAN e ZOU, 2001; FERRARA 2006; ARNOLD, 2007; MACCHERONI et al., 2010; SINGH et al., 2011). Estes são encontrados nos mais diversos tipos vegetais, em tecidos de hepáticas, antóceros, musgos, samambaias, gimnospermas e angiospermas crescendo em muitos ambientes incomuns (STROBEL & DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004; ARNOLD, 2007). Sabendo-se que provavelmente todas as plantas possuam micro-organismos

endofíticos, pode-se inferir que os fungos endofíticos são hiperdiversos, uma vez que a estimativa aproximada de plantas no mundo é de cerca de 300 mil espécies (SELIM et al., 2012).

Os fungos endofíticos mais comumente isolados pertencem ao filo *Ascomycota*, porém outros filios são encontrados em menor frequência. Dentro do filo *Ascomycota*, inclui-se várias espécies de *Sordariomycetes* e *Dothideomycetes*. Os gêneros comumente encontrados incluem: *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Phomopsis*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Alternaria*, *Nodulisporium* e *Daldinia* (RODRIGUES & SAMUELS, 1999; SURYANARAYANAN et al., 2002; SCHULZ & BOYLE, 2005; ARNOLD, 2007).

Orlandelli e colaboradores (2012), ao estudar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *Piper hispidum* (*Piperaceae*), identificaram 21 isolados pertencentes a 11 gêneros: *Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Lasiodiplodia*, *Marasmius*, *Phlebia*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Schizophyllum*; e um isolado identificado apenas ao nível da ordem *Diaporthales*. Dentre os gêneros identificados, *Bipolaris* foi o mais freqüente.

Ao avaliar a diversidade de fungos endofíticos associados a seis espécies de plantas medicinais, coletadas no Jardim Botânico de Beijing, Sun e colaboradores (2008) recuperaram 973 isolados a partir de 1144 fragmentos de tecidos vegetais. *Alternaria alternata* foi a espécie dominante nas seis plantas, e *Microsphaeropsis conielloides* também foi dominante em *Eucommia ulmoides*. A diversidade foi visivelmente maior nos galhos do que aqueles isolados em folhas, nas seis plantas examinadas. A colonização e taxas de isolamento de fungos endofíticos aumentaram com a idade do galho. Os resultados baseados em análises de similaridade indicaram que alguns fungos endofíticos mostravam certo grau de acolhimento e de preferência de tecido.

Pimentel e colaboradores (2006 A), isolaram 297 fungos endofíticos a partir de 1728 fragmentos de hastes e folhas de *Glycine max* (L.) Merrill provenientes de plantas do campo e de casa de vegetação, coletadas cerca de 20 e 40 dias após a germinação das sementes. Os isolados obtidos pertenciam aos grupos: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium*. Neste estudo percebeu-se diferenças qualitativas e quantitativas entre os isolados, em relação a micobiota de hospedeiros provenientes do campo e de casa de vegetação, com maior frequência de fungos isolados de plantas no campo em comparação com as de casa de vegetação. Estes, dentre outros resultados obtidos nesse trabalho, podem

ser de utilidade do ponto de vista biotecnológico pelo uso de endofíticos introduzidos deliberadamente em plantas visando o controle biológico de pragas ou promoção de crescimento vegetal.

O trabalho realizado por Pimentel, Figura e Auer (2010) teve como objetivo estudar os fungos endofíticos em acículas de árvores jovens de *Pinus taeda* L., bem como avaliar o efeito da posição de coleta na árvore selecionada. Para isso, os autores delimitaram duas faixas de altura, 30-50 cm e 100-130 cm acima do solo. Dezesete gêneros foram isolados e identificados: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Hansfordia*, *Monocillium*, *Nodulisporium*, *Panidio*, *Papulaspora*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia* e *Xylaria*. Estes autores verificaram aumento no número de espécies isoladas em função do tipo de acícula coletada e do local na planta, sendo que foi observada maior frequência de fungos associados a acículas colhidas na altura de 30 cm-50 cm (acículas mais velhas) quando comparada com a frequência na altura de 100 cm-130 cm.

Com o objetivo de analisar o efeito da idade do tecido vegetal sobre a população de fungos endofíticos, Pimentel e colaboradores (2006 B), amostraram folhas cultivadas (jovens e adultas) e folhas nativas (jovens e adultas) de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Os autores recuperaram um total de 4.406 colônias dos fragmentos foliares, com um maior número obtido a partir de folhas adultas e em ervas nativas, verificando assim, diferenças significativas entre os fatores origem e idade. Os autores justificam que essa variação pode ser devida à exposição da folha à luminosidade, uma vez que sob a mata, ou seja, ambiente nativo existe um ambiente mais úmido, mais propício à sua sobrevivência, enquanto que, a pleno sol a umidade tende a ser menor, ocorrendo o ressecamento da folha, ao contrário da planta nativa que estão sujeitas a uma menor exposição solar.

Guimarães (2006) recuperou 37 isolados de fungos endofíticos a partir de *Viguiera arenaria* (Asteraceae). Dentre os isolados identificados *Glomerella cingulata* foi a espécie dominante. Os resultados obtidos são promissores principalmente para a busca de substâncias com atividade antitumoral. Os fungos *G. cingulata* (VA1) e *Fusarium* sp. (VA17) foram cultivados, e a partir de seus extratos isoladas as substâncias I- nectriapirona (com atividade citotóxica contra células de leucemia T humana e melanoma); II- tirosol; III- Ergosterol; IV- Manitol, evidenciando a capacidade dos fungos isolados em biossintetizar metabólitos de grande diversidade estrutural.

A atividade biológica de fungos endofíticos isolados de plantas do gênero *Garcinia* (*G. atroviridis*, *G. dulcis*, *G. mangostana*, *G. nigrolineata*, *G. scortechinii*) foi avaliada por

Phongpaichit e colaboradores (2007). Um total de 51 fungos endofíticos foram isolados neste estudo, sendo eles pertencentes a nove gêneros: *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Curvularia*, *Fusicoccum*, *Guignardia*, *Muscodor*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Phomopsis*, e um isolado (N24) não identificado. Sessenta e cinco extratos brutos foram produzidos a partir dos fungos endofíticos isolados, sendo que 80% destes apresentaram potencial atividade: antimicobacterianos, antimaláricos, antivirais, antioxidantes e citotóxicos para as células Vero. Tais resultados indicam o potencial dos fungos isolados para a produção de compostos naturais bioativos.

Gallo e colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre os fungos endofíticos associados à *Smallanthus sonchifolius* (*Asteraceae*), planta medicinal de origem andina, porém cultivada no Brasil, Japão e Nova Zelândia. No estudo 32 linhagens fúngicas foram isoladas e submetidas a cultivo e extração, produzindo 186 extratos testados como novos agentes citotóxicos. Destes extratos, 12% apresentaram moderada a elevada atividade citotóxica e foram consideradas promissoras fontes de compostos anticancerígenos.

O trabalho realizado por Siqueira (2011) teve por objetivo avaliar a capacidade de fungos endofíticos isolados de *Myrcia guianensis* em produzir compostos com ação inibitória sobre fungos fitopatogênicos (gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*) isolados de *Aniba rosaeodora* (pau-rosa). Extratos brutos foram produzidos a partir de 40 fungos endofíticos e testados frente às linhagens fitopatogênicas, os quais apresentaram resultado positivo (25%) frente a pelo menos uma linhagem. Os extratos que inibiram um maior número de linhagens alvo foram os obtidos de isolados endofíticos do gênero *Phomopsis* sp.. O isolado Mg C2.3.2 inibiu cinco fungos fitopatogênicos, sendo alguns pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*; e o isolado Mg F 3.3.1 B inibiu o crescimento de fungos do gênero *Penicillium*. O extrato do isolado de *Penicillium* sp. (MgC 2.3.2 B) inibiu quatro fungos isolados do pau-rosa pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Cladosporium*. Os extratos mais promissores em relação à atividade antifúngica foram Mg C2.3.2 e Mg F 3.3.1 B, ambos pertencentes ao gênero *Phomopsis*, em que tais extratos inibiram cinco das 16 linhagens patogênicas, reafirmando a capacidade deste gênero em produzir moléculas antifúngicas.

