

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS A *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville
("Barbatimão" - *Fabaceae*)**

Camila Rodrigues de Carvalho

BELO HORIZONTE
2011

Camila Rodrigues de Carvalho

DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS A *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville
("Barbatimão" - *Fabaceae*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Microbiologia

Orientador: Luiz Henrique Rosa
Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais – ICB/UFMG

Coorientador: Carlos Augusto Rosa
Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos – ICB/UFMG

BELO HORIZONTE
2011

Colaboradores:

Dr. Carlos Leomar Zani

Dr^a. Tânia Maria de Almeida Alves

Laboratório de Química de Produtos Naturais
Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A DEUS, razão da minha eterna gratidão, agradeço pelo amor, fidelidade, por estar sempre ao meu lado e me fortalecer em todos os momentos da minha caminhada;

A Maria, minha Mãe, obrigada pelo cuidado, intercessão e presença constante;

Ao Prof. Luiz Rosa, agradeço pela orientação, oportunidade, discussões e ensinamentos. Obrigada também pelo apoio e amizade, essenciais para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Carlos Rosa, agradeço primeiramente por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Muito obrigada pela orientação, correções, valiosas sugestões, paciência e confiança;

Enfim, agradeço aos meus Orientadores, pelas oportunidades a mim dadas durante a realização deste trabalho, apoio e confiança. Foi um privilégio desenvolver esta dissertação sob a orientação de vocês e integrar este grupo de pesquisa;

Aos membros da banca examinadora, Prof. Ludwig Heinrich Pfenning e Prof. Daniel de Assis Santos, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que certamente serão muito importantes para a melhoria e continuidade dos nossos estudos;

A Prof^ª. Viviane Alves Gouveia, revisora desta dissertação, pelas sugestões e contribuições;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pela oportunidade, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente ao Douglas e à Fatinha;

A todos os professores e colegas do curso de Pós-graduação em Microbiologia;

Aos botânicos Viviane Scalon (UFOP), Marcos Sobral (UFSJ), Pedro Viana e demais do Departamento de Botânica da UFMG, pela ajuda no reconhecimento dos exemplares de barbatimão;

Ao Dr. Carlos Zani, Dr^a Tânia Maria Alves e demais do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), pela colaboração e permissão para utilizar a infraestrutura do laboratório;

Ao Jamil, Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, muito obrigada pela disponibilidade e ajuda na secagem dos extratos;

Ao pessoal do LBEM/UFMG e LPCM/CPqRR-FIOCRUZ por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização dos sequenciamentos;

À Suzana Johan pela atenção e dicas dadas para a realização dos ensaios de determinação antifúngica;

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras: Alice, Aline, Anne Carol, Antônio, Bárbara, Bruno, Camila, César, Cibele, Cris, Débora, Denise, Fátima, Fernanda Badotti, Fernanda Piló, Gabi, Helen, Iara, Inayara, Larissa, Laura, Lindi, Lília, Lorena, Luciana, Mari Costa ('Zé'), Mari Vieira, Mariana Rezende, Michelle, Monaliza, Mônica, Natália, Nayara, Núbia, Paula Moraes, Paula São Thiago, Priscila, Raquel, Renata ('Rê'), Silvana ('Sil'), Susana, Valéria de Macedo, Valéria Godinho, Victor e Vivi, agradeço pelos ótimos momentos que convivemos, ensinamentos e ajuda. Vocês são demais!!!

Em especial a Mari Vieira e Cris pela amizade, paciência, ensinamento e ajuda nas coletas/processamento e ensaios biológicos;

Em especial, a Vivi, minha irmã gêmea, agradeço imensamente pela fiel amizade durante esses dois anos. Obrigada pela paciência, apoio, ensinamentos, sorrisos, diversão e toda a ajuda desde o primeiro dia que entrei no lab.;

Ao Thiago, Lorena e Tayline obrigada pela ajuda nos experimentos;

A Rafa Avelar e Carol Barcelos, por dividirmos o mesmo sonho que hoje se concretiza;

Aos meus pais, minha riqueza e exemplo de vida, muito obrigada pelo apoio, orações e por estarem sempre ao lado;

Ao meu querido irmão e amigo João Paulo, agradeço simplesmente por existir e alegrar os meus dias;

A minha família Rodrigues e Carvalho, obrigada pelo amor, suporte e por estarem sempre presentes;

As minhas queridas do dia a dia, Marina, Camila, Roberta e Maísa, 'bendito encontro na vida', obrigada pela adorável convivência, carinho e apoio. Em especial a Mary, pela paciência e por estar sempre ali ao lado! E aos agregados, Rei, Ramon e Lucas!!!

As minhas mais que amigas e praticamente irmãs, Ma, Sil, Mariela, Lorena, Ma Mendes, Jackie, Ju e Elis, obrigada por se fazerem sempre presentes apesar da distância física e por compreenderem a minha ausência;

Aos novos e já muito especiais amigos, Plínio, Luciano, Gi, João e Dani, agradeço pelas boas risadas, apoio e carinho;

A todos do Ministério de Música Sementes da Trindade e do EJC, Encontro de Jovens com Cristo, pelas orações e convivência;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Microrganismos endofíticos	22
2.2 Diversidade de fungos filamentosos endofíticos associados a folhas e caules	23
2.3 Interações entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras	27
2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos	29
2.5 <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville (<i>Fabaceae</i>).....	36
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Áreas de Coleta	42
4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos	43
4.3 Identificação dos fungos endofíticos isolados	45
4.3.1 Fungos filamentosos	45
4.3.1.1 Extração do DNA total	45
4.3.1.2 Amplificação utilizando os iniciadores IT1 e IT4	46
4.3.1.3 Purificação dos amplicons	46
4.3.1.4 Reações de sequenciamento.....	47
4.3.1.5 Análise computacional das sequências	48
4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e equitabilidade	49
4.5 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos.....	49
4.5.1 Fungos filamentosos	49
4.5.2 Extratos dos vegetais	50

4.6 Ensaio Biológicos	50
4.6.1 Determinação da atividade antifúngica.....	50
4.6.2 Padronização dos inóculos.....	51
4.6.3 Ensaio antifúngico	52
4.6.4 Ensaio de toxicidade para células tumorais humanas.....	53
4.6.5 Ensaio <i>in vitro</i> com a forma amastigota-like de <i>Leishmania (leishmania) amazonensis</i>	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos	55
5.2 Identificação dos fungos filamentosos endofíticos	59
5.2.1 Composição de fungos filamentosos obtidos a partir de indivíduos jovens de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	60
5.2.2 Composição de fungos filamentosos obtidos a partir de indivíduos adultos de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	69
5.3 Diversidade da comunidade fúngica associada à <i>Stryphnodendron adstringens</i>	83
5. 4 Cultivos do fungos e preparo dos extratos	92
5.5 Ensaio Biológicos	93
5.5.1 Determinação da atividade antifúngica.....	95
5.5.2 Determinação da atividade contra células tumorais humanas	105
5.5.3 Determinação da atividade antiparasitária	106
6 CONCLUSÃO.....	107
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8 ANEXO	127

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Hipótese sobre o antagonismo balanceado entre a planta hospedeira e microrganismo endofítico (SCHULZ & BOYLE, 2005)..... 29
- Figura 2: Moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos 36
- Figura 3: Árvore, folha e tronco de *Stryphnodendron adstringens*. 40
- Figura 4: Localização dos municípios onde foram realizadas as coletas dos indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* em Minas Gerais..... 42
- Figura 5: Fragmentos de folhas e cascas de *Stryphnodendron adstringens* inoculados em Ágar Dextrose Batata (BDA)..... 444
- Figura 6: Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios antifúngicos realizados. 53
- Figura 7: Porcentagem de fungos endofíticos associados a *Stryphnodendron adstringens* agrupados em classes. 60
- Figura 8 a e b: Árvores filogenéticas dos fungos filamentosos obtidos de exemplares jovens de *Stryphnodendron adstringens*. As árvores filogenéticas foram construídas baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA utilizando o método *Neighbour-joining*. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo..... 66
- Figura 9 a, b, c e d: Árvores filogenéticas dos fungos filamentosos obtidos de exemplares adultos de *Stryphnodendron adstringens*. As árvores filogenéticas foram construídas baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA utilizando o método *Neighbour-joining*. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo..... 76

Figura 10: Porcentagem de extratos de fungos endofíticos isolados de *Stryphnodendron adstringens* considerados ativos e promissores nos ensaios biológicos de acordo com o indivíduo coletado. 94

Figura 11: Tecido de isolamento dos fungos endofíticos classificados como promissores e ativos associados à *Stryphnodendron adstringens*. 95

Figura 12: Táxons identificados considerados medianamente promissores para alguma linhagem alvo de *Candida albicans*. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fungos endofíticos obtidos de folhas e cascas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	57
Tabela 2: Identificação molecular dos fungos endofíticos obtidos de indivíduos jovens de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	62
Tabela 3: Identificação molecular dos fungos endofíticos obtidos de indivíduos adultos de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	70
Tabela 4: Número de isolados e abundância (%) dos fungos endofíticos associados a indivíduos jovens e adultos de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	86
Tabela 5: Número de isolados e abundância (%) dos fungos endofíticos obtidos de folhas e cascas de indivíduos jovens e adultos de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	90
Tabela 6: Classificação dos extratos fúngicos em relação ao nível de atividade antifúngica apresentada.	97
Tabela 7: Isolados de fungos endofíticos obtidos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> considerados promissores para as linhagens alvo de <i>Candida albicans</i>	102

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que ocupam o interior de tecidos de plantas sem causar sintomas aparentes de doença. Estes microrganismos podem ser encontrados em diferentes tipos vegetais e representam fontes promissoras de metabólitos bioativos de interesse farmacológico. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) é uma angiosperma de ampla distribuição geográfica e utilizada devido sua ação cicatrizante, antiinflamatória, hemostática, antimicrobiana, anti-séptica e antidiarréica. Apesar de seu amplo emprego na medicina popular, nenhum trabalho foi realizado, até o momento, com o objetivo de conhecer a micota endofítica associada a esta planta. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade de fungos endofíticos associados a *S. adstringens* e avaliá-los quanto à produção de metabólitos antifúngicos, citotóxicos e antiparasitários. Fragmentos de folhas e cascas de 30 indivíduos jovens e adultos de *S. adstringens* foram desinfestados superficialmente e inoculados em Ágar Dextrose Batata (BDA). As placas foram incubadas por até 60 dias e os fungos obtidos foram purificados em meio BDA. Das plantas jovens foram obtidos 200 isolados de fungos filamentosos e das plantas adultas, 147 isolados. Todos os isolados foram depositados na Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. De acordo com as características macromorfológicas, os isolados foram agrupados em 99 morfotipos. Um representante de cada morfotipo foi selecionado para o sequenciamento da região ITS do gene do rRNA. Os isolados foram identificados pertencentes aos gêneros: *Alternaria*, *Arthrotrys*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniochaeta*, *Cytospora*, *Diaporthe*, *Fimetariella*, *Guignardia*, *Massarina*, *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Paraconiothyrium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Preussia*, *Pseudofusicoccum*, *Sordaria*, *Sporormiella*, *Trichoderma* e *Xylaria*. Todos estes gêneros pertencem ao filo *Ascomycota*. Além disso, três táxons foram identificados como *Diaporthales* sp., *Pezizales* sp. e *Glomerellaceae* sp. A abundância dos táxons variou de 0,31 a 20,76%. Destes, *Phomopsis* sp., *Diaporthe phaseolorum*, *Diaporthales* sp. e *Guignardia camelliae* foram os mais abundantes. A diversidade de táxons foi avaliada em termos de riqueza e equitabilidade por meio dos índices de Shannon (H') e de Simpson. O maior valor de H' foi atribuído a comunidade

fúngica associada às plantas adultas ($H' = 2,79$), mas o índice de Simpson apresentou valores próximos entre plantas jovens e adultas (0,90 e 0,88), o que indica uma distribuição homogênea dos táxons dentro de cada comunidade. Os fungos endofíticos foram cultivados em BDA por 15 dias e após este período, o crescimento fúngico e o meio de cultura foram tratados com etanol para obtenção dos extratos brutos. A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em placa utilizando como alvo linhagens de *Candida albicans* (ATCC 18804, 2.1A, 15.3C). O ensaio de toxicidade para células tumorais humanas foi avaliado utilizando-se as linhagens tumorais MCF-7 (mama) e TK-10 (renal). A ação antiparasitária foi avaliada sobre a forma amastigota de *Leishmania amazonensis*. Na determinação da atividade antifúngica, 0,3% dos extratos foram promissores (apresentaram valores de inibição maior ou igual a 70%), 5,2% medianamente promissores (apresentaram valores de inibição entre 50-69%) e 94,5% não promissores (apresentaram valores de inibição menor ou igual a 49%) contra pelo menos uma linhagem alvo de *C. albicans* quando os extratos foram utilizados na concentração de 100 µg/mL. Já nos testes dos extratos na concentração de 250 µg/mL, 13,7% dos extratos foram promissores, 56,8% medianamente promissores e 39,5% não promissores. Nenhum extrato apresentou atividade contra *L. amazonensis* e 18,7% dos extratos fúngicos foram ativos contra células tumorais humanas. Os fungos produtores de extratos ativos foram identificados como: *Colletotrichum boninense*, *Diaporthe phaseolorum*, *Glomerellaceae* sp., *Guignardia mangiferae*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis clavispora*, *Phomopsis* sp., *Pseudofusicoccum* sp. e *Xylaria* sp. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da micota endofítica associada a *S. adstringens*. Os fungos endofíticos com extratos bioativos representam uma possível fonte potencial de substâncias que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e antitumorais.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that grow inside plant tissue, with no apparent symptom of disease. These microorganisms are found in different plants and they can represent a promising source for a variety of bioactive metabolites with great potential for pharmacological use. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) is an angiosperm plant with wide geographical distribution and it is used because of its healing, anti-inflammatory, hemostatic, antimicrobial, antiseptic and antidiarrheal activity. Until now there are no studies regarding its associated endophytic mycota, despite its wide use in popular medicine. The aim of this study is to elucidate this diversity of endophytic fungi diversity associated with *S. adstringens* and evaluate their production of antifungal, cytotoxic and antiparasitic metabolites. Leaves and stems fragments of thirty young and old individuals of *S. adstringens* were inoculated on Potato Dextrose Agar (PDA), after surface sterilization. The plates were incubated for a period up to 60 days and the fungi isolates were purified on PDA medium. Two hundred filamentous fungi were obtained from young individuals, and 147 from old individuals. All the isolates were deposited into the Microorganisms and Cells Culture Collection of the Universidade Federal de Minas Gerais. All the isolates were grouped according to their macroscopic characteristics into 99 morphotypes, and one isolate of each group was selected to molecular identification by sequencing the ITS region of the rRNA gene. The isolates identified were belong to the genus: *Alternaria*, *Arthrotrrys*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniochaeta*, *Cytospora*, *Diaporthe*, *Fimetariella*, *Guignardia*, *Massarina*, *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Paraconiothyrium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Preussia*, *Pseudofusicoccum*, *Sordaria*, *Sporormiella*, *Trichoderma* and *Xylaria*. All genera belonging to the *Ascomycota* phylum. Moreover, three taxa were identified as *Diaporthales* sp., *Pezizales* sp. and *Glomerellaceae* sp. The abundance of the taxa ranged from 0,31% to 20,76%. *Phomopsis* sp., *Diaporthe phaseolorum*, *Diaporthales* sp. and *Guignardia camelliae* were the most abundant. Taxa diversity was measured by Shannon (H') and Simpson indices. The fungal community associated with old plants presented the highest H' ($H' = 2,79$), but the Simpson index presented values close between young and old plants (0.90 e 0.88), which indicates a uniform distribution of taxa into the