Sebastianes (2010) realizou um estudo para determinar a diversidade genética e avaliar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a folhas e ramos de espécies arbóreas presentes em manguezais de Cananéia e Bertioga, no Estado de São Paulo. Na primeira etapa de seu trabalho, Sebastianes isolou e caracterizou 35 gêneros de fungos endofíticos, sendo os mais freqüentes *Diaporthe*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Colletotrichum* e

Xylaria. Seleccionaram 344 fungos para avaliação quanto à produção de antibióticos contra patógenos humanos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella tiphy* e contra o fitopatógeno *Xanthomonas axonodis citri*. Em outra etapa, uma linhagem de *D. phaseolorum*, um endofítico de folha de *Laguncularia racemosa* foi selecionado para elucidação da estrutura química identificando-se o ácido 3-hidroxi propiônico, ativo frente aos patógenos humanos *S. aureus* e *S. tiphy*. Sebastianes chama a atenção para o fato que grande parte dos gêneros encontrados serem fungos de solo, indicando que eles estão adaptados às condições adversas dos manguezais.

Como demonstrado, produtos naturais de fungos endofíticos têm sido descritos como capazes de inibir ou matar uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos que afetam humanos e animais, como bactérias, fungos, vírus e protozoários (STROBEL et al., 2004), evidenciando a importância da realização de estudos de diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas medicinais.

4.2.4 ISOLAMENTO, CULTIVO E PRODUÇÃO DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos representam uma grande fonte de recursos genéticos e biológicos, com inúmeras aplicações biotecnológicas. Desse modo, atividades de coleta, isolamento, identificação, cultivo e ensaios químicos/biológicos são etapas cruciais no desenvolvimento de pesquisas em vários laboratórios e centros de pesquisas acadêmicas.

Segundo Azevedo (1998) o isolamento de um fungo endofítico envolve cuidados específicos, uma vez que estes se encontram no mesmo ambiente que epifíticos e patógenos. A coleta do material deve ser feita, preferencialmente, nos tecidos saudáveis que não apresentam manchas ou herbivoria. Outros pontos importantes para a coleta são espécie da planta, os órgãos e partes selecionadas, condições ambientais e físicas do local e estação do ano (STROBEL & DAISY 2003; STROBEL et al., 2004; SELIM et al., 2012).

Ao selecionar as plantas para realizar o isolamento e identificação dos micro-organismos endofíticos, é necessário observar critérios, como: 1) plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns; 2) plantas que apresentam um histórico etnobotânico, ou seja, que são tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos, grupos étnicos e pela população de um modo geral; 3) plantas endêmicas de determinadas regiões que apresentam longevidade incomum e que

estão localizadas em ambientes ancestrais; 4) plantas cujo desenvolvimento se dá em áreas de grande biodiversidade, tal como em florestas temperadas e tropicais (STROBEL et al., 2004).

No momento da coleta as amostras devem ser armazenadas em sacos plásticos, identificadas (coletor, data e espécie vegetal) e transportadas em caixas de isopor vedadas até o local de processamento. A espécie vegetal deve ser utilizada o mais fresca possível (evitar a contaminação por organismos saprofíticos), porém se for necessário guardar para uso posterior, o material deve ser mantido em câmara fria (MELLO, REIS e SILVA, 2011).

Não existe uma padronização quanto à melhor metodologia a ser aplicada para a obtenção de fungos endofíticos, tais como o tamanho dos fragmentos inoculados e os meios de cultura utilizados a fim de aumentar o número de espécies obtidas e permitir melhor conhecimento da diversidade da comunidade de fungos endofíticos (ARNOLD, 2007). Deve-se utilizar, portanto, uma metodologia que melhor se aplique ao estudo.

De maneira geral, os procedimentos mais utilizados indicam como primeira etapa a lavagem dos tecidos vegetais, para retirada de sujidades presentes no material. Os tecidos, então devem ser cortados (com lâmina flambada) em pequenos fragmentos, que são tratados, via desinfestação superficial, para inviabilizar outros micro-organismos (epífitos e patogênicos) com etanol 70% e hipoclorito de sódio de 1 a 3% (dependendo do tipo de tecido) por cerca de cinco minutos, seguida de lavagem em água destilada e autoclavada (AZEVEDO, 1998; MELLO, REIS e SILVA, 2011, CANUTO et al., 2012). Azevedo (1998) afirma que testes preliminares devem ser realizados a fim de se determinar tempo de exposição ideal para a eliminação apenas dos epifíticos e patogênicos.

Segundo Canuto e colaboradores (2012) os fragmentos do tecido em questão são dispostos em placas de Petri (Figura 5 A), contendo Batata Dextrose Ágar (BDA) ou Extrato de Malte Ágar (MEA), dentre outros meios de cultura, que também são considerados apropriados para o isolamento de fungos endofíticos. Os meios de cultura devem ser suplementados com algum antibiótico, como por exemplo, cloranfenicol e estreptomicina, para eliminar possíveis bactérias endofíticas presente no tecido vegetal. As placas são incubadas de 25 a 28°C, durante três a sete dias, sendo que o crescimento das colônias fúngicas necessita de monitoramento diário. Seleciona-se um isolado de cada morfotipo, dentre os diferentes tipos de colônias (Figura 5B), para assim transferi-los para BDA ou Batata Cenoura Ágar (BCA), a fim de se obter colônias purificadas (Figura 5C), para posterior identificação (MELLO, REIS e SILVA, 2011, CANUTO et al., 2012).

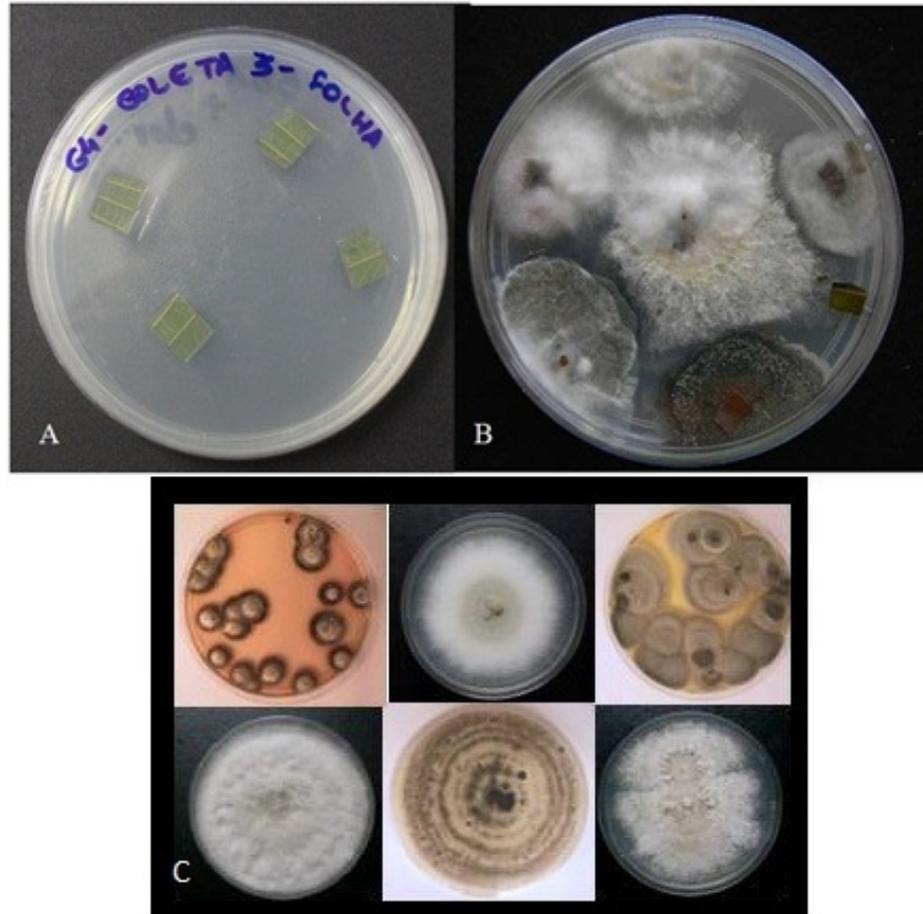


Figura 5: A- Placa de Petri para isolamento de fungos endofíticos com fragmentos de folhas em meio de cultura BDA; B – crescimento de diferentes colônias de fungos endofíticos a partir do tecido de isolamento; C- colônias fúngicas purificadas (Fonte: A- I.C. Otto; B - <http://www.esalq.usp.br>; C- <http://www.uff.br/rvq>).

Os isolados fúngicos obtidos são observados e comparados com estruturas descritas na literatura. As colônias de fungos endofíticos são agrupadas obedecendo-se as características macromorfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Técnicas clássicas de identificação morfológicas seguem características como tamanho da colônia, textura, bordas e pigmentação, sendo que a observação deve ser feita na frente e no verso da placa de cultivo (FERREIRA, 2007; CARVALHO, 2011). Esse tipo de caracterização, apesar de ser o primeiro passo, vem perdendo importância frente às tecnológicas baseadas no genoma (MELLO, REIS e SILVA, 2011).