each community. The endophytic fungi were cultivated in PDA medium during 15 days and after this period, the fungal growth and the medium were treated with ethanol in order to obtain crude extracts. The antifungal activity of these crude extracts was evaluated by the method of microdilution in plate using strains of *Candida albicans* (ATCC 18804, 2.1A, 15.3C) as target. The toxicity assays to human cancer cell lines were evaluated using the cancer cell lines MCF-7 (breast) and TK-10 (renal). The antiparasitic activity was evaluated with amastigote-like forms of *Leishmania amazonensis*. At the concentration 100 µg/mL, 0.3% of the extracts were considered promising (the extracts presented inhibition values greater than or equal to 70%), 5.2% were moderately promising (the extracts presented inhibition values greater between to 50-69%) and 94.5% unpromising (the extracts presented inhibition values less than or equal to 70%) against at least one of the *C. albicans* strains. On the tests with extracts at 250 µg/mL, 13.7% of the extracts were promising, 56.8% were moderately promising and 39.5% unpromising. None of the extracts were active against *L. amazonensis* and 18.7% fungal extracts were active against the cancer cell lines. The active fungi were identified as: *Colletotrichum boninense*, *Diaporthe phaseolorum*, *Glomerellaceae* sp., *Guignardia mangiferae*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis clavispora*, *Phomopsis* sp., *Pseudofusicoccum* sp. and *Xylaria* sp. The results obtained in this work contributes for the knowledge of the endophytic mycota associated to *S. adstringens*. The endophytic fungi with active extracts represent a possible potential source for substances that can be used as prototypes to the development of new antimicrobial and antitumor drugs.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFTS: Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee
AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APRT: Adenina-fosforribosil-transferase
ATCC: American Type Culture Collection
B: Índice de Bray-Curtis
BDA: Ágar Dextrose Batata
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures
C-endofíticos: Endofíticos clavicipitaceos
CGEN: Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CFM : Concentração Fungicida Mínima
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
cm: centímetro
CPqRR: Centro de Pesquisas René Rachou
CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio
CO₂: dióxido de carbônico
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO: Densidade óptica
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIEC: Entero invasiva
ETEC: Enterotoxigênica
EPEC: Enteropatogênica
EUA: Estados Unidos da América
EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
g: grama
g/L: grama por litro
GO: Goiás

GPS : Global Positioning System
H': Índice de Shannon
Hcmv: Citomegalovírus humano
HepG2: Carcinoma de fígado humano
H₂O: Água
HCl: Ácido clorídrico
HSV1: Herpes simples 1
IC₅₀: Concentração inibitória de 50%
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IEF: Instituto Estadual de Florestas
IRR/FIOCRUZ: Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz
ITS: Região transcrita interna
KB: nasofaringe epidermóide
Kg: quilo
Km²: quilômetros quadrados
LBEM: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular
LPC: Laboratório de Pesquisas Clínicas
LPCM: Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular
LQPN: Laboratório de Química de Produtos Naturais
M: molar
m: metro
MCF-7: Célula de adenocarcinoma de mama humano
MEGA: Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl₂: Cloreto de magnésio
MG: Minas Gerais
mg: miligrama
mg/L: miligrama/litro
mg/mL: miligrama/mililitro
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mM: Milimolar
mol/L : mol por litro
MOPS : ácido morfolinepropano sulfônico
MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico

MW: Peso molecular
μmol: micromol
μg: Micrograma
μg/mL: Micrograma/mililitro
μl: Microlitro
NaCl: Cloreto de sódio
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NC-endofíticos: Endofíticos não clavicipitaceos
NCI: National Cancer Institute
ng: nanograma
nm: Nanômetro
P.A.: para análise
PAST: Palaeontological Statistics
pB: pares de base
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PEG: polietilenoglicol
pH: potencial hidrogeniônico
p/v: peso/volume
QS: Índice de Sorensen
q.s.p.: quantidade suficiente para
rDNA: DNA ribossomal
rRNA: RNA ribossomal
r.p.m.: Rotações por minuto
s: Segundo
S: sul
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SmF: Submerged Fermentation
SSF: Solid State Fermentation
STEC: Shiga Toxigênica
TBE: Tris borato
TK-10: Célula de câncer renal
TryR: Tripanotiona redutase
U: Unidade

UFC: Unidade formadora de colônia

UFC/mL: Unidades formadoras de colônia por mililitro

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFMGCB : Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais

UV: ultravioleta

V: Volts

W: oeste

%: por cento

°C: graus Celsius

1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O surgimento de doenças emergentes, o aumento da incidência de infecções microbianas e a resistência de microrganismos patogênicos aos medicamentos atuais ressaltam a importância da realização de trabalhos de bioprospecção para descoberta de novas moléculas com atividades biológicas. Frente a essa necessidade, a diversidade de vegetais e de microrganismos compõem uma fonte promissora, a fim de obter metabólitos bioativos que sirvam como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Os microrganismos endofíticos, aqueles que habitam tecidos vegetais vivos sem causar sinais, se revelam como uma fonte promissora de moléculas bioativas úteis para utilização como drogas na agricultura, medicina e indústria. Na literatura há vários relatos de microrganismos endofíticos, em especial fungos, produtores de metabólitos com atividades antitumorais, imunomoduladoras, antimicrobianas, antiparasitárias, inseticidas, dentre outras. Ao considerar a ocorrência de quase 300 mil espécies de plantas na terra e que cada uma pode ser hospedeira de um ou mais táxons endofíticos, a probabilidade de se encontrar microrganismos capazes de produzir substâncias bioativas com atividade biológica é considerada relativamente alta.

Os metabólitos secundários ou produtos naturais podem ser definidos como substâncias de baixo peso molecular que a princípio são “dispensáveis” para a sobrevivência e desenvolvimento do microrganismo. Estes metabólitos são extremamente diversos quimicamente, sendo continuamente modificados e adaptados devido à pressão seletiva ambiental. Atualmente, inúmeros fármacos comercializados são derivados do metabolismo secundário de fungos. O diterpeno paclitaxel, uma das substâncias mais utilizadas na quimioterapia do câncer de mama, inicialmente isolado do vegetal *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*), foi obtido a partir do fungo *Taxomyces andreanae*, encontrado como endofítico em *T. brevifolia*. A partir desta descoberta houve um aumento substancial nos estudos dos fungos endofíticos associados à plantas bioativas.

O uso de plantas medicinais para tratamento de doenças é comum. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*), conhecido popularmente como barbatimão, é utilizado pela população do estado de Minas Gerais e do Brasil

desde o século XIX. A casca é empregada como remédio, devido à presença do tanino, substância com propriedade adstringente. O barbatimão é amplamente utilizado por possuir atividades cicatrizantes, antiinflamatórias, hemostáticas, anti-sépticas e antidiarréicas. Trabalhos atuais mostram também a ação antimicrobiana e tripanosomicida desta planta.

Trabalhos recentes mostram que algumas propriedades medicinais atribuídas aos vegetais podem estar relacionadas ao produto do metabolismo secundário de seus fungos endofíticos. Neste contexto, um dos critérios adotados para a seleção de plantas alvos para o isolamento de microrganismos endofíticos são plantas que exibem propriedades medicinais conhecidas. Dados a respeito da comunidade de fungos endofíticos associados ao *S. adstringens* são escassos. Desta forma, o estudo deste grupo de fungos associados a *S. adstringens* bem como sua utilização como fonte de metabólitos secundários bioativos apresenta-se como uma alternativa promissora para descoberta de moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos são aqueles que, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais vivos sem causar sinais aparentes de doença ou efeitos negativos a seus hospedeiros (BACON & WHITE, 2000). Os endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem delineou a diferença entre endofíticos e os fitopatógenos. Contudo, somente após ter sido verificado as interações benéficas estabelecidas pelos endofíticos em seus hospedeiros, é que estes microrganismos adquiriram importância científica (AZEVEDO, 1999). Tais microrganismos ocorrem nas partes aéreas das plantas, como caules e folhas, sendo que a colonização destas partes é normalmente confinada a células individuais ou localizada (WILSON, 1995; TAN & ZOU, 2001; SCHULZ & BOYLE, 2005), e também nas raízes (RODRIGUES et al., 2009).

Ferrara (2006) e Strobel et al. (2004) relataram que todos os vegetais estudados até o momento abrigam microrganismos endofíticos, sendo possível o isolamento de um elevado número de espécies a partir de um único hospedeiro. O termo microrganismo endofítico pode ser referido a insetos (FELLER, 1995), protistas (PETERS, 1991), bactérias (KOBAYASCHI & PALUMBO, 2000) e fungos (STONE et al., 2000). Contudo, os fungos são isolados geralmente com maior frequência (STROBEL & DAISY 2003; STROBEL et al., 2004; TAN & ZOU, 2001).

Webber (1981) foi provavelmente o primeiro pesquisador a relatar um exemplo de proteção à planta conferida pelo fungo endofítico *Phomopsis oblonga* o qual reduziu a dispersão de *Ceratocystis ulmi*, um fungo causador da doença do olmo, pelo controle de seu vetor, o besouro *Physocnemum brevilineum*. O autor associou o efeito repelente contra os insetos aos metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos. Quatro anos depois, o mesmo foi confirmado por Claydon et al. (1985), os quais mostraram que fungos endofíticos pertencentes à família *Xylariaceae* e associados à espécie do gênero *Fagus*, foram capazes de sintetizar metabólitos secundários que afetavam o desenvolvimento de larvas de besouros (AZEVEDO et al., 2000).

2.2 Diversidade de fungos filamentosos endofíticos associados a folhas e caules

Fungos endofíticos, representados principalmente por fungos ascomicetos, são definidos funcionalmente por sua ocupação assintomática no interior de tecidos de plantas (ARNOLD, 2007); os quais são encontrados em diferentes tipos vegetais como árvores de grande porte, gramíneas e plantas herbáceas (STROBEL & DAISY, 2003). 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 angiospermas, mas também de plantas não vasculares, samambaias. Contudo, o grupo dos NC-endofíticos são fungos altamente diversos que se divide em pelo menos três grupos funcionais distintos, baseado em características de colonização do hospedeiro, mecanismo de transmissão entre gerações, níveis de biodiversidade e funções ecológicas.

Fatores como estilo de vida, ubiquidade e riqueza dos fungos endofíticos presentes no tecido vegetal de diferentes plantas, associado à importância ecológica, tem aumentado o interesse em relação ao conhecimento destes microrganismos nas últimas décadas. Este interesse relaciona-se à diversidade deste grupo, interação com suas plantas hospedeiras, colonização, caracterização de novos metabólitos ou outros tópicos relacionados com a interação endofítico-hospedeiro (ARNOLD, 2007).

As florestas tropicais e temperadas constituem os ecossistemas terrestres com maior biodiversidade do planeta, porém muitos autores concordam que a diversidade fúngica atinge seu ápice em florestas tropicais (ARNOLD et al., 2000; TAN & ZOU, 2001; STROBEL & DAISY, 2003; FERRARA, 2006). Em função disto, uma variedade de espécies de microrganismos, provavelmente, ainda não foi isolada e caracterizada, principalmente quando se considera a enorme diversidade de plantas existentes em diferentes ecossistemas (TAN & ZOU, 2001).

Cada hospedeiro vegetal pode abrigar uma comunidade característica de endofíticos. Contudo, a composição e a frequência destes microrganismos podem ser significativamente afetadas por fatores como: a espécie do vegetal e sua distribuição geográfica, a umidade relativa do ambiente, a posição relativa da planta

(sua altura em relação ao solo), idade e parte da planta, dentre outros (PETRINI et al., 1992; CARROL, 1995; RODRIGUES & PETRINI, 1997; SAIKKONEM et al., 1998; STROBEL, 2003).

A colonização por fungos é localizada, em apenas uma parte do vegetal hospedeiro, mas em alguns casos também pode ocorrer de forma sistêmica (SCHULZ & BOYLE, 2005). Aparentemente, os microrganismos endofíticos presentes no tecido foliar são transmitidos horizontalmente (SAIKKONEN et al., 1998; SCHULZ & BOYLE, 2005). As folhas, logo após emergirem, acumulam numerosas infecções por meio de germinação epifítica de propágulos fúngicos, seguido por penetração através da cutícula ou dos estômatos (ARNOLD et al., 2003).

A metodologia comumente utilizada para a detecção e quantificação dos fungos endofíticos ocorre por meio do isolamento de superfícies desinfetadas de tecidos das plantas hospedeiras (STONE et al., 2000). Os fungos endofíticos pertencem principalmente ao filo *Ascomycota*, incluindo várias espécies de *Sordariomycetes* e *Dothideomycetes*. Os gêneros comumente encontrados incluem: *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Phomopsis*, *Pestalotia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Alternaria*, *Nodulisporium* e *Daldinia* (RODRIGUES & SAMUELS, 1999; SURYANARAYANAN et al., 2002; SCHULZ & BOYLE, 2005; ARNOLD, 2008).

Acredita-se que a elevada riqueza de fungos endofíticos associados a folhas e caules de angiospermas seja devido à ampla diversidade de suas plantas hospedeiras (SAIKKONEN et al., 1998). Em estudo realizado por Souza et al. (2004) a partir de duas plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* (*Rubiaceae*) e *Strychnos cogens* (*Loganiaceae*), foi possível obter 571 isolados de fungos endofíticos associados a folhas e caules dessas plantas. Entre os isolados fúngicos de *P. longiflora* foram identificados *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp. Dos isolados de *S. cogens* foram identificados os fungos: *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. Apesar dos gêneros *Guignardia*, *Colletotrichum*, *Phomopsis* e *Glomerella* serem considerados fitopatógenos, estes isolados foram obtidos a partir de plantas saudáveis sem qualquer doença aparente.

Ao avaliar a diversidade de endofíticos de *Theobroma cacao* (cacau), Maki (2006) isolou 26 espécies, distribuídas em 18 gêneros identificados em:

Aschersonia, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Crinipellis*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomerella*, *Lasiodiplodia*, *Myrothecium*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Podospora*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis* e *Verticillium*. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Rubini et al. (2005) que isolaram de cacau praticamente os mesmo gêneros, com exceção de *Aschersonia*, *Crinipellis*, *Glomerella*, *Myrothecium* e *Podospora*.

Verma et al. (2007) coletaram folhas, cascas e tronco de *Azadirachta indica* na Índia. Os autores obtiveram, a partir 200 fragmentos, um total de 233 isolados pertencentes a 18 táxons. Do total obtido, 62,2% foram *Hyphomycetes*, 27,4% *Coelomycetes* e 7,7% micélio estéril. Os gêneros de fungos encontrados em maior frequência foram: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Phomopsis* e *Trichoderma*. A frequência de colonização endofítica foi maior nas folhas quando comparada com as cascas: 45,5% e 31,5%, respectivamente. Vieira (2008) isolou a partir de folhas e caules de indivíduos sadios de *Solanum cerunum* (*Solanaceae*), 244 isolados de fungos filamentosos, os quais foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Oudemansiella*, *Phanerochaete*, *Bipolaris*, *Mucor*, *Diatrypella*, *Colletotrichum*, *Petriella*, *Glomerella*, *Phlebiopsis*, *Dendrophora*, *Arthrobotrys*, *Coprinus*, *Fusarium*, *Botryosphaeria*, *Petriella*, *Eutypella*, *Microdochium*, *Curvularia* e *Phoma*.