A identificação de fungos endofíticos deve ser realizada pelos dois recursos, características morfométricas e técnicas de biologia molecular como PCR (Polymerase Chain Reaction) e sequenciamento de regiões de genes ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer).

As regiões ITS são utilizadas para estudo de grupos taxonômicos relacionados e podem auxiliar na distinção dos indivíduos quando a taxonomia morfológica é confusa e até mesmo para confirmação da espécie em questão (CANUTO et al., 2012). Uma importante etapa no estudo de fungos endofíticos está relacionada com a manutenção dos isolados em coleções, seja para futuras pesquisas como para reprodução do experimento (ARNOLD et al., 2007).

Segundo Mello, Reis e Silva (2011) a manutenção dos isolados pode ser realizada por métodos de curta, média e longa duração. Os métodos mais utilizados são: criopreservação, onde ocorre o armazenamento do cultivo, com o auxílio de substâncias protetoras a temperaturas ultrabaixas (- 180°C); armazenamento em temperaturas ambientes que consiste no armazenamento com adição de óleo mineral às culturas; desidratação, retirada significativa de líquidos, como por exemplo, a liofilização (secagem líquida, em que se utiliza gelatina, areia, solo, sílica gel ou papel); subcultivos contínuos, manutenção em meio de cultura adequado com transferência a intervalos variáveis (utilizado principalmente para conservação por curtos períodos). Os riscos de perda de isolados devem ser minimizados com uma rotina de avaliação da cultura e a utilização de pelo menos dois métodos distintos para cada micro-organismo.

Como demonstrado na figura 6 parte B, para o desenvolvimento de testes de bioprospecção, inicialmente as colônias isoladas são cultivadas em larga escala, visando obter maiores rendimentos de extratos fúngicos. O isolado fúngico é repicado em Erlenmeyers (500 mL a 2.000 mL) contendo meio líquido (Extrato de Malte, Czapek, Batata-dextrose, entre outros), e a cultura é mantida sob condições ideais de aeração, temperatura e luminosidade, de acordo com as características do fungo (CANUTO et al., 2012; CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2012).

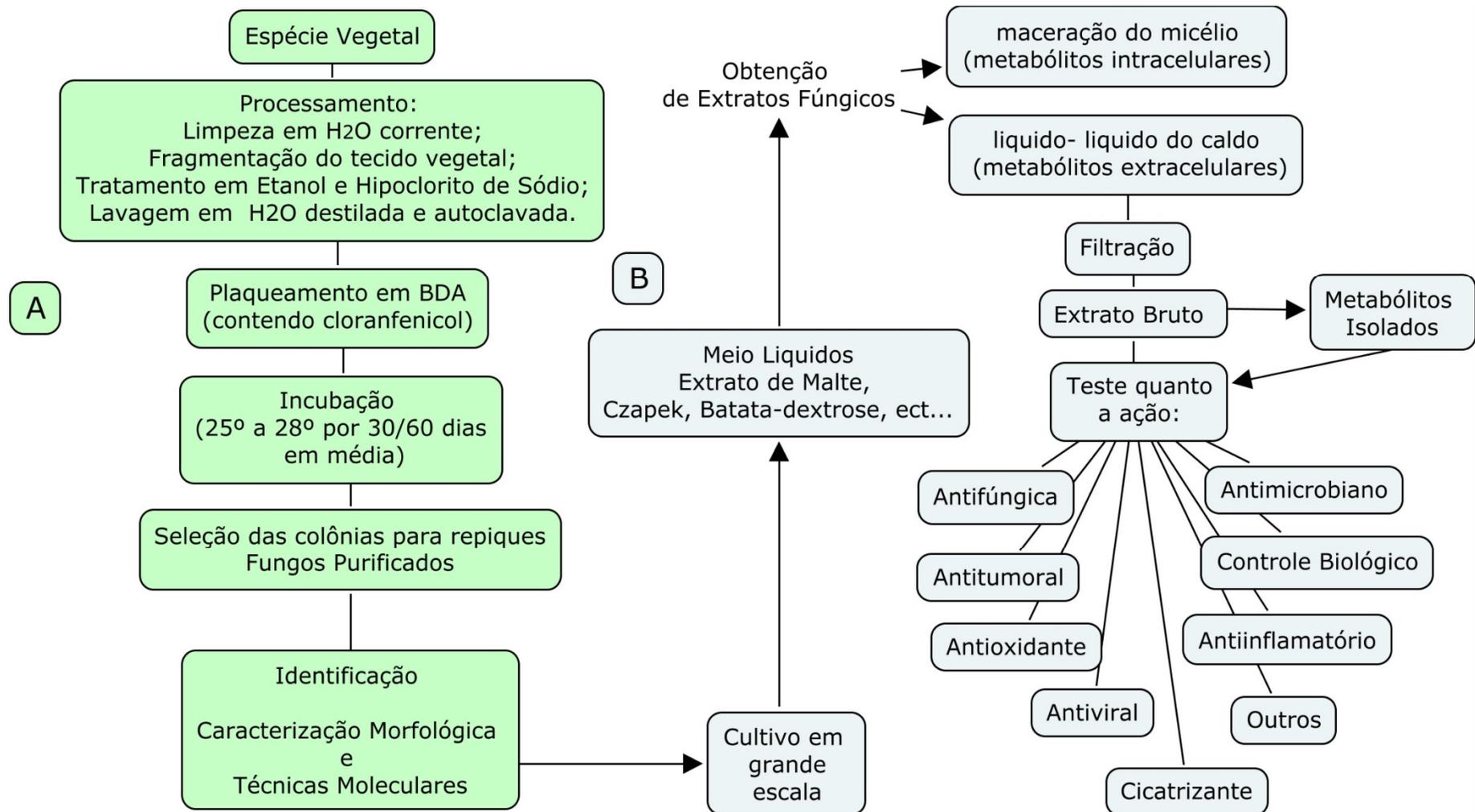


Figura 6: Esquema de metodologia sugerida para isolamento de fungos endofíticos. A: Metodologia básica de isolamento e purificação de fungos endofíticos; B: Metodologia básica para Ensaio biológico: cultivo, obtenção dos extratos brutos, isolamento dos metabólitos e testes funcionais. Modificado de CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2012.

Para se obter o extrato fúngico é necessário fazer partições líquido-líquido do caldo (metabólitos extracelulares) e/ou maceração do micélio (metabólitos intracelulares) dependendo do fungo. O extrato fúngico é então submetido a técnicas cromatográficas de separação: convencionais (Sephadex, gel de sílica) ou modernas (cromatografia líquida de alta eficiência, extração por fase sólida). As substâncias isoladas são quimicamente caracterizadas por meio de métodos físicos e espectrométricos (CANUTO et al., 2012; CHAPLA, BIASETTO e ARAUJO, 2012).

Segundo Canuto e colaboradores (2012), geralmente os extratos fúngicos são submetidos a testes bioguiados, ou seja, o resultado do teste biológico determina quais amostras serão fracionadas e novamente testadas até que se obtenha uma fração ou substância pura passível de caracterização química. Após a realização de diferentes testes biológicos *in vitro* e *in vivo* é possível definir quais os compostos são responsáveis pela atividade. É necessário estabelecer ajustes (composição química, pH do meio de cultura, temperatura) para viabilizar o processo fermentativo para produção comercial do composto.

4.3 DIVERSIDADE DE PLANTAS NO BRASIL

A diversidade biológica refere-se à variedade de espécies da flora, fauna e micro-organismos, associando a eles as infinitas possibilidades de interações, funções ecológicas e variedade genética dentro das populações e das espécies. Sendo assim, o Brasil é considerado um dos países megadiversos mais importantes do planeta (CORADIN, SIMINSKI e REIS, 2011).

De acordo com o último levantamento sobre a diversidade de plantas e fungos do Brasil realizado por Forzza e colaboradores (2010), foi documentado para o Brasil um total de 40.989 espécies de plantas e fungos, das quais 18.932 (46,2%) são endêmicas do país, sendo que os índices brasileiros correspondem a cerca de 9,5 e 9,9% em relação ao índice mundial. O país além de possuir um grande índice de diversidade, possui uma significativa e alta taxa de endemismo de espécies, contando também com alguns dos biomas mais ricos do planeta em número de espécies vegetais.