Com o objetivo de verificar a diversidade de fungos endofíticos associados a *Eremanthus erythropappus* (candeia), Magalhães et al. (2008) obtiveram 159 isolados provenientes de diferentes partes vegetais, sendo nove isolados a partir de sementes, 35 de folhas e 115 de caule. Estes isolados foram agrupados em 41 morfoespécies, sendo identificados em: *Phomopsis* (38,9%) e *Xylaria* (37,1%); *Dothiorella* (8,8%), *Nigrospora* (8,0%) e *Fusarium* (0,9%); *Cladosporium* (4,4%); *Alternaria* (0,9%) e *Aspergillus* (0,9%). Os autores concluíram que a maior taxa de colonização foi obtida a partir de caule, seguido de folha e semente.

Um total de 973 isolados de fungos endofíticos foram obtidos a partir de 1.144 fragmentos de tecidos vegetais de seis espécies de plantas medicinais coletadas no Jardim Botânico de Pequim, por JianQiu et al. (2008). As plantas selecionadas foram: *Eucommia ulmoides* (*Eucommiaceae*), *Forsythia suspense*, *F. giraldiana*, *F. ovata* (*Oleaceae*), *Berberis poiretii* (*Berberidaceae*) e *Rhus potanini* (*Anacardiaceae*). Dentre os isolados fúngicos, 147 foram obtidos a partir de *B. poiretii*, 307 de *E. ulmoides*, 112 de *F. giraldiana*, 98 de *F. ovata*, 149 de *F. suspense*, e 160 de *R.*

potanini. Destes, *Alternaria alternata* foi a espécie dominante nas seis plantas, sendo *Microsphaeropsis conielloides* também dominante em *E. ulmoides*.

Em um estudo de diversidade de fungos endofíticos foliares de *Broussonetia papyrifera*, *Celtis occidentalis* e *Ligustrum lucidum*, na Argentina, foram obtidos 64 isolados de fungos endofíticos (NOVAS & CARMARÁN, 2008). Estes autores descreveram a espécie nova: *Haplotrichum minutissimum*, isolada de folhas de *C. occidentalis*. Dentre os isolados identificados *Xylaria* e *Alternaria* foram os mais abundantes, sendo que os gêneros *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Phoma* e *Phomopsis*, também foram identificados.

Indivíduos de *Phoradendron perrottettii* e seu hospedeiro *Tapirira guianensis* foram coletados no sul de Minas Gerais com o objetivo de verificar e comparar a comunidade de fungos endofíticos associados com as folhas e caules dessas plantas. Um total de 1.615 fungos endofíticos foi isolado de ambas as plantas e foram identificados como pertencentes aos táxons: *Phomopsis* sp., *Stagonospora* sp., *Pseudocercospora* sp., *Paraconiothyrium brasiliense*, *P. sporulosum*, *Cladosporium* spp., *Lecanicillium psalliotae*, *Verticillium leptobactrum*, *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* cf. *avenaceum*, *Cytospora* sp., *Microsphaeropsis* sp., *Penicillium* sp., *Aposphaeria* sp. (ABREU et al., 2010).

Gazis & Chaverri (2010) isolaram fungos endofíticos de folhas e caules de *Hevea brasiliensis* coletadas em três pontos distintos localizados no “Centro de Pesquisa Picaflor”, sudeste do Peru. Obtiveram-se 175 isolados dos quais 96,6% pertenciam ao filo *Ascomycota*, poucos isolados pertencentes ao filo *Basidiomycota* e *Zygomycota* com 1,1% e 2,3%, respectivamente. Dentro de *Ascomycota*, três gêneros foram comuns nos locais amostrados: *Pestalotiopsis* (23% do total), *Trichoderma* (22% do total) e *Penicillium* (18% do total). Outros gêneros identificados foram raramente isolados, entre 1% e 3% de frequência: *Alternaria*, *Annulohyphoxylon*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Colletotrichum*, *Endomelanconiopsis*, *Entonaema*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Leptosphaerulina*, *Khuskia* e *Umbelopsis*. Estes e outros estudos mostram a alta diversidade de fungos endofíticos presentes em plantas de florestas tropicais e reforçam a necessidade e importância de novas pesquisas nestes ambientes.

2.3 Interações entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras

Apesar da natureza assintomática da ocupação fúngica no tecido vegetal induzir à classificação de um relacionamento simbiótico ou mutualístico, a diversidade de fungos endofíticos sugere que estes possam ser sapróbios ou patógenos oportunistas (STROBEL & DAISY, 2003). De fato, alguns fitopatógenos têm origem endofítica, pois são microrganismos oportunistas ou quiescentes que podem causar infecções sintomáticas na planta quando esta se encontra em condições de estresse ou idade avançada (TAN & ZOU, 2001; FIRÁKOVÁ et al., 2007). Alguns fungos podem ser oportunistas acidentais, os quais são normalmente encontrados em outros substratos e não são especificamente adaptados aos seus hospedeiros, tais como algumas espécies de fungos coprófilos detectadas nos tecidos vegetais (SCHULZ & BOYLE, 2005).

Comensalismo e mutualismo requerem um sofisticado balanço entre as respostas de defesa da planta e a demanda de nutrientes pelo endofítico. Desse modo, a interação mutualística não significa ausência de defesa da planta (KOGEL, 2006). É esperado que este grupo de fungos altamente diverso desempenhe impactos sobre as comunidades vegetais, seja conferindo tolerância ao estresse biótico e abiótico, aumentando a biomassa e diminuindo o consumo de água (RODRIGUEZ et al., 2009), redução na herbivoria e ataque de insetos (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996) e resistência contra patógenos.

A proteção contra herbivoria ocorre por meio de metabólitos secundários bioativos produzidos pelos fungos, como a peramina e lolina (atividade inseticida), e lolitrem B e ergovalina (atividade citotóxica) (ALEXOPOULOS et al., 1996; SCHULZ & BOYLE, 2005). Os fungos beneficiam-se pela nutrição e proteção conferidos pelos hospedeiros (TAN & ZOU, 2001). Embora existam poucos trabalhos experimentais com o objetivo de estudar o papel dos metabólitos secundários na interação endofítico/hospedeiro, o conhecimento desses mecanismos fisiológicos constitui um pré-requisito para o entendimento de como o fungo endofítico é capaz de crescer dentro da planta hospedeira sem causar sinais visíveis de doença (SCHULZ et al., 1999).

A distinção entre endofíticos, epifíticos (aqueles que vivem na superfície de plantas) e fitopatógenos (que causam doenças em plantas) é tida como didática (AZEVEDO et al., 2000), porém, a relação dos fungos endofíticos com a planta

hospedeira é bem mais complexa, envolvendo interações entre as espécies e também a influência de fatores bióticos e abióticos. Um fungo endofítico pode tornar-se um patógeno conforme as condições do ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um microrganismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por um determinado período, causando ou não danos à mesma. Sendo assim, interações mutualísticas entre fungos invasores e a planta hospedeira são classificadas como um balanço, sobre controle ambiental, fisiológico e genético, que resulta nos benefícios de adaptabilidade para ambos os parceiros (SAIKKONEN et al., 1998; AZEVEDO, 1999).

Schulz & Boyle (2005) propuseram que a colonização assintomática resulta de uma relação antagônica balanceada, em que ocorre um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta (Figura 1). Sendo assim, a variabilidade da interação depende não só da adaptação do fungo endofítico a um hospedeiro ou órgão em particular e dos estágios de desenvolvimento dos parceiros, mas também da virulência inata do endofítico, da resposta de defesa do hospedeiro e das condições ambientais.

Os fungos endofíticos são de grande importância biotecnológica, uma vez que, novos fármacos, agroquímicos e agentes de controle biológico, entre outros, poderiam ser obtidas por meio de uma maior exploração destes microrganismos (GANGADEVI & MUTHUMARY, 2009). Estes metabólitos secundários são importantes nas interações entre o endofítico e a planta hospedeira, pois podem atuar em processos de sinalização, defesa e regulação da simbiose (SCHULZ & BOYLE, 2005). De acordo com Guo et al. (2008), os fungos endofíticos têm capacidade de sintetizar metabólitos bioativos, os quais podem ser usados pelas plantas para defesa contra patógenos. Alguns destes metabólitos têm sido úteis para o desenvolvimento de novas drogas, dentre estes se destacam os alcalóides, terpenóides, flavonóides e esteróides. Estes compostos podem apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória e antitumoral; e também atuar no controle biológico de agentes fitopatógenos, dentre outras aplicações; o que abre novas perspectivas para o tratamento de inúmeras doenças (STROBEL & DAISY, 2003).

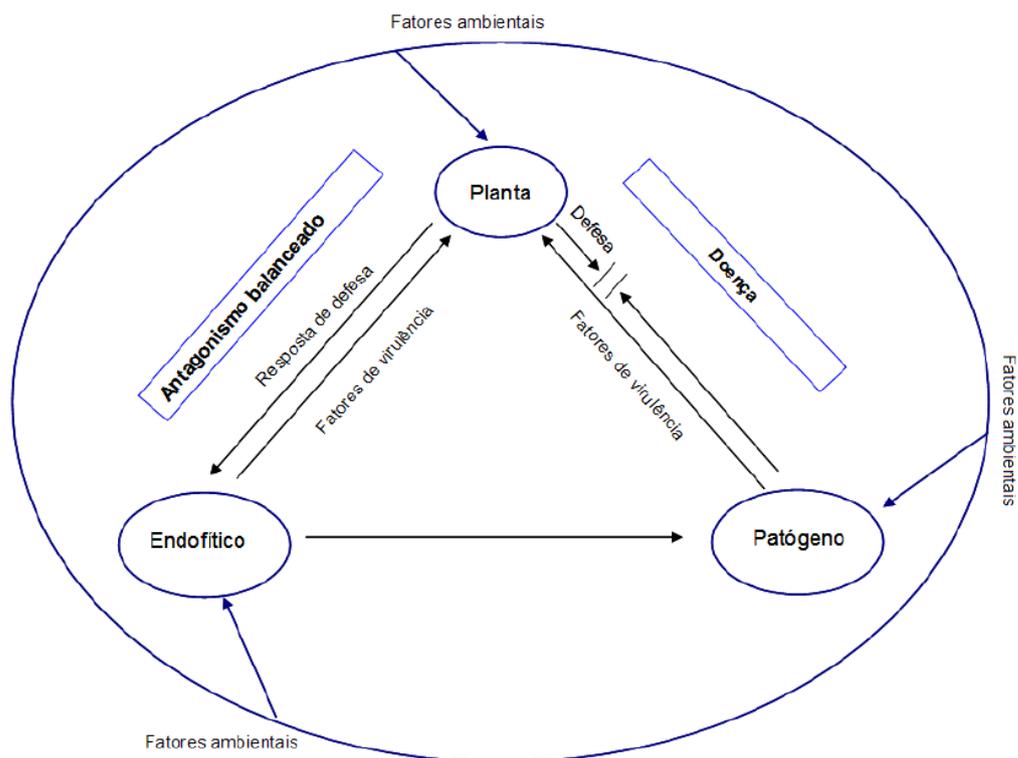


Figura 1: Hipótese sobre o antagonismo balanceado entre a planta hospedeira e microrganismo endofítico (Fonte: SCHULZ & BOYLE, 2005).

2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos

A humanidade sempre esteve ligada à natureza com o objetivo de suprir suas necessidades como a busca por alimentos, abrigo, meios de transporte, fertilizantes, aromatizantes e também produtos com atividade medicinal (GUIMARÃES, 2006). Os produtos naturais têm sido utilizados diretamente como drogas ou tem fornecido a base química para seu desenvolvimento (SURYNARAYANAN et al., 2009). Aproximadamente 52% dos novos produtos químicos introduzidos no mercado mundial entre 1981 e 2002 são produtos naturais ou seus derivados (CHIN et al., 2006).

Segundo Bérdy (2005), produtos naturais são definidos usualmente como substâncias químicas isoladas de diversos seres vivos, sendo oriundos do metabolismo primário e/ou secundário. Os metabólitos secundários, alvo da pesquisa atual, são substâncias de baixo peso molecular ($MW < 3000$) que a princípio

são “dispensáveis” para a sobrevivência e desenvolvimento do microrganismo. São extremamente diversos quimicamente e continuamente modificados e adaptados às contínuas mudanças por pressão seletiva ambiental (BÉRDY, 2005; DEMAINE, 1981). Entre os metabólitos secundários incluem os antibióticos, toxinas, alcalóides, fatores de crescimento para a planta e o interesse por estes compostos é considerável, pois muitos possuem importância médica, industrial e /ou agrícola (CALVO et al., 2002).

Por milhares de anos, os produtos naturais têm desempenhado um importante papel em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas (CHIN et al., 2006). Os metabólitos secundários microbianos exibem uma alta diversidade e versatilidade de efeitos biológicos, destacando-se a atividade antimicrobiana. Na literatura científica existem centenas de relatos de diferentes patógenos como organismos testes em triagens de atividade antimicrobiana, sendo os mais frequentes: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus (Sarcina) lutea*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (BÉRDY, 2005).

De acordo com Chin et al. (2006) a importância dos produtos naturais pode ser avaliada por três critérios:

- 1) a proporção de introdução de novas substâncias químicas de ampla diversidade estrutural, que podem servir como modelo para modificações semi-sintéticas e totalmente sintéticas;
- 2) o número de doenças tratadas ou prevenidas por estas substâncias,
- 3) sua frequência de uso no tratamento de doenças.

Além das plantas, microrganismos constituem uma das principais fontes de produtos naturais com propriedades bioativas desejáveis (SURYNARAYANAN et al., 2009), porém uma das menos estudadas e que sem dúvida oferece grandes possibilidades para obtenção de novas estruturas e atividades biológicas (BRIZUELA et al., 1998). Dentre os microrganismos, os fungos estão entre os mais importantes grupos de organismos eucariotos que estão sendo explorados pela procura de metabólitos com aplicações clínicas (BRIZUELA et al., 1998; SURYNARAYANAN et al., 2009). O número total de produtos fúngicos bioativos é de aproximadamente 8600, representando 38% de todos os produtos microbianos (BÉRDY, 2005).

Com a descoberta da penicilina a partir do fungo *Penicillium notatum* por Fleming, cientistas se engajaram na descoberta e aplicação de metabólitos microbianos com atividade contra patógenos humanos e vegetais (STROBEL et al., 2004), uma vez que dentre os 20 medicamentos mais comumente descritos seis são de origem fúngica (SCHULZ et al., 2002). Dentre outras substâncias isoladas dos microrganismos que renderam algumas das drogas mais importantes utilizadas na clínica se destacam as cefalosporinas, aminoglicosídeos, tetraciclina, ciclosporina, FK506 e rapamicina; agentes que diminuem o colesterol, como mevastatina e lovastatina; drogas antiparasitárias e anti-helmínticas, tais como a ivermectina (CRAGG et al., 2005).