Dados do IBGE revelam que o Brasil apresenta seis grandes domínios fitogeográficos, a Amazônia (que ocupa 49,29% do território), o Cerrado (23,92%), a Mata Atlântica (13,04%), a Caatinga (9,92%), o Pampa (2,07%) e o Pantanal (1,76%). Dentro de cada

domínio fitogeográfico há uma grande variedade de tipos de vegetação, fitofisionomias, habitats e micro-habitats que são ocupados por uma ampla diversidade tanto de plantas e fungos, como de animais. (FORZZA et al.,2010)

De acordo com estimativas anteriores apresentadas por Ferreira (2007) o Brasil possui uma rica flora com mais de 56 mil espécies de plantas compreendendo 19-22% das espécies existentes no mundo. Forzza e colaboradores (2010) afirmam que, apesar do número de espécies registradas no Brasil no levantamento terem ficado abaixo daquilo que foi previamente estimado, o país continua à frente, em relação a outros países do mundo, não somente nos números totais de espécies de plantas vasculares (32.364), mas também em números absolutos de espécies endêmicas (Tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de alguns países megadiversos ordenados por maior número absoluto de espécies endêmicas ou pelo número total de espécies de plantas vasculares.

Países	Total de Espécies	Espécies Endêmicas	Taxa de Endemismo (%)
Brasil	32.364	18.082	56
Austrália	15.638	14.182	91
China	29.650	14.013	47
Indonésia	29.375	13.750	47
África do Sul	20.407	13.265	65
Papua Nova Guiné	14.522	13.250	91
Madagascar	9.753	7.250	74

Fonte: Forzza et al., 2010. Modificado

A biodiversidade brasileira possui uma enorme riqueza de espécies com potencialidades significativas, porém pouco se tem investido em estudos para uma elucidação concreta sobre sua diversidade e principalmente manejo inadequado dos recursos naturais. No Brasil, atualmente, a maior parte das atividades agrícolas estão baseadas em espécies exóticas (CORADIN, SIMINSKI e REIS, 2011).

Segundo Kusari e Spiteller (2011) a biodiversidade mundial está diminuindo de forma alarmante. Muitas plantas medicinais, endêmica ou espécies ameaçadas de extinção correm perigo e a aniquilação destas plantas levaria à perda de toda a diversidade de micro-organismos endofíticos associados, juntamente a capacidade que eles possam ter de produzir importantes metabólitos secundários e compostos associados aos vegetais.

É necessário, no entanto, intensificar as pesquisas e investir em programas na busca de um melhor aproveitamento desses recursos nativos. A ação conjunta do conhecimento

popular, de indígenas, ribeirinhos, agricultores, com o saber científico possibilitaria estabelecer estratégias para a difusão do conhecimento e valorização da diversidade natural, cultural e social do Brasil.

4.3.1 PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro em extensão, sendo superado apenas pela Floresta Amazônica. Ocupa cerca de 2 milhões de Km², o que representa aproximadamente 20% do território nacional e, está presente nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, oeste de Minas Gerais e da Bahia e o Distrito Federal, estendendo-se para o sul do Maranhão, norte de Piauí, Rondônia e São Paulo (Figura 7) (LINDOSO, et al., 2010; SANO, et al., 2007).



Figura 7: Representação da extensão do Bioma Cerrado no Brasil (SANO et al., 2007).

O clima típico das regiões de cerrado é o tropical sazonal, caracterizado pela alternância de um período seco (geralmente de abril a setembro) e outro chuvoso (de outubro a março). A cobertura vegetal do cerrado não é uniforme, sendo um bioma formado por um ‘mosaico vegetal’ onde encontramos de formações florestais a formações campestres, passando gradual ou bruscamente de uma para outra. Exemplos: Cerradão: apresenta árvores altas e maior densidade; Cerrado típico (*ou sensu stricto*): a forma mais comum no Brasil Central apresenta árvores médias e arbustos esparsos e algumas herbáceas; Campo cerrado: há predomínio de gramíneas e pequenos arbustos, com a ocorrência de algumas árvores; Campo sujo: caracteriza-se pela rara presença de árvores e arbustos e o predomínio de gramíneas e herbáceas; Campo limpo: tem poucos arbustos e total ausência de árvores; Matas de galeria e mata ciliar: que se encontram ao longo dos rios (SANO, et al., 2007; RIBEIRO, 2009; LINDOSO, et al., 2010).

Sabe-se que a flora do cerrado é muito rica, bem como que a maioria de suas espécies tem múltiplos usos para o homem: alimentício, tanífero, condimentar, corticeiro, têxtil, produtor de látex, apícola, ornamental e medicinal (MARONI et al., 2006; BARBOSA, 2008). Contudo, o cerrado vem sofrendo contínua devastação nas últimas décadas, principalmente para a instalação de agricultura e pecuária extensiva. Isto tem acarretado consequências gravíssimas para a sobrevivência do bioma (grandes perdas de biodiversidade), subsistência às populações que nele habitam, bem como o desmatamento excessivo, sendo a vegetação nativa eliminada para o cultivo de grãos, espécies florestais, como *Pinus* e *Eucalyptus*, citricultura, e cana-de-açúcar (MARONI et al., 2006; SANO et al., 2007; LINDOSO et al., 2010).

Cerca de 80% do cerrado já foi modificado pelo homem e apenas 19% corresponde a áreas - fragmentos nas quais a vegetação original ainda se encontra em bom estado. Pelo mapeamento realizado por meio do Programa de Monitoramento e Desmatamento nos Biomas Brasileiros, entre os anos de 2002 e 2008, o cerrado teve sua cobertura vegetal suprimida em 85.074 km², sendo que o percentual de áreas desmatadas em 2002 era de 43,67%, e no ano de 2008 subiu para 47,84% (LINDOSO et al., 2010).

Deve-se salientar ainda que existe uma enorme diversidade de espécies vegetais do cerrado praticamente inexplorada pela ciência, bem como uma enorme diversidade química pertencente a estas espécies. Dessa forma, a identificação e o registro das espécies vegetais do cerrado com potencialidades terapêuticas, a partir de levantamentos e estudos etnobotânicos (Tabela 3), torna-se um ponto de partida para a elaboração de pesquisas científicas. Inicia-se então, um processo que permitiria a obtenção de informações valiosas tanto para a saúde, para

a conservação da biodiversidade como para o desenvolvimento da bioprospecção (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; SILVA e PROENÇA, 2007).

Tabela 3: Indicações populares de raizeiros de espécies de plantas nativas do cerrado de uso medicinal.

Nome Científico	Nome Popular	Indicações Populares
<i>Alternanthera brasiliana</i> var. <i>villosa</i> (Moq.) Kuntze	perpétua-branca	tosse e as irritações da faringe
<i>Anacardium humile</i> St. Hil.	cajuzinho	diabetes
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	aroeira/ Aroeira-mansa	afecções cutâneas
<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	pau-pombo/ peito de pombo	dermatoses, depurativo
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	araticum/ marolo	diarréia crônica
<i>Duguetia furfuracea</i> (St. Hil.) Benth. & Hook	araticum- seco	reumatismo
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	mangaba	diabetes e obesidade
<i>Macrosyphonia velame</i> (St. Hil.) Muel. Arg	velame-branco	gripe, febres, hemorragias
<i>Achyrocline satureoides</i> (Lam.) DC.	marcela	anti-emética, estomática e calmante
<i>Lentiano Baccharis dracunculifolia</i> DC.	alerim-de-vassoura	antifebril
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	carqueja	antifebril, anti- reumática, cálculos biliares, diabete,
<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	arnica	contusões, pancadas, torções e hematomas
<i>Vernonia ferruginea</i> Less.	assa-peixe	depurativa, diurética
<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	assa-peixe	antifebril, nas bronquites, pneumonias, gripes, r
<i>Jacaranda decurrens</i> Cham.	carobinha	depurativo do sangue, afecções cutâneas
<i>Tabebuia aurea</i> (Mart.) Bur.	paratudo/ ipê	gripes, resfriados e tosses
<i>Zeyheria digitalis</i> (Vell.) Hoehne & Kuhl	bolsa-de-pastor	afecções da pele, anti-sifilítica

Continuação tabela 3.

Nome Científico	Nome Popular	Indicações Populares
<i>Cassia rotundifolia</i> Pers.	quebra-pedra-do-cerrado	diurética, afecções dos rins
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	copaíba	afecções das vias respiratórias, cicatrizante,
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart.	jatobá-do-cerrado	bronquites, tosses,
<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	pequi	asma, bronquite
<i>Cecropia pachystachya</i> Tréc.	embaúba	asma, bronquite, tosse e coqueluche, diurética
<i>Croton antisyphiliticus</i> Muel. Arg	canela-de-perdiz sucupira-do-cerrado	depurativo, anti-inflamatório
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth		adstringente, diabetes
<i>Hyptis marruboides</i> Epling.	hortelã-do-campo	gripes, resfriados, tosses

Fonte: Modificado de RODRIGUES e CARVALHO, 2001; SILVA e PROENÇA, 2007.