A capacidade de produção de metabólitos secundários dentre os fungos é frequentemente descrita por ascomicetos, basidiomicetos e espécies de fungos endofíticos (BÉRDY, 2005). As pesquisas com fungos endofíticos na busca de moléculas protótipos aumentaram consideravelmente após a descoberta do diterpeno paclitaxel, um dos agentes anticâncer, mais utilizados na clínica atualmente. O taxol foi inicialmente isolado do vegetal *Taxus brevifolia*, e posteriormente do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, obtido a partir deste vegetal (STIERLE et al., 1995). Portanto, é inquestionável o interesse em todos os fungos, principalmente os endofíticos, como possíveis fontes de novos compostos bioativos (BÉRDY, 2005).

Segundo Schulz & Boyle (2005), os metabólitos são de grande importância nas interações entre o endofítico e a planta hospedeira. Fungos endofíticos estão em constante interação com a planta hospedeira e são tidos como excelentes fontes de produtos naturais bioativos, uma vez que podem ocupar nichos biológicos únicos e crescem em diversos ecossistemas (SCHULZ et al., 2002). Estes metabólitos, uma vez isolados e caracterizados, podem também ter potencial para uso na medicina moderna, agricultura e indústria. A descoberta de antibióticos, antimicóticos, imunossupressores e compostos antitumorais são alguns exemplos de substâncias que têm sido isoladas a partir de fungos endofíticos (STROBEL et al., 2004).

Produtos naturais de fungos endofíticos têm sido descritos como capazes de inibir ou matar uma ampla variedade de microrganismos patogênicos que afetam humanos e animais, como bactérias, fungos, vírus e protozoários (STROBEL et al., 2004). Estes autores mostraram a atividade antiviral de metabólitos isolados a partir

do fungo endofítico *Cytonaema* sp. Os ácidos citônicos A e B inibiam as proteases do citomegalovírus humano (Hcmv). Strobel e colaboradores (2004) observaram ainda atividade inseticida produzida pelos endófitos *Nodulisporium* sp. isolado da planta *Bontia daphnoides*, e *Muscodor vitigenus* isolado da *Paullina paullinioides*.

Wiyakrutta et al. (2004) obtiveram 582 isolados de fungos a partir de 81 espécies de plantas medicinais. Destes, 360 fungos distintos morfologicamente foram selecionados para testes de atividade biológica. Extratos de 92 isolados inibiram *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto extratos de seis isolados inibiram *Plasmodium falciparum*. Neste mesmo trabalho, os autores observaram forte atividade antiviral contra Herpes simples 1 (HSV1) por 40 isolados fúngicos, além de atividade contra linhagens de células cancerígenas.

Guimarães et al. (2008) isolaram 39 fungos endofíticos de *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*. Os extratos de todos os isolados foram avaliados quanto às atividades antimicrobianas (contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*), antiparasitárias (contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania tarentolae*) e antitumorais (contra células de leucemia). Todos os extratos mostraram atividade em pelo menos um microrganismo, sendo 79,5% com atividade citotóxica contra células de leucemia, 5,1% dos extratos foram ativos contra *S. aureus*, 25,6% contra *E.coli* e 64,1% contra *C. albicans*. Somente um extrato mostrou resultado promissor na inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) de *T. cruzi* e três inibiram atividade da enzima adenina-fosforribosil-transferase (APRT) de *L. tarentolae*. Em relação a atividade antitumoral, o extrato produzido por um dos isolados identificados foi ativo contra células de leucemia e melanoma.

Rosa et al. (2010) isolaram 121 fungos endofíticos a partir de folhas das plantas bioativas *Ageratum myriadenia* (Asteraceae), *Palicourea tetraphylla* (Rubiaceae), *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae) e *Trixis vauthieri* (Asteraceae). A partir destes fungos foram produzidos extratos brutos e estes testados em painéis de bioensaio usando *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, a enzima tripanotiona redutase (TryR) de *T. cruzi* e três linhagens de células tumorais humanas. Dos extratos testados, 27,2% apresentaram pelo menos uma atividade biológica, sendo que 14% foram citotóxicos contra uma ou mais linhagens de células tumorais com valores de IC₅₀ variando de >0,2 a 25µg/mL, 19,8% inibiram a atividade de TryR e três mostraram-se capazes de inibir o crescimento de *T. cruzi* acima de 60% e seus valores de IC₅₀ variando de 1 a 10 µg/mL e 9% foram capazes

de inibir o crescimento de *L. amazonensis* e apresentaram valores de IC₅₀ variando entre 4.6 a 24.4 µg/mL. Os isolados de fungos endofíticos ativos foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Alternaria*, *Arthrinium*, *Cochliobolus*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Gibberella*.

Em um estudo conduzido por Li et al. (2010), 214 fungos endofíticos foram isolados a partir de 500 segmentos de folhas e caules de plantas aquáticas: *Ottelia acuminata*, *Myriophyllum verticillatum*, *Equisetum arvense*, *Cardamine multijuga*, e *Impatiens chinensis*. Os isolados foram identificados como pertencentes a 31 táxons, dos quais *Cladosporium*, *Fusarium* e *Geotrichum* foram os gêneros prevalentes. Dentre todos os isolados, 169 (79%) foram fungos anamorfos, 1 (0,5%) ascomiceto teleomorfo e 44 (21%) micélio estéril. A atividade antifúngica dos isolados foi testada frente a *Fusarium solani* e *Phytophthora nicotianae* sendo que 28 (13,1%) dos isolados foram ativos com mais de 30% de inibição do crescimento dos dois fitopatógenos.

Os fungos endofíticos podem produzir alguns metabólitos originalmente característicos de seus hospedeiros, e este fato pode estar relacionado a uma recombinação genética ocorrida entre o endófito e a planta ao longo de anos de evolução. Segundo Strobel (2003), muitas espécies de endofíticos são frequentemente obtidas de uma planta hospedeira, e somente alguns isolados são capazes de produzir altos índices de moléculas com atividade biológica. A ação antimicrobiana de algumas plantas medicinais poderia estar relacionada à sua comunidade endofítica, sendo que o metabólito antimicrobiano poderia ser produzido pelo microrganismo e não propriamente pelo vegetal, ou provavelmente pela interação microrganismo-hospedeiro (GOMES, 2008). Isto se deve ao fato de que o fungo endofítico se encontra junto da planta hospedeira por longos períodos de tempo, portanto tem o mesmo ou similar composto bioativo como seu hospedeiro (ZHOU et al., 2010).

Identificar microrganismos endofíticos produtores da mesma substância bioativa produzida pelos vegetais eliminaria as etapas de plantio, colheita e extração de plantas raras ou de crescimento lento. Além disso, o preço do produto seria reduzido, uma vez que poderia ser produzido por meio de processos fermentativos (STROBEL, 2002). Espécies de *Taxus*, por exemplo, além de ameaçadas de extinção, crescem muito devagar. Métodos tradicionais de extração do taxol (ou paclitaxel) a partir de suas cascas 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 (ZHOU et al., 2010), portanto utilizar o fungo endofítico como produtor da substância em questão é mais viável economicamente e prático.

Strobel & Daisy (2003) relatam que é grande a necessidade por novos antibióticos, agentes quimioterápicos, e agroquímicos que sejam altamente eficientes, possuam baixa toxicidade e tenham um menor impacto ambiental. Esta busca é direcionada pelo desenvolvimento de resistência em infecções causadas por microrganismos, por doenças como AIDS, e outros fatores que enfraquecem o sistema imune, como câncer e transplantes de órgãos. De acordo com Strobel et al. (2004), ao selecionar as plantas para realizar o isolamento e identificação dos microrganismos endofíticos, é necessário observar os seguintes critérios:

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. Estas plantas vêm sendo escolhidas a partir de relatos da literatura e por meio do contato direto estabelecido com a população que as utiliza;

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.

Dentre as moléculas bioativas produzidas a partir de fungos endofíticos destacam-se:

Ácido ambuico (Figura 2a), uma ciclohexanona produzida por *Pestalotiopsis microspora* apresenta atividade antifúngica e tem sido utilizada como modelo no desenvolvimento de novos métodos de Ressonância Magnética Nuclear para determinação estrutural de substâncias orgânicas (STROBEL & DAISY, 2003).

Criptocandina (Figura 2b): lipopeptídeo isolado de *Cryptosporiopsis quercina* associado à planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*, (*Celastraceae*). Este metabólito mostrou excelente atividade antifúngica contra alguns importantes patógenos humanos como *C. albicans* e *Trichophyton* spp. (STROBEL & DAISY, 2003).

Criptocandina é também ativo contra os fungos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (STROBEL et al., 2004).

Taxol (Figura 2c): ou diterpeno paclitaxel, utilizado no controle de câncer, inicialmente encontrado em pequenas quantidades na casca da árvore da espécie *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*) (TAN & ZOU, 2001).

Pestalosídeo (Figura 2d): beta-glicosídeo aromático produzido por *P. microspora* isolado de *Torreya taxifolia* (*Cephalotaxaceae*), que possui atividade antifúngica (STROBEL et al., 2004).

Substâncias L-783,281 (Figura 2e): quinonas obtidas do fungo *Pseudomassaria* sp. obtido de uma planta coletada na floresta tropical africana, possuem capacidade de mimetizar a ação da insulina (ZHANG et al., 1999).

Pestacina e Isopestacina (Figuras 2f e 2g): obtidos de *P. microspora* isolado da planta *Terminalia morobensis*, família Combretaceae, ambos exibem atividade antimicrobiana e antioxidante (STROBEL & DAISY, 2003).

Considerando-se a ocorrência de quase 300 mil espécies de plantas na terra e que cada uma pode ser hospedeira de um ou mais endofíticos (STROBEL & DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004), a probabilidade de se encontrar novos microrganismos capazes de produzir substâncias bioativas com atividade biológica é alta. Portanto, fica evidente a importância da realização de estudos de diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas bioativas.

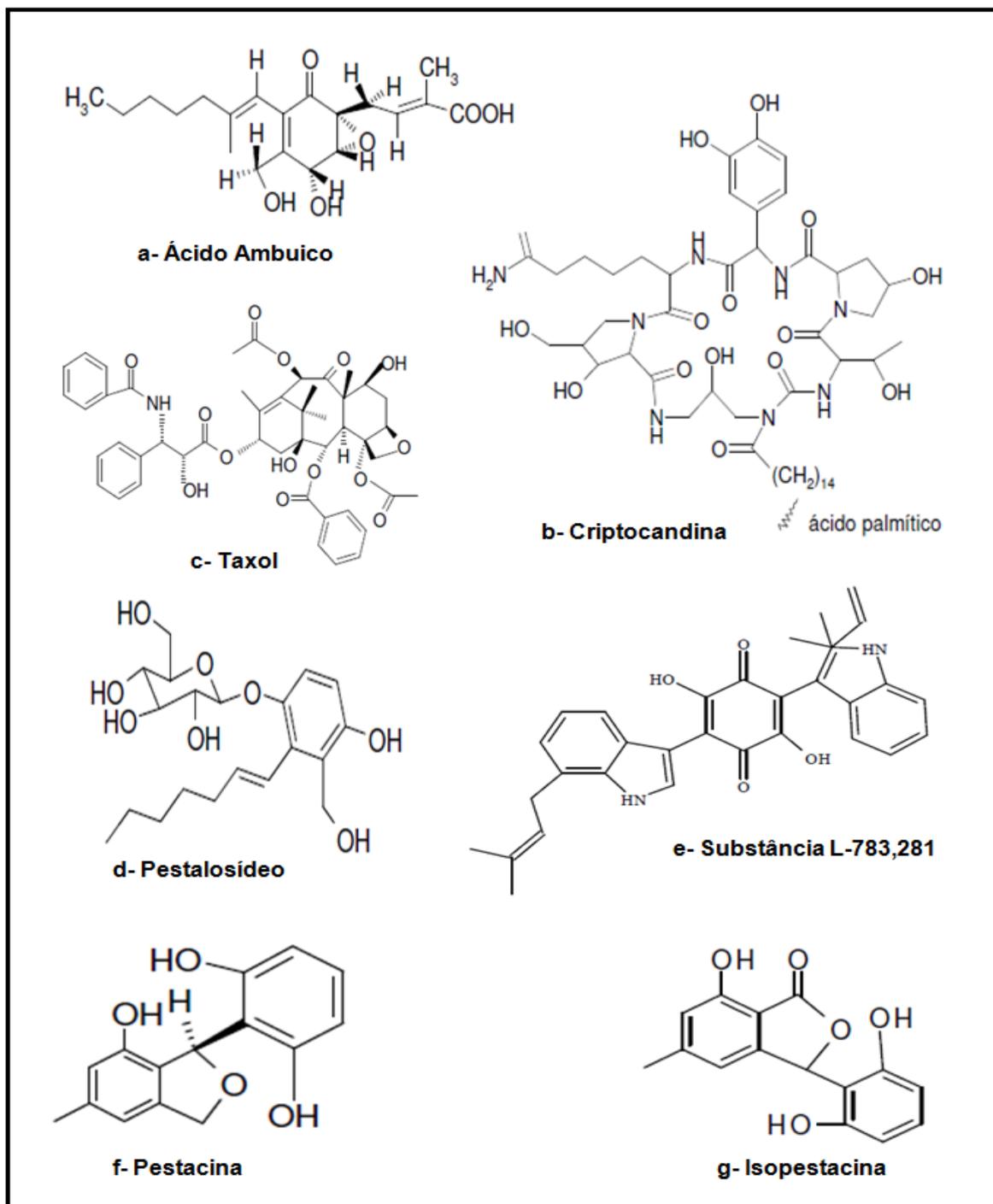


Figura 2: Moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos.

2.5 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*)

Espécies do gênero *Stryphnodendron* são amplamente utilizadas no Brasil como cicatrizante e a eficácia de preparações com a planta já foram confirmadas por diferentes estudos (GODOY et al., 2002). Em particular, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville uma leguminosa medicinal conhecida popularmente como

barbatimão, barba-de-timam, casca da mocidade, casca da virgindade (SOARES et al., 2008), uabatimó, ybá timo (BRANDÃO & ZANETTI, 2008), tem sido utilizada na medicina popular devido amplo espectro de ação biológica. Em levantamento etnobotânico realizado por Souza & Felfili (2006), nas comunidades do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros e na cidade de Alto Paraíso (GO), na lista das 10 plantas medicinais mais utilizadas, *S. adstringens* foi indicada por todos os entrevistados. Estes a utilizavam principalmente como anti-séptico, adstringente e antiinflamatório.

S. adstringens (Figura 3a), é uma angiosperma, pertencente à família *Fabaceae* (*Leguminosae*), sub-família *Mimosoideae*. É uma árvore decídua, de copa bem alongada, de 4-5 m de altura, com tronco cascudo (Figura 3b) e tortuoso, de 20-30 cm de altura. Possui folhas compostas bipinadas com 5-8 jugas; folíolos ovalados, em número de 6-8 pares por pina (juga) (Figura 3c). Flores pequenas, amareladas, dispostas em racenos axilares. Os frutos são vagens cilíndricas, indeiscentes, de 6-9 cm de comprimento, com muitas sementes de cor parda (LORENZI & MATOS, 2002). É encontrado com frequência em fitofisionomias de cerrado típico (*stricto sensu*), campo-sujo e cerradão (SOUZA & FELFILI, 2006).

O barbatimão tem distribuição geográfica ampla, ocorrendo desde o Pará, passando pelo planalto central, até Minas Gerais e São Paulo. É descrita como uma espécie perenifólia, com pico de floração e desenvolvimento de folhas novas no início do período chuvoso (outubro a abril). A floração coincide com o período seco (maio a setembro). A maturação dos frutos ocorre no final da estação seca (agosto/setembro), aumentando a probabilidade de germinação e crescimento de plântulas devido ao início da estação chuvosa (FELFILI & BORGES FILHO, 2004).

Esta planta tem sido utilizada, popularmente, devido sua ação cicatrizante, antiinflamatória, hemostática, anti-edematogênica, anti-séptica, antidiarréica. É também utilizada no tratamento de úlceras, hemorragias vaginais e gonorréia. Na medicina popular, a casca do barbatimão é a parte da planta mais utilizada (SOARES et al.; 2008). O decocto é indicado contra leucorréia, hemorragias, diarreia, hemorróidas, para limpeza de ferimentos e na forma de gotas contra conjuntivite. O chá da casca é indicado em uso externo para hemorragias uterinas, corrimento vaginal, feridas ulcerosas e para pele excessivamente oleosa. Para inflamação da garganta, diarreia, corrimento vaginal e hemorragias recomendam-se a administração oral do seu extrato alcoólico (LORENZI & MATOS, 2002).

Ao avaliar a atividade biológica do extrato da casca de *S. adstringens*, Alves et al. (2000), puderam observar a atividade frente bactérias como *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Herzog-Soares et al. (2002) verificaram a ação tripanocida *in vivo* do extrato bruto etanólico das cascas de barbatimão ao observar uma significativa interferência sobre a curva de parasitemia do *T. cruzi*, reduzindo o número de parasitas no sangue. Por meio do método de difusão em disco, Orlando (2005), observou a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do barbatimão frente aos seguintes microrganismos: *Enterococcus faecalis*, *Kocuria rhizophila*, *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. krusei* e *Klebsiella pneumoniae*.

Em uma triagem realizada com 19 plantas utilizadas tradicionalmente na medicina brasileira, o extrato hidroalcoólico das cascas de barbatimão exibiu inibição no crescimento das formas promastigota e amastigota de *Leishmania (leishmania) amazonense* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. As porcentagens foram relativamente baixas quando comparadas com os outros extratos testados, de: 36,5, 21 e 51,9%, respectivamente (LUIZE et al., 2005).

Ishida (2006) avaliou o efeito dos extratos bruto, frações e subfrações de cascas de barbatimão sobre leveduras do gênero *Candida* isoladas de fluido vaginal. Os isolados clínicos foram submetidos ao teste de susceptibilidade *in vitro* das frações (F1, F2 e F3) por meio da determinação da concentração inibitória mínima. A fração F2 foi capaz de inibir o crescimento leveduriforme entre as concentrações de 0,97 a 7,8 µg/mL, sendo, portanto purificada, e desta os autores obtiveram 4 subfrações: F2.1, F2.2, F2.3 e F2.4. As subfrações F2.2, F2.3 e F2.4 apresentaram boa atividade, sendo a F2.4 a mais ativa. A atividade fungicida foi avaliada, e em todas as frações e subfrações testadas, a concentração fungicida mínima (CFM) foi alta, mas apresentando apenas, atividade fungistática.

Soares et al. (2008) observaram a atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico das cascas do barbatimão frente às seguintes bactérias: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus casei*. De Paula et al. (2010) mostraram que o extrato da casca de *S. barbatiman* inibiu em pelo menos 100% duas das três principais atividades, hemolítica, proteolítica e hemorrágica; do veneno da cobra *Lachesis muta* (surucucu).

Como constituintes químicos, *S. adstringens* possui alcalóides, flavonóides, terpenos, estilbenos, esteróides, inibidores de proteases e tanino (SOARES et al., 2008). Em estudo sobre a prospecção fitoquímica das folhas de barbatimão, Oliveira & Figueiredo (2007) encontraram resultados positivos para taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas. Altas concentrações destes metabólitos conferem a planta um grande potencial farmacológico, pois muitas das suas propriedades medicinais são frequentemente atribuídas a estes metabólitos (OLIVEIRA & FIGUEIREDO, 2007). Entretanto, os taninos são os componentes encontrados em maioria no barbatimão (SOARES et al., 2008).



a- Árvore de *Stryphnodendron adstringens*



b- Folha composta



c- Tronco cascudo

Figura 3: Árvore, folha e tronco de *Stryphnodendron adstringens*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade de fungos endofíticos associados a *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e avaliar o potencial destes microrganismos como fonte de metabólitos antifúngicos, citotóxicos e antiparasitários.

3.2 Objetivos específicos

1. Coletar, isolar e cultivar fungos endofíticos associados a folhas e cascas de *S. adstringens*;
2. Depositar todos os isolados obtidos em uma coleção de culturas credenciadas para preservação *ex situ*;
3. Identificar os fungos obtidos utilizando características morfológicas e moleculares.
4. Determinar a diversidade das espécies de fungos endofíticos associados com folhas e cascas da planta;
5. Preparar extratos orgânicos a partir das culturas fúngicas e de suas plantas hospedeiras;
6. Verificar a atividade biológica dos extratos fúngicos e vegetais obtidos contra:
 - a. Leveduras de interesse clínico
 - b. Células tumorais humanas preditivas da atividade anticâncer
 - c. Formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de Coleta

Neste trabalho realizaram-se duas coletas: a primeira em 09/julho/2009, próximo ao Parque Nacional da Serra do Cipó (Jaboticatubas) (19°-30'-S; 43°-54'-W), e a segunda em 20/novembro/2009, na Serra de São José (Prados) (21°-05'-S; 44°-12'-W); ambos localizados no estado de Minas Gerais (Figura 4). Para o acesso a estas áreas utilizaram-se licenças de coletas oficializadas (Licença 098/07-099-068/07-069/07) respeitando-se as legislações Estaduais (Instituto Estadual de Florestas/IEF-MG) e de acesso ao patrimônio genético, estabelecidas pelo CGEN do Ministério do Meio Ambiente (LICENÇA 026174-2). Todos os espécimes vegetais hospedeiros dos fungos foram identificados a partir de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, e por meio de comparações com exsicatas previamente depositadas no Herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais.

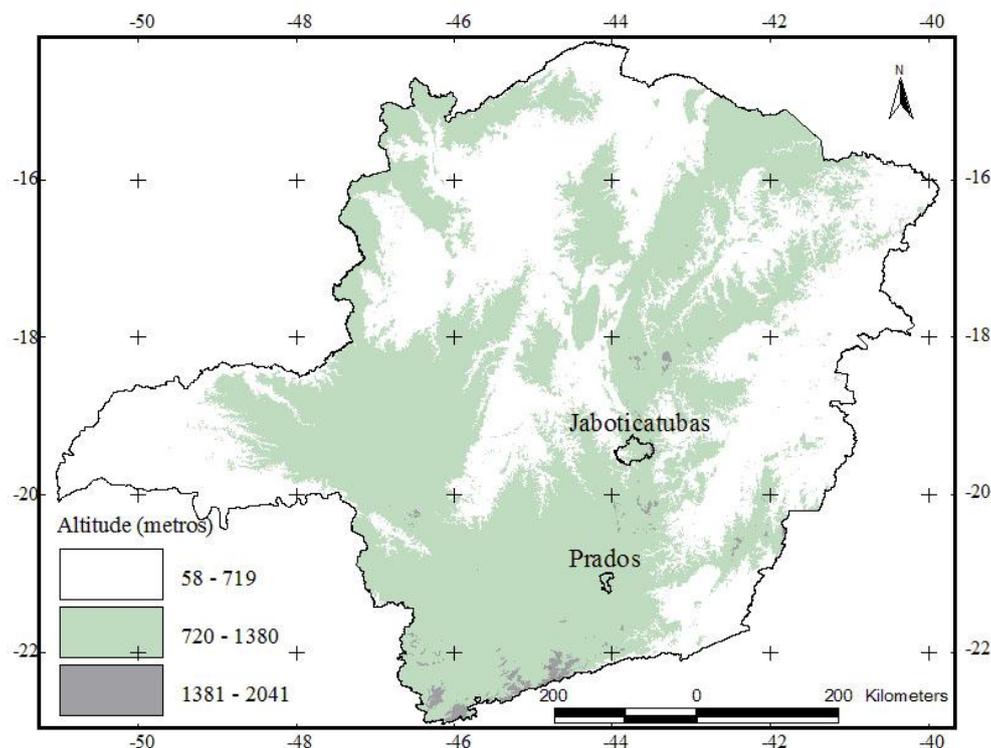


Figura 4: Localização dos municípios onde foram realizadas as coletas dos indivíduos de *Stryphnodendron adstringens* em Minas Gerais.

A Serra do Cipó localiza-se a 90 Km nordeste de Belo Horizonte, na região sul da Cordilheira do Espinhaço, entre os paralelos 19 e 20°S e 43 e 44°W, no divisor de águas das bacias hidrográficas dos rios São Francisco e Doce. Possui clima do tipo tropical de altitude, com verões chuvosos e invernos secos, com média pluviométrica anual de 1.300mm, temperatura média anual de 21°C e altitudes variando de 800 a 1.700 m (MARQUES et al., 2000; <http://www.serradocipo.com/>).

A Serra de São José situa-se no centro-sul de Minas Gerais, 21°S e 44°W, percorrendo os municípios de São João del Rei, Tiradentes, Coronel Xavier e Prados (OLIVEIRA-FILHO & MACHADO, 1993). Trata-se de uma pequena cadeia de montanhas de quartzito a qual compõe o sistema da Serra da Mantiqueira. O clima local é caracterizado por verão chuvoso e inverno árido (ALVES & KOLBEK, 2009). A vegetação é bastante diversificada, sendo possível encontrar regiões de Floresta Estacional Semidecidual, florestas mistas com presença de Araucária e Cerrados (Cerrado Stricto Sensu, Campo cerrado, Cerradão e campos rupestres) (SILVA et al., 2004).

4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Folhas e cascas de 15 indivíduos aparentemente sadios de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foram coletadas, os quais tiveram a localização determinada por coordenadas geográficas obtidas pelo *Global Positioning System* (GPS). Uma caracterização visual dos exemplares de *S. adstringens* foi feita no momento da coleta. Aparentemente, as plantas coletadas nos entornos da Serra do Cipó se caracterizavam por plantas mais jovens, uma vez que estas possuíam menor porte, copa menos alongada e tronco mais fino, sendo arbitrariamente, classificadas como indivíduos jovens. Já as plantas coletadas na Serra de São José se apresentavam em plantas de maior porte, com copa alongada e tronco com maior diâmetro, sendo arbitrariamente, classificadas como indivíduos adultos, no presente trabalho. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas no mesmo dia. Três folhas e três cascas de cada indivíduo foram coletadas. Cinco fragmentos de cada folha e de cada casca foram incubados para isolamento dos fungos endofíticos.

Inicialmente ao processo de desinfestação, as folhas e cascas coletadas foram limpas superficialmente com detergente neutro e enxaguadas

abundantemente com água corrente. Em seguida, com auxílio de tesoura e pinça esterilizadas, retirou-se fragmentos de aproximadamente 5mm das folhas e cascas que foram desinfestados superficialmente com Extran 2%, álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (3 minutos) e água destilada esteril (2 minutos) (COLLADO et al., 1996). Após este processo de desinfestação superficial, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Dextrose Batata (BDA/Difco) suplementado com 200mg/L de cloranfenicol (Sigma/EUA), utilizado para inibir o crescimento de bactérias epifíticas ou endofíticas contaminantes (Figura 5). Alíquotas da água destilada esterilizada utilizada no processo de desinfestação também foram plaqueadas como controle para assegurar que somente os fungos endofíticos foram isolados. As placas foram incubadas a 25-28 °C por um período de até 60 dias. Os isolados de fungos obtidos foram purificados utilizando placas de Petri com BDA e preservados em duplicata, sendo os filamentosos em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967) e em glicerol 30% a - 80 °C. Além disso, os fungos foram mantidos por repiques sucessivos em placas de Petri contendo BDA. Todos os isolados obtidos durante o estudos foram depositados na Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

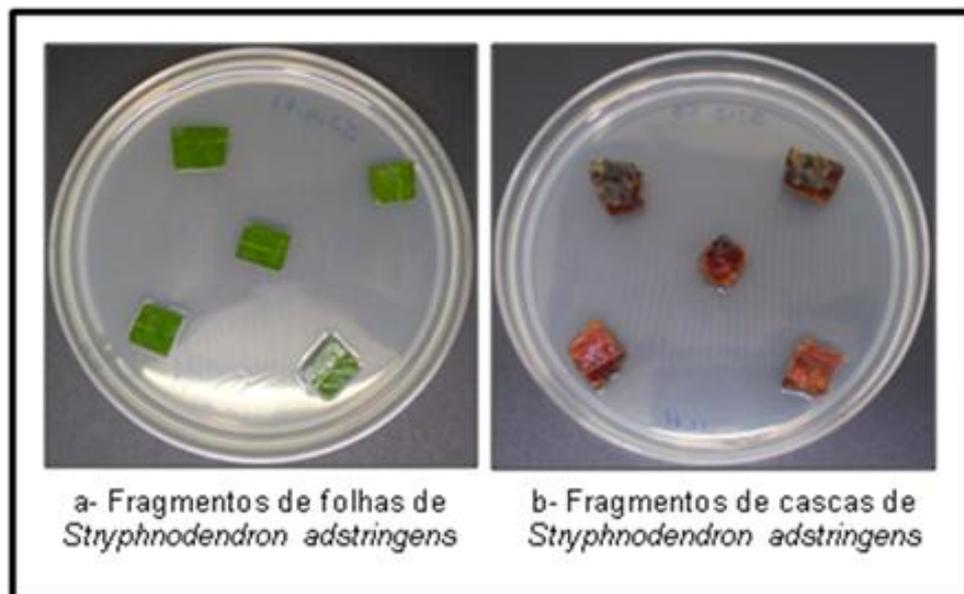


Figura 5: Fragmentos de folhas e cascas de *Stryphnodendron adstringens* incubados em Ágar Dextrose Batata (BDA).

4.3 Identificação dos fungos endofíticos isolados

4.3.1 Fungos filamentosos

As colônias dos isolados de fungos filamentosos foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Selecionou-se um isolado de cada morfotipo para identificação molecular por meio do sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal.

4.3.1.1 Extração do DNA total

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa et al. (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em BDA, e então fragmentos de micélio foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e deixado a – 20°C por aproximadamente 10 minutos. O micélio foi triturado com auxílio de um pistilo e foram acrescentados 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, colocou-se o tubo por 30 minutos a 60 °C em banho-maria. Em seguida, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos e o líquido sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Ao novo tubo foi acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0 °C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e em seguida, adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% p/v e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por

homogeneização com etanol 70% p/v. A amostra foi deixada overnight para secagem e após foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA, os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Technologies, EUA), posteriormente armazenado em freezer a -20 °C.

4.3.1.2 Amplificação utilizando os primers ITS1 e ITS4

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5,0 µL de tampão 10X (Fermentas), 3,0 µL de MgCl₂ 25mM (Fermentas), 2,0 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol⁻¹ (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas), de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL) e o volume final completado com água deionizada autoclavada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.3.1.3 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados mediante técnica com polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de uma solução de polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M, e deixado em banho-maria

à 37 °C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e descartado. Em seguida, foi adicionado 125 µL de etanol 70-80% resfriado a 4 °C. O tubo foi novamente centrifugado a 13.500 rpm por dois minutos e então retirou-se o etanol. Este passo foi repetido mais uma vez e a amostra novamente centrifugada a 13.200 rpm por um segundo. O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10 µL de água deionizada estéril e o conteúdo do tubo homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37 °C por 40 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) e então utilizado nas reações de sequenciamento.