O estudo etnobotânico de plantas medicinais com finalidade específicas, aplicações de interesse e um histórico por uso da população local, apesar de importantes, devem ser analisados com cautela. Segundo Martins (2006) o contexto social que envolve a utilização de plantas medicinais como remédio, está imbuído de forte misticismo, portanto a eficiência de qualquer tratamento a base de plantas medicinais, cuja comprovação científica não tenha sido realizada, poderá ter apenas um conteúdo simbólico.

Os frutos da *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (*Annonaceae*), pimenta-de-macaco, planta nativa do Cerrado, são usados na medicina popular pelas suas propriedades estimulantes e afrodisíacas. Estudos de caracterização química já identificaram a presença de alcalóides, esteróides, flavonóides, óleos essenciais, diterpenos e saponinas em frutos de *Xylopia* e, por isso, pode-se dizer que plantas deste gênero representam uma fonte promissora de substâncias bioativas (OLIVEIRA, 2012).

Soares e colaboradores (2009) testaram extratos etanólicos brutos das duas amostras de *Davilla elliptica*, um arbusto, também conhecida como cipó-caboclo e pau-de-bugre, que ocorre naturalmente no bioma Cerrado, quanto à atividade antimicrobiana. Esta planta é usada na medicina popular brasileira como adstringente, tônico, sedativo, diurético, no tratamento de hemorróidas, hérnia e em aplicações tópicas como anti-séptico na limpeza de ferimentos. Em seu estudo os pesquisadores, observaram que o extrato apresentou atividade

antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e contra a levedura *Candida albicans*, provavelmente devido à ação sinérgica entre os taninos, os flavonóides e as saponinas, o que pode justificar o uso popular dessa planta.

Bustamante e colaboradores (2010) realizaram um estudo sobre atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca de *Pterodon emarginatus* Vogel (*Fabaceae*), uma árvore do Cerrado conhecida popularmente como “sucupira branca, faveiro, fava de sucupira e sucupira lisa” e utilizada na medicina popular em preparações anti-reumáticas, anti-inflamatórias, analgésicas e anti-infecciosas. Por meio do presente estudo, verificou-se que o extrato etanólico bruto das cascas da *P. emarginatus* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas esporuladas e não esporuladas, Gram-negativas e a levedura *C. albicans*.

Apesar de vários estudos que comprovem a atividade biológica de algumas plantas medicinais terem sido desenvolvidas no Brasil, muitas espécies nativas ainda não foram totalmente elucidadas ou são exploradas por laboratórios estrangeiros, inúmeros são os exemplos de espécies medicinais nativas do nosso país nesta situação. Rodrigues e Carvalho (2001) relatam o caso da Merck, que desde 1876 possui total domínio da tecnologia agrícola e de produção, do jaborandi brasileiro (*Pilocarpus pinnatifolius* Engl.), do qual se extraem os sais de poliacarpina, usada como agente miótico, provoca a contração da pupila, no tratamento do glaucoma. Outro exemplo é o caso da guaçatonga (*Casearia sylvestris*), que produz compostos patenteados por japoneses em 1998 e a planta endêmica faveira (*Dimorphandra mollis*), que possui alta concentração de um composto químico conhecido como rutina, de largo emprego na indústria farmacêutica e de cosméticos (MARTINS, 2006). Segundo Rodrigues e Carvalho (2001) a utilização de plantas medicinais no Brasil está relacionada, em grande parte, à coleta extensiva e extrativista de material silvestre. As espécies que correm mais risco são aquelas cujas partes utilizadas para o preparo dos medicamentos são raízes, caule ou casca do caule, pois, muitas vezes elas são arrancadas inteiras. Como exemplos, podem ser citados: raiz-preta (*Senna rugosa*), da qual se usa a raiz como vermífugo e nas mordeduras de cobra; velame branco (*Macrosyphonia velame*) em que a raiz é utilizada como depurativa do sangue, e a planta toda como depurativa do sangue, anti-reumática e nas úlceras pépticas.

4.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS NATIVAS E OU DE OCORRÊNCIA NO CERRADO: POTENCIAL PARA BIOPROSPECÇÃO

Segundo Strobel & Daisy (2003) há uma enorme e constante busca por novos antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicas mais eficientes, que não provoquem toxicidade e que causem baixo impacto ambiental. Essa intensa busca é consequência da resistência de alguns micro-organismos patogênicos, como por exemplo, *Staphylococcus*, *M. tuberculosis*, *Escherichia* e *Streptococcus* às drogas existentes, bem como a necessidade de fornecer novas drogas para patologias negligenciadas como Malária, Leishmaniose, Tripanossomíase, filariose, dentre outras.

Neste intuito, algumas pesquisas com fungos endofíticos isolados a partir de plantas medicinais do cerrado, têm sido desenvolvidas. Teles e colaboradores (2005) realizaram um estudo com o extrato do fungo endofítico *Curvularia* sp., isolado a partir das folhas de *Ocotea corymbosa* (Meissn.) Mez. (*Lauraceae*), uma planta nativa do Cerrado, popularmente conhecida como canela ou canela-fedida, amplamente utilizada pela população devido suas supostas propriedades farmacológicas. O extrato bruto acetato de etila, produzido a partir do isolado, forneceu dois novos compostos derivados de benzopirano e outros dois já conhecidos, os quais foram testados em ensaios de proliferação celular e atividade antifúngica. Os compostos benzopiranos 1 e 2 mostraram uma fraca atividade antifúngica (*in vitro*) contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Já o composto 2 induziu a proliferação celular de ambas as linhagens testadas: 70% sobre as células HeLa (tumor de colo do útero humano) e 25% em células CHO (ovário de hamster chinês).

Cafê e colaboradores (2005) isolaram e cultivaram fungos endofíticos de *Palicourea marcgravii* St. Hil., uma *Rubiaceae* de larga ocorrência no Cerrado, e conhecida popularmente como “erva de rato” ou “café bravo”. O estudo químico dos extratos brutos acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), produzidos pelo fungo endofítico *Xylaria* sp., resultou no isolamento das substâncias: (1) o ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico; (2) citocalasina D; (3) 7-declorogriseofulvina; (4) citocalasina B; (5) griseofulvina. Segundo os pesquisadores este é o primeiro relato das substâncias isoladas (1,2, 3, 4 e 5) serem produzidas por um fungo endofítico do gênero *Xylaria*. Os extratos brutos tanto de PDB e milho, como as substâncias isoladas foram submetidas a um ensaio bioautográfico para avaliação da atividade antifúngica. O extrato bruto obtido em milho, bem como as substâncias isoladas deste extrato (3, 4 e 5), não se mostraram ativas frente às linhagens *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Já o extrato bruto obtido após cultivo de *Xylaria* sp.

em PDB e os compostos ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico (1) e citocalasina D (2) mostraram-se ativos frente às linhagens fúngicas utilizadas com alvo. Segundo os autores este resultado dá indícios de que os endofíticos associados com *P. marcgravii* se encontram em uma relação de simbiose, produzindo substâncias antifúngicas contra possíveis fungos fitopatogênicos.

O estudo realizado por Teles e colaboradores (2006) é parte de um projeto que visa descobrir agentes antitumoral, antifúngico e antioxidante produzidos por fungos endofíticos associados a espécies nativas de plantas do Cerrado brasileiro. O extrato acetato de etila de *Periconia atropurpurea*, isolado a partir das folhas *Xylopiia aromatica*, foi escolhido para a investigação química detalhada devido a sua atividade contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Dois novos compostos 6,8-dimethoxy-3-(20-oxo-propyl)-coumarin (1) e 2,4-dihydroxy-6-[(10E,30E)-penta-10,30-dienyl]-benzaldehyde (2), e o já conhecido periconicin B (3) foram isolados. De acordo com os autores este é o primeiro relato de um fungo endofítico em *X. aromatica* e o primeiro isolamento desta classe de compostos a partir de *P. atropurpurea*. Todos os compostos (1-3) foram avaliados contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, porém apenas o composto 2 exibiu forte atividade antifúngica contra os fungos, comparável a nistatina (controle positivo). Composto 1 não mostrou qualquer atividade antifúngica, e 3 apresentou uma atividade relativamente fraca. Os compostos 1-3 também foram avaliados quanto à citotoxicidade em células HeLa e células CHO de mamífero. Neste ensaio, o composto 1 não apresentou qualquer atividade contra as células e o composto 2 foi capaz de induzir a proliferação de células HeLa e CHO. Todavia, o composto 3 demonstrou ser um potente agente citotóxico contra as duas linhagens celulares analisadas, pois reduziu a viabilidade das células de HeLa e células CHO, de forma semelhante à de cisplatina, um agente antineoplásico bem conhecido.