4.3.1.4 Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACE™ 1000, no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM - UFMG) e no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM - CPqRR/FIOCRUZ). Para as reações de sequenciamento foram utilizados 80-120 ng do DNA purificado e os reagentes presentes no Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 4 µL do pré-mix (presente no kit de sequenciamento), 1 µL do iniciador (5 µmol⁻¹), de 1 a 5 µL de DNA e o volume final foi completado com água deionizada autoclavada. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95 °C por 25 segundos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50 °C e 3 minutos de extensão a 60 °C. Em seguida, os produtos da reação foram transferidos para uma placa de sequenciamento de 96 poços e então precipitados.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 µL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada para que as gotas do acetato de amônio se misturem à reação. Em seguida foram adicionados 28 µL de etanol absoluto (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.

Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado virando-se a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 150 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante 1 segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol.

O DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuspendido em 10 µL de “tampão de corrida” (presente no kit de sequenciamento). A placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, centrifugada por 1 segundo a 900 rpm e armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACE™ 1000.

4.3.1.5 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências depositadas GenBank, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biothecnology e disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os isolados que apresentaram sequência com identidade \geq a 98% em relação às sequências de fungos depositadas no GenBank, foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade entre 93 e 97% somente o gênero foi aceito, para sequências com identidade <93% os isolados foram identificados como espécies desconhecidas ou identificados em família, classe, ordem (ROSA et al., 2010).

As sequências dos isolados referentes à ordem, família, gênero ou outros níveis hierárquicos, que apresentaram sequências com identidade <98%, foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas para elucidação da posição taxonômica, submetidos ao alinhamento dos fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA. A análise filogenética foi conduzida utilizando o programa MEGA (*Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 4 (TAMURA et al., 2007). Os táxons que apresentaram sequências menores que 300 pb foram considerados

como não identificados. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo *Neighbor-joining*. A análise de bootstrap foi com 1.000 repetições utilizando os softwares incluídos no Mega 4.

4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e equitabilidade

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

Para avaliar a diversidade de espécies dos diferentes locais de coleta, foram utilizados os índices de riqueza e equitabilidade: (i) Shannon $H = -\sum ni/n \ln (ni/n)$ e (ii) Simpson's $= \sum (ni/n)^2$, respectivamente, onde ni é o número de indivíduos do táxon i e n é o número total de indivíduos. Para avaliar a similaridade entre as comunidades fúngicas de cada local de coleta utilizou-se o coeficiente de Sorensen (QS) representado pela fórmula: $QS = 2C/(A+B)$, onde A e B representam o número de espécies nas amostras A e B , respectivamente, e C o número de espécies compartilhadas pelas duas amostras. Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (RYAN et al., 1995).

4.5 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos

4.5.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA a 28 °C com umidade de 70-80%. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi transferido para tubos cônicos de 50 mL contendo 35 mL de etanol PA (Vetec). O conteúdo do tubo foi macerado com auxílio

de um bastão de vidro, e incubado a 10 °C e após 48 horas o sobrenadante transferido para frascos de vidro e para tubos de 1,5 mL.

4.5.2 Extratos dos vegetais

Folhas e cascas de *S. adstringens* foram coletados dos 30 indivíduos e colocados em tubos cônicos de 50 mL com 35 mL de etanol (PA). Os tubos foram mantidos ao abrigo da luz e, após 15 dias, o etanol (sobrenadante) de cada tubo foi filtrado e transferido para frascos de vidro e tubos de 1,5 mL.

Todos os extratos brutos obtidos, dos fungos filamentosos e levedura, assim como os extratos vegetais, foram secos em centrífuga a vácuo “Speed Vac” (Savant) com temperatura inferior a 35 °C, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), a uma concentração de 20 e 100 mg/mL, e depositados na Extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do CPqRR/FIOCRUZ e mantidos a -20 °C até utilização nos ensaios biológicos.

4.6 Ensaios Biológicos

4.6.1 Determinação da atividade antifúngica

A determinação da atividade antifúngica dos extratos obtidos foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com metodologia descrita no Documento 7.1 *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (AFTS-EUCAST, 2002)*, o qual é baseado nos procedimentos de referência CLSI M27-A2, com modificações, a fim de obter maior exatidão na determinação dos valores de CIM (STOPPA et al., 2009). Este método é de fácil execução, rápido, econômico e adequado para a leitura com leitores de placas de microtitulação, que permite a transferência direta, armazenamento e manipulação de dados com um computador AFTS-EUCAST, 2002). Além de ser uma metodologia mais vantajosa, por reduzir o tempo de incubação necessário – 24hs – para obter um crescimento dos alvos, suficiente para a determinação dos valores de CIM, devido a suplementação de 2% de glicose ao

meio de cultura sintético utilizado (RPMI 1640 tamponado com MOPS) (STOPPA et al., 2009).

Como microrganismos alvos foram utilizadas as linhagens de *Candida albicans*: ATCC 18804, 2.1A e 15.3C. As linhagens 15.3C e 2.1A foram previamente isoladas por Gabler (2008), de um paciente aidético com presença de candidose oral e contagens de CD4 abaixo de 200 células/mm³ (GABLER et al., 2008), e um paciente tuberculoso com presença de candidose oral, respectivamente. A linhagem ATCC 18804 isolada da lesão de um paciente com micose interdigital (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=18804&Template=fungiYeast>). O método de microdiluição também foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima e confirmar o perfil de sensibilidade e resistência das linhagens utilizadas como alvo frente aos azólicos: itraconazol e fluconazol, e a anfotericina B. A concentração final dos antifúngicos foi de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL para o fluconazol e 0,031 µg/mL a 16 µg/mL para o itraconazol e para a anfotericina B. As linhagens de *C. albicans* 2.1A e 15.3C eram resistentes a itraconazol e fluconazol, respectivamente, e a linhagem de *C. albicans* ATCC, sensível a todos os antifúngicos testados.

4.6.2 Padronização dos inóculos

Os isolados de *C. albicans* foram crescidos em ágar Sabouraud (Difco/EUA) a 30° C por 24 horas. Cinco colônias distintas com diâmetro de aproximadamente 1 mm foram suspensas em solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular foi padronizada por meio da escala de Mac Farland nº 0,5 em densidade óptica o que corresponde a 10⁶ UFC/mL acrescentando-se solução salina, quando necessário, a absorvância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm o que equivale a 80% de transmitância (AFTS-EUCAST, 2002). Posteriormente a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 acrescido de 2% de glicose) para utilização no ensaio.

4.6.3 Ensaio antifúngico

Para a realização do ensaio antifúngico utilizou-se o meio de cultura sintético RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (SIGMA), suplementado com 2% glicose e placas de 96 poços de fundo chato (TPP). Os extratos foram testados em duas diferentes concentrações: 250 e 100µg/ml, e todos os testes foram realizados em duplicata sendo que a placa foi dividida conforme Figura 6.

Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 ou 10µL do extrato (dissolvidos em DMSO e água deionizada autoclavada), 25 ou 40 µL de RPMI 1640 e 50 µL de inóculo. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico anfotericina B (Sigma) e ao final, o volume de cada poço foi 100 µL e as concentrações: DMSO 0,25 ou 0,1%, droga controle 2 µg/mL e extrato 250 e/ou 100 µg/mL.

As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. Após o período de incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), homogeneizado e as placas novamente incubadas a 30 °C por 4 horas. O MTT, sal tetrazólio amarelo, é convertido à azul de formazan por desidrogenases das células vivas (SOUSA, 2007), revelando a presença daquelas metabolicamente ativas. Posteriormente, acrescentou-se a cada poço 100 µL/poço de SDS/Isopropanol 5% (50g de Dodecil Sulfato de Sódio, 200mL água deionizada autoclavada, 500 mL q.s.p. Isopropanol PA, pH 5,4), e então as placas foram homogeneizadas rigorosamente. O SDS/Isopropanol rompe a membrana celular dos microrganismos alvos e disponibiliza no meio o formazan.

A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca *VERSAmax* (Molecular Devices) pelo programa *Softmax[®] Pro 5* (Molecular Devices), com a absorvância de 570 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do controle de microrganismo, sendo a porcentagem de inibição calculada por meio da fórmula abaixo, em que DO* refere-se à densidade ótica dos poços. Arbitrariamente, foram considerados como promissores os extratos com valor de inibição maior ou igual que 70%, medianamente promissores aqueles com valores entre 50 e 69% e não promissores aqueles com valor de inibição igual ou menor que 49%.

$$\text{Porcentagem de Inibição: } \frac{\text{DO}^* \text{ poço controle} - \text{DO poço tratado}}{\text{DO poço controle}} \times 100$$

das proteínas das células e pode ser utilizado para quantificar a proliferação celular. Os extratos capazes de inibir a multiplicação celular em pelo menos 60% foram selecionados como ativos. Os testes foram realizados em triplicatas e com controles positivos representados pelas drogas citotóxicas e etoposídeo (8 µg/mL - Sigma, EUA).

4.6.5 Ensaio *in vitro* com a forma amastigota-like de *Leishmania* (*leishmania*) *amazonensis*

A manutenção das células axênicas de *L. (L.) amazonensis* e o ensaio com amastigotas-like foram realizados no LQPN e Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) por técnicos especializados. Culturas axênicas da forma amastigota-like de *L. (L.) amazonensis*, previamente caracterizadas por meio de eletroforese de isoenzimas e depositadas na Coleção de *Leishmania* do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, foram utilizadas para o ensaio adotando-se o protocolo proposto por Callahan et al. (1997) com algumas modificações.

As formas amastigotas foram semeadas a 10^8 parasitos/mL e deixadas em meio apropriado, na presença ou não dos extratos e drogas controle. Após 72 horas, a atividade dos extratos testados sobre as amastigotas nos poços teste foi medida pelo método colorimétrico do MTT (Sigma/USA). A absorbância dos poços testes foi comparada com as absorbâncias dos controles com e sem drogas de referência (Anfotericina B). Foram considerados ativos os extratos capazes de inibir acima de 70% a proliferação dos parasitas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Ao final de cada coleta, uma realizada nos entornos da Serra do Cipó e uma na Serra de São José, foram processados 225 fragmentos de folhas e 225 fragmentos de cascas de *S. adstringens*, totalizando 450 fragmentos/coleta. Não existe uma padronização quanto à melhor metodologia a ser aplicada para a obtenção de fungos endofíticos, tais como o tamanho dos fragmentos incubados 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). O processo de desinfestação superficial e plaqueamento dos fragmentos vegetais, utilizados no presente trabalho, representam uma metodologia tradicional para a detecção e quantificação dos fungos endofíticos (TAYLOR et al., 1999; STONE et al., 2000; TAN & ZOU, 2001), bem como a utilização do meio de cultura BDA (Ágar Dextrose Batata) (SOUZA et al., 2004; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005; MARINHO et al., 2007; ROSA et al., 2010). No presente trabalho, o número de isolados obtidos mostrou que a metodologia utilizada (etapas de desinfestação superficial e uso do meio de cultura BDA) foi eficiente para a eliminação de microrganismos epifíticos e consequente obtenção de diferentes táxons da comunidade de fungos endofíticos de *S. adstringens*.

A partir das plantas jovens de *S. adstringens* coletadas na Serra do Cipó foram obtidos 200 isolados de fungos filamentosos, 149 presentes nas folhas (74,5%) e 51 nas cascas (25,5%) (Tabela 1). Já das plantas adultas de *S. adstringens* coletadas na Serra de São José foram obtidos 147 isolados de fungos filamentosos, dos quais 86 foram obtidos de folhas (58,5%) e 61 isolados de cascas (41,5%). Ao final das duas coletas foram obtidos 235 isolados de fungos endofíticos das folhas (67,7%) e 112 (32,3%) de cascas.

Os indivíduos de *S. adstringens* coletados no entorno da Serra do Cipó foram representados por plantas jovens, as quais apresentavam folhas novas e copa menos alongada quando comparadas as plantas coletadas na Serra de São José (plantas adultas). O número de isolados de fungos endofíticos obtidos de *S. adstringens* pode ter sido influenciado por diferentes fatores como idade dos

indivíduos coletados, distribuição geográfica, umidade relativa do ambiente, posição relativa da planta (sua altura em relação ao solo), dentre outros (PETRINI et al., 1992; CARROL, 1995; RODRIGUES & PETRINI, 1997; SAIKKONEN et al., 1998; STROBEL, 2003).

Outro importante fator que exerce influência na detecção e distribuição de fungos endofíticos é o tipo de tecido do hospedeiro utilizado para o isolamento dos microrganismos (STONE et al., 2004). Isto pode ser observado no presente trabalho uma vez que do total de fungos endofíticos obtidos, 235 foram isolados de folhas (67,7%) e 112 (32,3%) de cascas. A casca de *S. adstringens* possui elevados teores de tanino (20 a 30%) (CASTRO et al., 2009), que são substâncias fenólicas com propriedade adstringente, capazes de precipitar proteínas e, conseqüentemente apresentam um efeito antibacteriano e antifúngico (MONTEIRO et al., 2005). Esta característica pode ter influenciado a frequência de fungos endofíticos presente no interior das cascas de *S. adstringens*.

Tabela 1: Fungos endofíticos obtidos de folhas e cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

Isolados de fungos filamentosos endofíticos associados à <i>S. adstringens</i>					
	Nº do indivíduo	Folha	Casca	Total de isolados por indivíduo	Total de isolados por coleta
	1	12	10	22	
	2	12	2	14	
	3	14	4	18	
	4	9	3	12	
	5	10	3	13	
	6	11	3	14	
Indivíduos jovens	7	15	1	16	200
	8	4	4	8	
	9	8	3	11	
	10	12	3	15	
	11	9	5	14	
	12	10	2	12	
	13	3	4	7	
	14	13	1	14	
	15	7	3	10	

	1	8	4	12	
	2	9	2	11	
	3	7	2	9	
	4	3	4	7	
	5	1	3	4	
	6	2	3	5	
	7	4	2	6	
Indivíduos adultos	8	6	4	10	147
	9	11	4	15	
	10	7	5	12	
	11	5	7	12	
	12	3	5	8	
	13	10	3	13	
	14	4	9	13	
	15	6	4	10	
	Total	235	112	347	347
	Porcentagem	67,4	32,3	100	

5.2 Identificação dos fungos filamentosos endofíticos

Os 200 isolados de fungos endofíticos obtidos de exemplares jovens de *S. adstringens* foram agrupados em 42 morfotipos de acordo com as características macromorfológicas. Os 147 isolados obtidos dos indivíduos adultos foram agrupados em 57 morfotipos distintos. Um isolado de cada morfotipo foi selecionado para sequenciamento da região ITS do gene do rRNA.

As espécies, gêneros, famílias e ordens identificadas pertencem em sua maioria ao filo *Ascomycota*, os quais fazem parte das classes: *Sordariomycetes* (60% do total dos táxons), *Dothideomycetes* (32%), *Eurotiomycetes* (6%), *Orbiliomycetes* (1%) e *Pezizomycetes* (1%) (Figura 7). Dentre os táxons obtidos foram identificados fungos pertencentes as ordens *Diaporthales*, *Pezizales* e a família *Glomerellaceae*. E também foram identificados isolados pertencentes aos seguintes gêneros: *Alternaria* (Nees), *Arthrotrichum* (Corda), *Aspergillus* (P. Micheli ex Haller), *Botryosphaeria* (Ces. & De Not.), *Cladosporium* (Link), *Colletotrichum* (Corda), *Coniochaeta* [(Sacc.) Cooke], *Cytospora* (Ehrenb.), *Diaporthe* (Nitschke), *Fimetariella* (N. Lundq.), *Guignardia* (Viala & Ravaz), *Massarina* (Sacc.), *Muscodora* (Worapong, Strobel & W.M. Hess), *Neofusicoccum* (Crous, Slippers & A.J.L. Phillips), *Nigrospora* (Zimm.), *Paraconiothyrium* (Verkley), *Penicillium* (Link), *Pestalotiopsis* (Steyaert), *Phomopsis* [(Sacc.) Sacc.], *Preussia* (Fuckel), *Pseudofusicoccum* (Mohali, Slippers & M.K. Wingfield), *Sordaria* (Ces. & De Not.), *Sporormiella* (Ellis & Everh.), *Trichoderma* (Pers.) e *Xylaria* (Hill ex Schrank) (Tabelas 2 e 3). Representantes das classes e gêneros de fungos endofíticos encontrados associados a *S. adstringens* vem sendo isolados frequentemente como endofíticos de diferentes plantas. De acordo com Arnold (2007), os fungos endofíticos são representados, principalmente, por táxons do filo *Ascomycota*, em sua maioria incluídos nas classes *Dothideomycetes* e *Sordariomycetes*, dado que foi observado no presente trabalho.

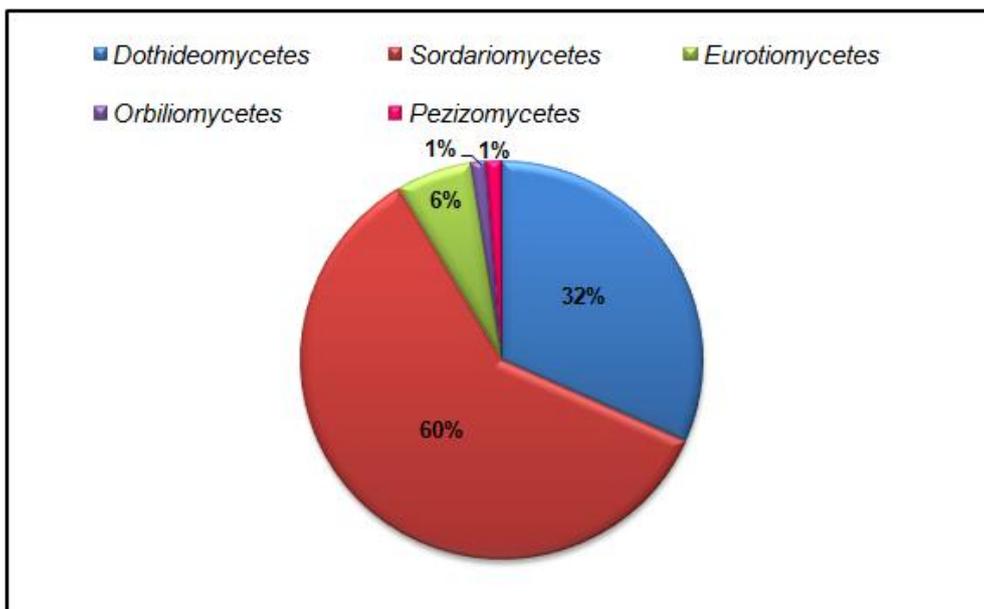


Figura 7: Porcentagem de fungos endofíticos associados a *Stryphnodendron adstringens* agrupados em classes.

5.2.1 Composição de fungos filamentosos obtidos a partir de indivíduos jovens de *Stryphnodendron adstringens*

Dos 42 isolados de fungos filamentosos selecionados (um de cada morfotipo) para sequenciamento da região ITS do gene do rRNA, 39 forneceram amplicons com dosagens suficientes para a identificação molecular. Os DNAs de três isolados não puderam ser amplificados até o presente momento. Dois isolados, após sequenciamento, geraram sequências com menos de 300 pb. Portanto, cinco morfotipos não foram identificados, até o momento. Dos isolados obtidos das plantas jovens, amostradas no entorno da Serra do Cipó, foi possível identificar 18 táxons em nível de espécie, 18 em gênero e um em ordem. Estes fungos foram pertencentes a quatro classes: *Sordariomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* e *Orbiliomycetes* (Tabela 2).

A classe *Orbiliomycetes* foi representada apenas pelo isolado UFMGCB 4694, o qual apresentou sequência com identidade de 96% em relação a sequência do fungo *Arthrobotrys foliicola* (número de acesso no GenBank: HM775180) (Figura 8a). Dois isolados foram identificados como representantes da classe *Eurotiomycetes* (Tabela 2). UFMGCB 4781 apresentou sequência com 99% de identidade quando comparado com a sequência de *Aspergillus flavipes* (AY373849) (Tabela 2). O

isolado UFMGCB 4661 apresentou 99% de identidade com *Penicillium glabrum* (EF592172), e diferiu em somente dois nucleotídeos em relação a *P. glabrum* e *P. adametzioides* (DQ681325) (Figura 8a). Desta forma, os os isolados UFMGCB 4781 e 4661 foram identificados como *A. flavipes* e *Penicillium* sp., respectivamente.

A classe *Sordariomycetes* foi a mais abundante com 25 táxons identificados. A sequência do isolado UFMGCB 4637 apresentou 99% de identidade com a sequência do fungo *Sordaria fimicola* (FN868475), um endofítico isolado de *Pinus halepensis*, na Espanha (BOTELLA & DIEZ, 2010). O isolado UFMGCB 4666 apresentou sequência com 97% de identidade com *Muscodor vitigenus* (AY100022) (Tabela 2). A sequência do isolado UFMGCB 4692 apresentou 97% de identidade com a sequência de *Nigrospora oryzae* (GQ176275).

Os isolados UFMGCB 4596 e UFMGCB 4636 apresentaram sequências com 97 e 98% de identidade em relação às sequências de *Colletotrichum boninense* (EU822802) e *C. gloeosporioides* (HM473080), respectivamente (Tabela 2). Já o isolado UFMGCB 4704 foi identificado como *Colletotrichum* sp., pois apresentou sequência com 91% de identidade em comparação a *C. gloeosporioides* (EU200455) e de 3 a 5% de diferença com outras espécies de *Colletotrichum* (Figura 8a).

UFMGCB 4615 apresentou sequência com 95% de identidade com a sequência de *Cytospora* sp. (DQ996039). Este isolado diferiu de 3 a 5% com as sequência de *Cytospora* sp., *C. acaciae* (DQ2438040) e *Cytospora* cf. *austromontana* (EU552119), sendo portanto identificado como *Cytospora* sp. (Figura 8b). Os isolados UFMGCB 4600 e 4689 apresentaram sequências com 97 e 93% de identidade em relação às sequências de *Xylaria* sp. (números de acesso no GenBank: AB524021 e FN812861, respectivamente), sendo identificados somente em nível de gênero. UFMGCB 4728 também foi identificado em *Xylaria* sp., pois apresentou sequência com 96% de identidade com *Xylariaceae* sp. (EU009987) e de 95 a 91% com diferentes espécies do gênero *Xylaria* (Figura 9a).

Tabela 2: Identificação molecular dos fungos endofíticos obtidos de indivíduos jovens de *Stryphnodendron adstringens*.

Código UFMGCB ^a	Número de isolados	Espécie de referência [número de acesso no GenBank]	Identidade (%)	Número de pb analisados	Identificação ^b
4623	3	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. [AY751456]	99	540	<i>Alternaria alternata</i>
4694 ^c	1	<i>Arthrotrys foliicola</i> Matsushima UFMGCB 2183 [HM775180]	96	367	<i>Arthrotrys</i> sp.
4781	1	<i>Aspergillus flavipes</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church ATCC 1030 [AY373849]	99	550	<i>Aspergillus flavipes</i>
4746 ^c	1	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (Moug. ex Fries) Ces. & De Not. [EU080918]	97	438	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
4613	3	<i>Cladosporium cladosporioides</i> CBS 674.82 18S (Fresen.) G.A. de Vries [HM148014]	100	501	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
4596 ^c	7	<i>Colletotrichum boninense</i> Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib. [EU822802]	97	517	<i>Colletotrichum boninense</i>
4636	3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc. [HM473080]	98	496	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
4704 ^c	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc. [EU200455]	91	519	<i>Colletotrichum</i> sp.
4615 ^c	1	<i>Cytospora</i> sp. [DQ996039]	95	465	<i>Cytospora</i> sp.
4619 ^c	4	<i>Phomopsis</i> sp. [DQ780432]	87	345	<i>Diaporthales</i> sp.
4602	32	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc. [GQ352487]	98	557	<i>Diaporthe phaseolorum</i>

4740 ^c	3	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc. [HM855215]	91	527	<i>Diaporthe</i> sp.
4793	23	<i>Guignardia camelliae</i> (Cooke) E.J. Butler [GU595026]	98	577	<i>Guignardia camelliae</i>
4598 ^c	7	<i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy [HQ328040]	94	550	<i>Guignardia</i> sp.
4666 ^c	1	<i>Muscodor vitigenus</i> Daisy, Strobel, Ezra & W.M. Hess [AY100022]	97	535	<i>Muscodor vitigenus</i>
4785	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [HQ023028]	88	210	Não identificado
4719	1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. [FJ903288]	97	244	Não identificado
4609	9	<i>Neofusicoccum ribis</i> (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips [GU251128]	98	471	<i>Neofusicoccum ribis</i>
4692 ^c	2	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berkeley & Broome) Petch [GQ176275]	97	419	<i>Nigrospora oryzae</i>
4661 ^c	2	<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling [EF592172]	99	522	<i>Penicillium</i> sp.
4614	4	<i>Pestalotiopsis clavispora</i> (G.F. Atk.) Steyaert [HM999902]	99	504	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>
4711 ^c	2	<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres [GQ855796]	100	546	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1

4675 ^c	1	<i>Pestalotiopsis cocculi</i> (Guba) G.C. Zhao & N. Li [HM190152]	98	569	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2
4739 ^c	5	<i>Phomopsis</i> sp. [DQ872669]	94	531	<i>Phomopsis</i> sp. 1
4610 ^c	14	<i>Phomopsis</i> sp. [EU002934]	97	548	<i>Phomopsis</i> sp. 2
4703 ^c	2	<i>Phomopsis</i> sp. [FJ009525]	98	495	<i>Phomopsis</i> sp. 3
4761 ^c	1	<i>Phomopsis</i> sp. [FJ009548]	98	373	<i>Phomopsis</i> sp. 4
4606 ^c	15	<i>Phomopsis</i> sp. [FN597586]	94	376	<i>Phomopsis</i> sp. 5
4710 ^c	2	<i>Phomopsis</i> sp.[HQ022935]	92	512	<i>Phomopsis</i> sp. 6
4641 ^c	9	<i>Phomopsis</i> sp. [HQ022935]	97	499	<i>Phomopsis</i> sp. 7
4756 ^c	4	<i>Preussia africana</i> Arenal, Platas & Peláez [AY510420]	99	424	<i>Preussia africana</i>
4777 ^c	1	<i>Preussia</i> sp. [FJ210520]	99	455	<i>Preussia pseudominima</i>

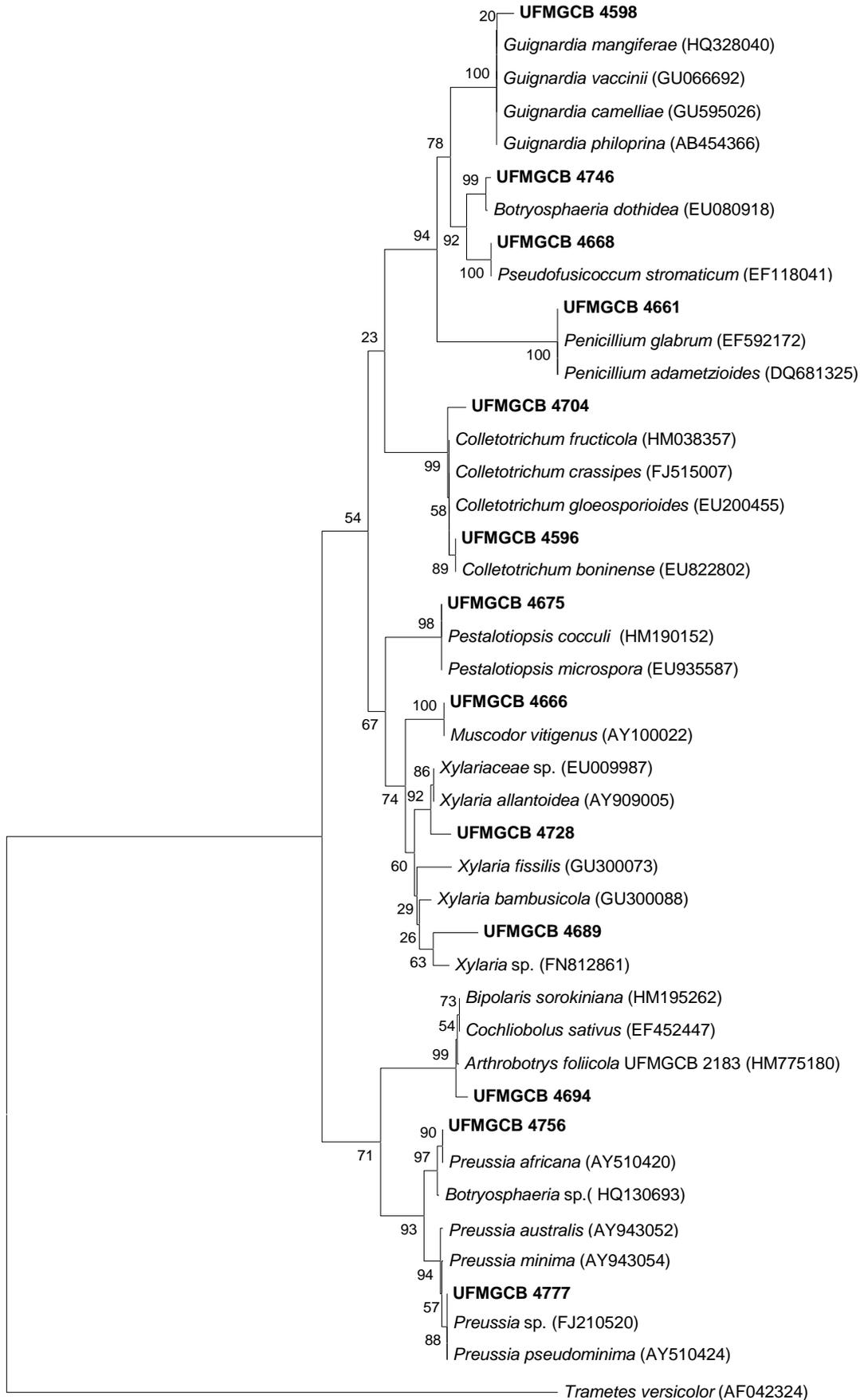
4616	5	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> Mohali, Slippers & M.J. Wingf. [EF118042]	99	469	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>
4668 ^c	1	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> Mohali, Slippers & M.J. Wingf. [EF118041]	97	484	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>
4637	1	<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not. [FN868475]	99	376	<i>Sordaria fimicola</i>
4685	13	<i>Xylaria hypoxylon</i> (L.) Grev. [EF423546]	99	469	<i>Xylaria hypoxylon</i>
4600 ^c	3	<i>Xylaria</i> sp. [AB524021]	97	535	<i>Xylaria</i> sp. 1
4689 ^c	1	<i>Xylaria</i> sp. [FN812861]	93	330	<i>Xylaria</i> sp. 2
4728 ^c	6	<i>Xylariaceae</i> sp. [EU009987]	96	470	<i>Xylaria</i> sp. 3