No estudo realizado por Cafêu (2007), os isolados endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes*, associados a *Casearia sylvestris* SW. (*Salicaceae*), planta medicinal de utilização popular como anestésico local, antidiarréico, anti-reumático, anti-séptico, antiulceroso e cicatrizante, foram selecionados e cultivados em meio líquido e sólido para a obtenção dos extratos brutos. O extrato bruto de *Xylaria* sp. em milho foi submetido a fracionamento cromatográfico e levou ao isolamento da griseofulvina, 7-desclorogriseofulvina e citocalasina B, enquanto que o extrato obtido do meio líquido conduziu ao isolamento da citocalasina D, citocalasina C e 5-carboxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-diidroisocumarina. Após fracionamento do extrato bruto do endofítico *C. crassipes* no meio líquido MDB foram isoladas 8 substâncias da classe de dicetopiperazinas, N-(2-feniletil)

acetamida, tirosol e as substâncias inéditas 1-hidroxi-1-feniletíl-tirosol e (6-metil-3-(feniletóxi)-1,4-dioxan-2-il)metanol. Algumas substâncias puras foram submetidas a bioensaios e apresentaram potencial bioatividade frente aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e nos ensaios antioxidante e anticolinesterásico. Já as citocalasinas D e B foram submetidas à avaliação da citotoxicidade utilizando linhagens de células de adenocarcinoma murino e se mostraram muito ativas.

Momesso e colaboradores (2008) realizaram um estudo com o intuito de isolar, identificar e avaliar a atividade biológica de substâncias produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (*Asteraceae*), espécie endêmica no cerrado brasileiro, sendo característico para o gênero a produção de lactonas sesquiterpênicas com atividade anti-inflamatória e diterpenos com atividade sobre músculo liso. O estudo químico do extrato bruto AcOEt obtido do cultivo em Czapek, do fungo endofítico *C. globosum* associado a folhas de *V. robusta*, resultou no isolamento de três citocalasinas (1-3), sendo que estas apresentam diversas atividades biológicas, incluindo ação citotóxica. Para os autores, a obtenção de citocalasinas reforça a hipótese de simbiose entre o fungo endofítico e a planta hospedeira, uma vez que estas substâncias bioativas poderiam auxiliar na adaptação do hospedeiro ao meio ambiente. No bioensaio de citotoxicidade, a substância 1, foi testada frente às linhagens tumorais Jurkat (leucemia T) e B16F10 (melanoma), apresentando inibições de 89,55% para a linhagem Jurkat e de 57,10% para B16F10 na concentração de 0,1 mg/mL, enquanto o cloridrato de gencitabina (controle positivo) na mesma concentração não apresentou inibição do crescimento celular. Segundo os autores os resultados obtidos ilustram o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos na busca por novos compostos bioativos, bem como novas ferramentas úteis em biologia química.

Magalhães e colaboradores (2008) realizaram um estudo visando verificar a presença de fungos endofíticos em candeia (*Eremanthus erythropappus*, (DC.) Macleish, *Asteraceae*), importante planta das áreas de Cerrado do Brasil. Esta planta é utilizada na produção do óleo essencial, cujo princípio ativo, o bisabolol, um componente muito utilizado pelas indústrias cosméticas e de fármacos, devido às suas propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antimicóticas, dermatológicas e espasmódicas. Nas análises realizadas foram obtidos 159 isolados provenientes de diferentes partes amostradas, sendo nove colônias de sementes, 35 colônias de fragmentos foliares e 115 colônias isoladas de fragmentos caulinares. Segundo os pesquisadores em relação à especificidade de colonização por órgão amostrado, notou-se que os gêneros *Xylaria* e *Phomopsis* são generalistas, pois foram encontrados em todos os tecidos.

Foi possível demonstrar também a especificidade dos gêneros: *Alternaria* e *Fusarium*, presentes em sementes, *Nigrospora* e *Aspergillus* em folha e *Dothiorella* em caule.

Pereira e colaboradores (2009) relataram a variabilidade de fungos endofíticos associados a duas espécies vegetais do cerrado, o pequi *Caryocar brasiliense* Camb. (*Caryocaraceae*) e o barbatimão *Stryphnodendron adstringens* Mart. (*Fabaceae*). Estas espécies são produtoras de tanino, utilizado como antifúngico, além de possuir alto valor econômico. Das espécies foram retiradas amostras de caule, folha, flor e fruto totalizando 1400 fragmentos. Setecentos e trinta e nove fungos foram isolados, sendo que do pequi obtiveram-se 347 (176 de caule, 145 de folha, 23 de fruto e apenas três da flor), e do barbatimão obtiveram-se 392 isolados (155 de caule, 114 de folha, 84 de flor e 39 de fruto). Segundo os autores o número de isolados foi alto comparado a outros trabalhos, demonstrando que a diversidade de fungos encontrados em pequi e barbatimão é grande, podendo haver inclusive espécies novas. Teste de antagonismo foi realizado por meio do pareamento de culturas em placas de Petri contendo BDA. Cinquenta isolados fúngicos foram testados separadamente com *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os endofíticos escolhidos para os testes não mostraram atividade antagonica frente aos micro-organismos testes, porém, entre alguns houve uma competição por espaço e alimento, favorável ao antagonista, mostrando um potencial que deve ser explorado para fins biotecnológicos.

Silva e colaboradores (2010) realizaram um ensaio fitoquímico com fungos endofíticos associados a espécie vegetal *Piper aduncum* L (*Piperaceae*) (falso-jaborandi, aperta-ruão e outros). Seis linhagens de fungos endofíticos foram isolados, sendo selecionada a linhagem PA-01 de *Xylaria* sp.. Este fungo foi então cultivado em larga escala para obtenção do extrato bruto de acetato de etila (AcOEt). O extrato bruto produzido foi testado frente a linhagem mutante de *S. cerevisiae* RS 321 e contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. O fracionamento cromatográfico por CLAE levou ao isolamento de seis citocalasinas, sendo uma inédita estabelecida como C₃₀H₃₇NO₇. Os autores afirmam que este é o primeiro relato de citocalasinas sendo produzidas por fungos endofíticos associados à *P. aduncum*. Mediante atividade seletiva do extrato bruto acetato de etila (AcOEt) contra a linhagem mutante de *S. cerevisiae* RS 321 e contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* as citocalasinas 1-6 foram avaliadas quanto à atividade antifúngica. Apesar da substância 5 ter demonstrado uma fraca atividade na concentração de 100 mg mL⁻¹, quando comparada com o padrão nistatina (1mg mL⁻¹), as

substâncias 1-6 testadas de maneira geral mostraram-se inativas, o que indica não serem as responsáveis pela bioatividade inicialmente observada no extrato bruto.

Tonial (2010) avaliou a atividade antimicrobiana e a composição química do extrato metanólico bruto das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*), conhecida como aroeira, assim como suas frações de isolados de fungos filamentosos e actinomicetos endofíticos, a fim de correlacionar a atividade antimicrobiana dos mesmos. Na análise dos isolados foram identificados nove micro-organismos endofíticos produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, entre eles estão os gêneros *Alternaria*, *Phomopsis*, *Penicillium* e *Streptomyces*. Alguns dos compostos extraídos dos endofíticos apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos testados (*S. aureus* - ATCC 27213, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 e *C. albicans* - ATCC 10231). A atividade antimicrobiana dos endofíticos testados parece estar vinculada à produção de alcalóides, presente em todos os extratos ativos. Dois extratos com atividade produzidos por endofíticos também apresentaram antraquinonas e um terpenóide. A pesquisadora ressalta que nas condições testadas não foi encontrada relação entre os compostos com atividade antimicrobiana extraídos das folhas de *S. terebenthifolius* com os extraídos dos fungos e actinomicetos isolados desta mesma planta. Entretanto, esta diversidade de vias metabólicas secundárias ressalta a importância da pesquisa destas duas fontes de metabólitos secundários biologicamente ativos.

Santos (2011) realizou um estudo químico de fungos endofíticos isolados de *Hancornia speciosa* syn. *Echites glauca* Roem. & Schult (*Apocynaceae*), espécie conhecida popularmente como mangaba, nativa do Brasil sendo encontrada em várias regiões, inclusive no cerrado. Possui utilização na medicina popular contra dermatoses e diabetes, mas também possui grande apreciação no consumo de seus frutos. O trabalho conduziu ao isolamento de quatorze linhagens de fungos endofíticos puras, sendo selecionadas quatro para o estudo químico: *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp, *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp.. Neste estudo foi possível a identificação de doze substâncias a partir dos extratos brutos desses fungos. Do extrato bruto produzido a partir de *Phomopsis* sp. isolaram-se cinco compostos: 5-metilmeleina, nectapirona, ácido succínico, 3- hidroximetilmeleina , dicetopiperazina, tirosol e triptofol. O estudo de *Guignardia* sp. conduziu ao isolamento do composto ácido salicílico, o qual tem uma importância ecológica no vegetal. Já o extrato bruto de *A. niger* levou ao isolamento dos compostos pirofen, nigragillin e ácido itacônico. E no extrato bruto de *Aspergillus* sp., foi identificada a substância ácido kójico, sendo este testado quanto a atividade antioxidante indicando que este fungo possui potencial biotecnológico.

Fungos endofíticos associados a *X. aromatica* também foram estudados por Vieira (2012). Oitenta e cinco isolados foram recuperados a partir de folhas de 30 indivíduos da planta. Dentre os isolados identificados *Xylariaceae* sp., *C. sichuanensis* e *Nigrospora* cf. *oryzae* foram os táxons mais frequentes. Extratos brutos foram produzidos a partir dos isolados e testados frente a micro-organismos de interesse clínico, sendo que destes 13 (15,3%) apresentam atividade antimicrobiana.

Carvalho e colaboradores (2012) também avaliaram a diversidade e atividade biológica de fungos endofíticos associados a *S. adstringens* (barbatimão). Neste estudo os autores recuperaram um total de 320 isolados de fungos endofíticos, compreendendo 25 gêneros identificados, dentre eles: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Muscodor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Preussia*, *Trichoderma*, *Xylaria*, *Arthrobotrys*, *Botryosphaeria*, *Coniochaeta*, *Cytospora*, *Fimetariella*, *Massarina*, *Neofusicoccum*, *Paraconiothyrium*, *Pseudofusicoccum*, *Sordaria* e *Sporormiella*. Dezesesseis extratos fúngicos demonstraram atividade quando triados frente bactérias, fungos, linhagens de células tumorais e formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Destes, o extrato de *Nigrospora* cf. *oryzae* exibiu atividade antifúngica seletiva ao inibir o crescimento de *C. albicans* e *Cladosporium sphaerospermum*, e os extratos de *Diaporthe* cf. *phaseolorum* e *Xylaria* sp. demonstraram atividade frente linhagens tumorais.

Vieira e colaboradores (2012) realizaram um estudo sobre a atividade antimicrobiana e a diversidade de fungos endofíticos associados a planta medicinal *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*) em duas estações distintas (verão e inverno). Esta planta é popularmente conhecida como "panaceia", e suas folhas e caules são utilizados na medicinal popular para o tratamento de infecções da pele, trato genito urinário e por possuir propriedades diuréticas. Um total de 246 fungos foi isolado, sendo 122 durante o inverno (104 fungos filamentosos e 18 leveduras), e 124 durante o verão (121 fungos filamentosos e 3 leveduras). Estes isolados foram identificados por métodos moleculares, sendo as espécies mais abundantes identificadas como: *Arthrobotrys foliicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Coprinellus radianos*, *Glomerella acutata*, *Diatrypella frostii*, *Phoma glomerata*, *Mucor* sp., *Phlebia subserialis*, *Phoma moricola*, *Phanerochaete sordida* e *Colletotrichum* sp.. Dos 265 extratos fúngicos triados, 64 apresentaram atividades antimicrobianas (18 apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica, 42 atividade antibacteriana seletiva e 4 apresentaram apenas atividade antifúngica). Os melhores valores de concentração inibitória mínima foram obtidos a partir de extratos de *Cryptococcus rajasthanensis*, *Glomerella acutata*, *Leptosphaeria* sp. e *Phoma glomerata* que variaram de 7,8-15,62 ug / mL. Segundo os autores este estudo é o

primeiro levantamento da comunidade de fungos endofíticos associada a *S. cernuum*, e seus resultados demonstram que estes fungos representam uma promissora fonte de compostos bioativos.

Garcia e colaboradores (2012) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos presentes nas folhas de *Sapindus saponaria* L. (*Sapindaceae*) e a localização destes fungos endofíticos por meio de microscopia eletrônica de varredura. *S. saponaria* L. é uma planta nativa conhecida popularmente como “Sabão-de-soldado, saboneteira” de ocorrência no cerrado. Apesar das partes utilizadas pela medicina popular serem cascas, raiz e frutos (como ansiolítico, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo do sangue), os autores realizaram o trabalho analisando isolados de folhas, pois segundo os mesmos, a riqueza e abundância de fungos endofíticos são maiores nas folhas. Um total de 102 fungos endofíticos foi isolado, sendo que alguns gêneros fúngicos identificados principalmente a partir do sequenciamento da região ITS do rDNA e, quando possível, também pelas suas características microscópicas como *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Phomopsis* e *Phoma*. Através da microscopia eletrônica de varredura eles observaram que estes fungos são encontrados nos espaços intercelulares e intracelulares. Estes resultados indicam, segundo os pesquisadores, que a colonização das folhas *S. saponaria* é resultante de um processo de interação íntima entre fungos endofíticos e a planta hospedeira.

Plantas medicinais oriundas do cerrado foram selecionadas por Vieira (2012) a fim de isolar fungos endofíticos e testar seu potencial bioativo. Um total de 584 isolados foram recuperados sendo, 173 associados a *Baccharis trimera* (Less.) DC. (*Asteraceae*), carqueja; 93 a *Pterodon emarginatus* Vogel (*Fabaceae*), sucupira; 135 a *Ageratum conyzoides* L. (*Asteraceae*), mentraste; e 183 a *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (*Asteraceae*), carrapicho. Extratos brutos etanólicos foram produzidos a partir de todos os isolados e testados frente *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 12600, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *C. albicans* ATCC 60193, *C. tropicalis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus neoformans* ATCC 4560, *C. gatti* ATCC 32608, *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) e *C. sphaerospermum* CCT 1740. Do total de extratos fúngicos produzidos, 141 mostraram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos micro-organismos alvos, sendo 95 oriundos de carqueja, 15 de sucupira, 16 mentraste e 15 de carrapicho.

5 CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento desta revisão foi evidenciada a diversidade de fungos endofíticos presentes em diferentes espécies vegetais de uso medicinal presentes no Cerrado, bem como a capacidade de produção de extratos com atividade biológica por meio destes. Este fato reafirma a hipótese de que todas as plantas possuem um ou mais tipos distintos de fungos endofíticos, e que o bioma Cerrado é um rico reservatório de tais micro-organismos, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novos estudos voltados a bioprospecção de fungos endofíticos.

6 BIBLIOGRAFIA

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

ALY, A. H. et al. **Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products**. *Fungal Diversity*, 41:1–16, 2010.

ARNOLD, A. E. **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers**. *Fungal biology reviews*, 21, 51 – 66, 2007.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. PP. 117-137. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariuna, Embrapa- CNPMA. 1998.

AZEVEDO, J. L. **Botânica: uma ciência básica ou aplicada?** *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, oct 1999.

AZEVEDO, J. L. et al. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants**. *Electronic Journal of Biotechnology*, Valparaiso, v.3, n. 1, p. 40-65, abr. 2000.

AZEVEDO, M.C.A. **Bioprospecção: coleta de material biológico com a finalidade de explorar recursos genéticos**. *Caderno 17 (2ª edição); Série Ciência e Pesquisa; Conselho da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica*, 35p. 2003.

BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. **Endophytes: An emerging tool for biological control**. *Biological Control* 46, 1–3, 2008.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. de. **Coevolução de plantas e fungos patogênicos**. *Rev. Bras. de Agrociência*, v.7 n. 2, p. 79-83 mai-ago, 2001.

BARBOSA, T.C.S. **Plantas Medicinais do Cerrado**. In: GOMES, H. *Universo do Cerrado*. Goiânia: Ed. da UCG, 2 v., 2008.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acucar e madeira em decomposição**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.

BUSTAMANTE, K.G.L. et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.3, p.341-345, 2010.

CAFÊU, M. C. et al. **Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae).** *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 6, 991-995, 2005.

CAFÊU, M. C.. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae).** Tese (doutorado em Química) Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2007.

CANUTO, K. M. et al. **Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura.** Embrapa Agroindústria Tropical, série documentos, Fortaleza, 34 p.; 2012.

CARVALHO, C. R. de. **Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville (“barbatimão” - Fabaceae).** Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CARVALHO, C.R. et al. **The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah.** *Symbiosis* 57, 95-107, 2012.

CHANDRA, S. **Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules.** *Appl Microbiol Biotechnol* 95, 47–59, 2012.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais.** *Rev. Virtual Quim.*, XXXX, X (X), *no prelo*. Data de publicação na Web: 11 de novembro de 2012. Disponível em: <<http://www.uff.br/rvq>> Acesso em: 6 de maio de 2013.

COSTA, L. N. F. da et al. **Bioprospecção de atividade lipolítica de fermentos biológicos comerciais (*Sacharomyces cerevisiae*) Dr. Oetker e Dona Benta.** *Revista de Biologia e Farmacia*, Vol 07. N°01. 2012.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro.** Brasília: MMA, 934p., 2011.

D'AMICO, M.; FRISULLO, S.; CIRULLI, M. **Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory, and celery - commercial crops in southern Italy.** Mycological Research, 112; 100 – 107, 2008.

DELABONA, P. da S. **Bioprospecção de fungos produtores de celulase da região amazônica para a produção de etanol celulósico.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

DUDEJA, S.S. et al. **Interaction of endophytic microbes with legumes.** Journal of Basic Microbiology 52, 248–260, 2012.

FERREIRA, E. de F.P. **Biodiversidade e biotecnologia de fungos endofíticos.** Monografia (Especialização em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson Estúdio : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol.1, 2010.

GALLO, M. B. C. et al., **Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products.** Journal of Basic Microbiology, 49, 142–151, 2009.

GARCÍA, A. et al. **Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L . and their localization by scanning electron microscopy.** Biol. Res 45, 139-148, 2012.

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

GUNATILAKA, A.A.L. **Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence.** J. Nat. Prod. 69, 509-526, 2006.

KUSARI, S., et al. **Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites.** Phytochemistry (<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.021>), 2012.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. **Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?** Nat. Prod. Rep., 28, 1203, 2011.

LINDOSO, G. da S. et al. **Caracterização Geral do Bioma Cerrado e da Região no Norte Mineiro.** In: FELFILI, J.M. Estudos de vegetação para subsidiar a criação das Reservas Extrativistas Barra do Pacui e Buritizeiro – MG. Brasília: MMA, 2010.

LOGUERCIO-LEITE, C. et al. **A particularidade de ser um fungo – Constituintes celulares.** Biotemas, Florianópolis, v. 19, n. 2, p. 17-27, jun. 2006.)

LOPES, F. C. **Produção e análise de metabolitos secundários de fungos filamentosos.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2011.

MACCHERONI, W. Jr.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O.S. **Ecologia: e Interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias.** In: ESPOSITO, Elisa e AZEVEDO, João Lucio. Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caixas do Sul: Educs, 2010. 451-490.

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. de. **Os Fungos do Brasil.** In: FORZZA, Rafaela Campostrini; et al.. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson Estúdio : Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol.1, 2010.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.).** Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARONI, B.C.; DI STASI, L.C.; MACHADO, S.R. **Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado.** São Paulo: Ed. UNESP, 2006.

MELLO, S. C. M. de; REIS, A.; SILVA, J. B.T. de. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Fungos Filamentosos.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 25 p., 2011.

MOMESSO, L. da S. et al..**Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae).** Quim. Nova, Vol. 31, No. 7, 1680-1685, 2008.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. **Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas.** Boletim latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromatica, v.3 n°4p. 69-72, 2004.

NETO, P. A. de S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico.** Biot. Ciência & Desenv. 29, 62-69, 2002.

OLIVEIRA, V. B. de. **Potencial dos frutos de *Xylopia aromatica* (lam.) Mart. (Annonaceae) no tratamento de alterações metabólicas, induzidas por dieta em camundongos BALB/c.** Dissertação(Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG . 2012.

ORLANDELLI, R.C. et al. **Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves.** Genetics and Molecular Research 11 (2): 1575-1585, 2012.

PEREIRA, A. M. **Condicionantes institucionais para bioprospecção no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Econômico/ Economia do Meio Ambiente), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

PEREIRA, V. M. et al. **Variabilidade endofítica associada a plantas taníferas do cerrado brasileiro: potencial biotecnológico.** Resumo. 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia /SP. 2009. < Disponível em: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/resumos>> Acesso em: 6 de maio de 2013.

PIMENTEL, I. C. et al. **Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merril) under different Environmental Conditions.** Braz. Arch. Biol. Technol. 49, 705-71, 2006 A.

PIMENTEL, I. C. et al. **Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.).** Floresta, Curitiba, PR, v. 36, n. 1, jan./abr. 2006 B.

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. **Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*.** Summa Phytopathol., Botucatu, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.

PHONGPAICHIT, S., et al. **Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants.** FEMS Immunol Med Microbiol 51: 517–525, 2007.

- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2. ed. ,(v.1), 2004.
- RIBEIRO, R. F. **O Bioma Cerrado**. In: DIAS, J. E. ; LAUREANO, L.C. *Farmacopéia Popular do Cerrado* .Goiás: Articulação Pacari (Associação Pacari), 2009.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais**. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, 2001.
- RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. **More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis**. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 5, pp. 1109–1114, 2008.
- RODRIGUEZ, R. J. **Fungal endophytes: diversity and functional roles**. *New Phytologist* 182: 314–330, 2009.
- SANO, E. E. et al. **Mapeamento de cobertura vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007.
- SANTOS MAGALHÃES, W. C. et al. **Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish**. *Cerne*, Vol. 14, Núm. 3, pp. 267-273, 2008.
- SANTOS, M. F. C. **Estudo químico dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp. *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., associados à espécie vegetal *Hancornia speciosa* (Apocinaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2011.
- SEBASTIANES, F.L de S. **Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo**. Tese (doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo/ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- SELIM, K.A. et al. **Biology of Endophytic Fungi**. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 2(1), 31-82, 2012.
- SINGH, L. P.; GILL, S.t S.; TUTEJA, N. **Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance**. *Plant Signaling & Behavior* 6:2, 175-191; 2011.

- SIQUEIRA, D. R. **Bioprospecção de fungos amazônicos com atividade antifúngica frente aos fitopatógenos de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). MANAUS, Universidade do Estado do Amazonas, 2011.
- SILVA, C.S. P. da; PROENÇA, C. E. B. **Flora medicinal nativa do bioma cerrado catalogada por estudos etnobotânicos no estado de Goiás, Brasil**. Revista Anhangüera v.8 n.1 jan./dez. p.67-88 2007.
- SILVA, F. C. da. **Taxonomia Polifásica de *Aspergillus* seção *Flavi* e aplicação de óleos essenciais para controle de fungos aflatoxigênicos**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2012.
- STIERLE, A. et al. **The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacificyew, *Taxus brevifolia***. Journal of Natural Products, v. 58, p. 1315-1324, 1995.
- STROBEL, G. A. **Endophytes as sources of bioactive products**. Microbes and Infection 5, 535–544, 2003.
- STROBEL, G. et al. **Natural products from endophytic microorganisms**. Journal of Natural Products, vol. 67, no. 2, 2004.
- STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products**. Microbiology and Molecular Biology, vol. 67, no. 4, p. 491–502, 2003.
- STROBEL, G.A. et al. **Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity**. Journal of Industrial Microbiology, 17, 417-423, 1996.
- SUN, J.Q. et al. **Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants**. Science in China Series C: Life Sciences vol. 51, no. 8, 751-759, 2008.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. **Endophytes: a rich source of functional metabolites**. Nat. Prod. Rep., 18, 448–459, 2001.
- TELES, H. L. et al. **Benzopyrans from *Curvularia* sp., an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae)**. Phytochemistry 66. 2363–2367, 2005.
- TELES, H. L. **Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea*, an endophytic fungus associated with *Xylopiia aromatica***. Phytochemistry 67, 2686–2690, 2006.

TERÇARIOLI, G. R.; PALEARI, L. M.; BAGALI, E. **O incrível mundo dos fungos**. Ed. UNESP, São Paulo, 2010.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal do Paraná, CURITIBA , 2010.

VIEIRA, M. L.A. de. **Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas bioativas de diferentes ecossistemas brasileiros**. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

VIEIRA et al. **Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae)**. Can. J. Microbiol. Vol. 58, 2012.

ZHANG, H. W.; SONG, Y.C.; TAN, R. X. **Biology and chemistry of endophytes**. Nat. Prod. Rep., 23, 753–771, 2006.