^aUFMGCB = Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;

^bIdentificação foi realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA;

^cTáxon para os quais foram construídas árvores filogenéticas para elucidação da posição taxonômica.

a)



0.1

b)

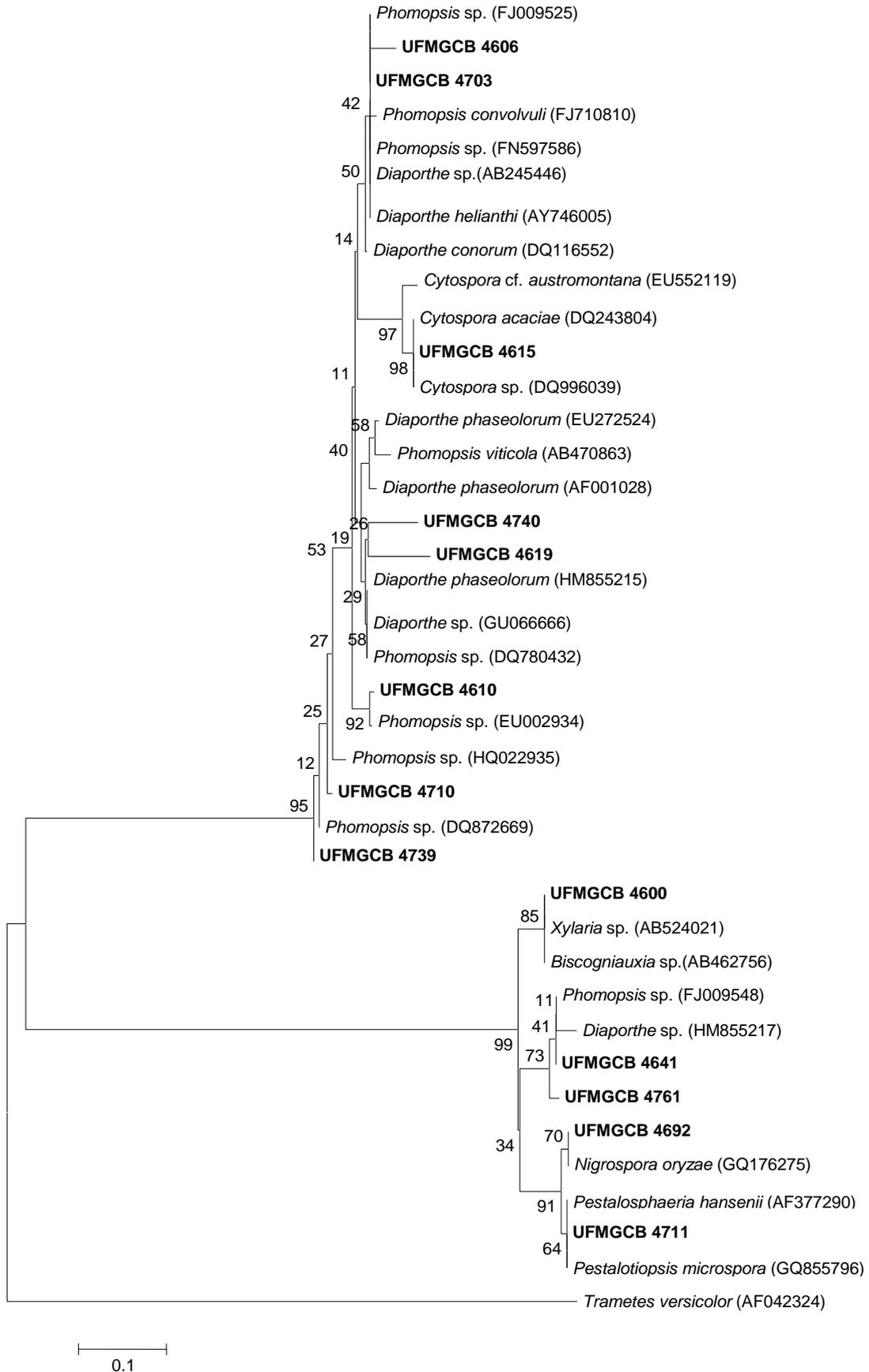


Figura 8 a e b: Árvores filogenéticas dos fungos filamentosos obtidos de exemplares jovens de *Stryphnodendron adstringens*. As árvores filogenéticas foram construídas baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA utilizando o 67 método *Neighbour-joining*. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo

Os isolados UFMGCB 4711 e 4675 apresentaram sequências com 100 e 98% de identidade com *P. microspora* (G1855796) e *P. cocculi* (HM190152), respectivamente. Porém, diferiram em menos de 2% com sequências de diferentes espécies deste gênero depositadas no GenBank, sendo identificados como *Pestalotiopsis* sp. (Figura 8a e 8b). Espécies de *Pestalotiopsis* são ubíquas ocorrendo em diferentes substratos (JEEWON et al., 2003), sendo obtidas como endofíticos de muitas espécies vegetais, bem como saprofíticos na casca e material vegetal em decomposição (METZ et al., 2000). Hu et al. (2007) obtiveram 132 isolados de *Pestalotiopsis* da casca de *Pinus armandii*, sendo 111 isolados (19 espécies) associados às cascas de *P. armandii*, o que demonstra a alta diversidade de espécies deste gênero presentes nas cascas. Neste trabalho, os isolados selecionados para sequenciamento e identificados como *Pestalotiopsis* spp. (*Pestalotiopsis* sp. e *P. clavispora*), foram obtidos das cascas de *S. adstringens*.

Os isolados identificados dentro do complexo teleomorfo/anamorfo *Diaporthe/Phomopsis* foram predominantes, com 10 morfotipos [total de 87 isolados (43.5%)] obtidos de indivíduos jovens de *S. adstringens*. Os isolados UFMGCB 4739, 4610, 4703, 4761, 4606, 4710 e 4641, identificados como *Phomopsis* sp., apresentaram entre 92 e 98% de identidade com sequências de diferentes espécies deste gênero depositadas no GenBank (Tabela 2). UFMGCB 4602 apresentou 98% de identidade com *D. phaseolorum* (GQ352487). Já o isolado UFMGCB 4740 apresentou 91% de identidade com *D. phaseolorum* (HM855215) e diferiu de 4 a 6% com diferentes espécies do gênero, sendo portanto identificado em *Diaporthe* sp. (Figura 8b). UFMGCB 4619 apresentou sequência com 87% de identidade em relação a *Phomopsis* sp. (DQ780432), e diferiu em 5% dos nucleotídeos com espécies do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, por isso foi identificado em nível de ordem como *Diaporthales* sp. (Figura 8b).

A classe *Dothideomycetes* foi a segunda com maior frequência de ocorrência e representada, principalmente pelo gênero *Neofusicoccum* e a espécie *N. ribis* (Tabela 2). As sequências dos isolados UFMGCB 4623, 4746 e 4613 apresentaram identidade acima de 97% com *Alternaria alternata* (AY751456), *Botryosphaeria dothidea* (EU080918) e *Cladosporium cladosporioides* (HM148014), respectivamente (Tabela 2). O isolado UFMGCB 4668 apresentou sequência com 97% de identidade com a sequência de *Pseudofusicoccum stromaticum* (EF118041).

O isolado UFMGCB 4598 apresentou sequência com 94% de identidade e diferiu em 3% com diferentes táxons de *Guignardia*, desta forma foi identificado em *Guignardia* sp. UFMGCB 4719 e 4785 apresentaram sequências com identidades de 97% e 88% quando comparadas com as sequências das espécies de *A. alternata* (FJ903288) e *Colletotrichum* sp. (FJ903288), respectivamente. Entretanto, os isolados foram assinalados como 'não identificado' devido ao baixo número de nucleotídeos sequenciados, 244 e 210, respectivamente (Tabela 2). Para a melhor identificação destes isolados, o sequenciamento da região ITS terá que ser repetida posteriormente.

5.2.2 Composição de fungos filamentosos obtidos a partir de indivíduos adultos de *Stryphnodendron adstringens*

Dos 57 táxons de fungos filamentosos selecionados para sequenciamento (um de cada morfotipo), 48 forneceram amplicons com dosagens de DNA suficientes para o sequenciamento. O DNA de nove isolados não pode ser amplificado e dois, após sequenciamento, apresentaram sequências com menos de 300 nucleotídeos. Portanto, 11 morfotipos não foram identificados, até o momento. Desta forma, dos isolados obtidos, foi possível identificar 18 em nível de espécie, 23 em gênero, um em família e 4 em ordem. Os táxons identificados fazem parte das classes: *Sordariomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes* e *Pezizomycetes* (Tabela 3).

Três táxons representaram a classe *Eurotiomycetes*. Entre estes os isolados UFMGCB 5056 e 5143 apresentaram sequências com identidade de 96 e 98% quando comparadas com *P. minioluteum* (AF380354) e *P. glabrum* (AF033407), respectivamente. Estes isolados diferiram em menos de 2% com sequências de ambas as espécies citadas, e foram identificados como *Penicillium* sp (Figura 9c e 9a).

Tabela 3: Identificação molecular dos fungos endofíticos obtidos de indivíduos adultos de *Stryphnodendron adstringens*.

Código UFMGCB ^a	Número de isolados	Espécie de referência [número de acesso no GenBank]	Identidade (%)	Número de pb analisados	Identificação ^b
5085	2	<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom & Church [FJ878630]	98	495	<i>Aspergillus ustus</i>
5024	2	<i>Colletotrichum boninense</i> Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib. [GU935881]	98	569	<i>Colletotrichum boninense</i>
5113 ^c	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc. [HQ264177]	97	497	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
5641 ^c	1	<i>Coniochaeta discoidea</i> (Udagawa & Furuya) Dania Garcia, Stchigel & Guarro [AY346297]	96	480	<i>Coniochaeta</i> sp.
5049 ^c	2	<i>Cytospora</i> sp. [DQ996039]	97	475	<i>Cytospora</i> sp. 1
5080 ^c	2	<i>Cytospora rhizophorae</i> Kohlm. & E. Kohlm. [EU301057]	95	514	<i>Cytospora</i> sp. 2
5040 ^c	4	<i>Diaporthe</i> sp. [GQ250201]	98	425	<i>Diaporthales</i> sp.1
5099 ^c	10	<i>Phomopsis</i> sp. [AF230761]	91	414	<i>Diaporthales</i> sp. 2
5116 ^c	7	<i>Diaporthe</i> sp. [GQ250201]	88	475	<i>Diaporthales</i> sp. 3

5111 ^c	2	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc. [AF001028]	92	567	<i>Diaporthe</i> sp.
5079	1	<i>Fimetariella rabenhorstii</i> (Niesl) N. Lundq. [HQ406808]	99	404	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>
5022 ^c	1	<i>Colletotrichum boninense</i> Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib. [FJ010201]	89	413	<i>Glomerellaceae</i> sp.
5025	7	<i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy [HM222959]	100	524	<i>Guignardia mangiferae</i>
5053	1	<i>Massarina igniaria</i> (C. Booth) Aptroot [EU715629]	99	499	<i>Massarina igniaria</i>
5164	7	<i>Cytospora</i> sp. [DQ996039]	97	277	Não identificado
5117	5	<i>Cytospora acaciae</i> CBS 468.6 Oudem. [DQ243804]	91	302	Não identificado
5137 ^c	7	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch [GQ176275]	98	436	<i>Nigrospora oryzae</i>
5043	2	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch [EU529993]	99	452	<i>Nigrospora oryzae</i>
5123 ^c	3	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch [FJ496318]	97	432	<i>Nigrospora oryzae</i>

5069	1	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i> CBS100299 Verkley [AY642531]	99	476	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>
5056 ^c	2	<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx [AF380354]	96	537	<i>Penicillium</i> sp. 1
5143 ^c	1	<i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling NRRL [AF033407]	98	511	<i>Penicillium</i> sp. 2
5071	1	<i>Pestalotiopsis clavispora</i> (G.F. Atk.) Steyaert [FJ459948]	99	526	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>
5028 ^c	1	Sarcosomataceous endophyte [AF485074]	95	461	<i>Pezizales</i> sp.
5060 ^c	1	<i>Phomopsis</i> sp. [AY745085]	92	408	<i>Phomopsis</i> sp. 1
5029 ^c	8	<i>Phomopsis theicola</i> Curzi [FJ009526]	96	519	<i>Phomopsis</i> sp. 2
5041 ^c	5	<i>Phomopsis theicola</i> Curzi [FJ009526]	95	430	<i>Phomopsis</i> sp. 3
5101 ^c	3	<i>Phomopsis</i> sp. [GQ250221]	99	467	<i>Phomopsis</i> sp. 4
5038 ^c	1	<i>Phomopsis</i> sp. [AY485728]	91	473	<i>Phomopsis</i> sp. 5
5109 ^c	1	<i>Preussia africana</i> Arenal, Platas & Peláez [AY510420]	99	455	<i>Preussia africana</i>

5136	1	<i>Preussia isomera</i> Cain [FN386291]	98	397	<i>Preussia isomera</i>
5033 ^c	6	<i>Preussia pseudominima</i> [AY510424]	99	400	<i>Preussia pseudominima</i>
5097 ^c	1	<i>Preussia pseudominima</i> [AY510424]	98	428	<i>Preussia</i> sp. 1
5030 ^c	5	<i>Preussia pseudominima</i> [AY510424]	99	466	<i>Preussia</i> sp. 2
5026 ^c	3	<i>Preussia</i> sp. [FJ037749]	99	504	<i>Preussia</i> sp. 3
5052 ^c	1	<i>Preussia persica</i> Asgari & Zare [GQ292750]	95	365	<i>Preussia</i> sp. 4
5084 ^c	1	<i>Preussia pseudominima</i> [AY510424]	98	413	<i>Preussia</i> sp. 5
5092 ^c	2	<i>Preussia pseudominima</i> [AY510424]	93	490	<i>Preussia</i> sp. 6
5082 ^c	1	<i>Preussia</i> sp. [HQ130700]	96	523	<i>Preussia</i> sp. 7
5130 ^c	3	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> Mohali, Slippers & M.J. Wingf. [EF118042]	95	379	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.
5065	3	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> Mohali, Slippers & M.J. Wingf. [EF118041]	99	459	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>

5110 ^c	2	<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not. [FN868475]	97	495	<i>Sordaria fimicola</i>
5057	1	<i>Sordaria tomento-alba</i> Cailleux [AY681195]	98	499	<i>Sordaria tomento-alba</i>
5050 ^c	2	<i>Sporormiella</i> sp. [HQ130664]	99	507	<i>Sporormiella isomera</i>
5138 ^c	3	<i>Sporormiella</i> sp. [HQ130664]	98	455	<i>Sporormiella</i> sp.
5128 ^c	1	<i>Trichoderma</i> sp. [AY222347]	98	422	<i>Trichoderma</i> sp.
5083 ^c	2	<i>Xylaria</i> sp. [FJ175174]	100	478	<i>Xylaria</i> sp. 1
5027 ^c	1	<i>Xylaria</i> sp. [FJ487924]	99	498	<i>Xylaria</i> sp. 2

^aUFMGCB = Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;

^bIdentificação foi realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA;

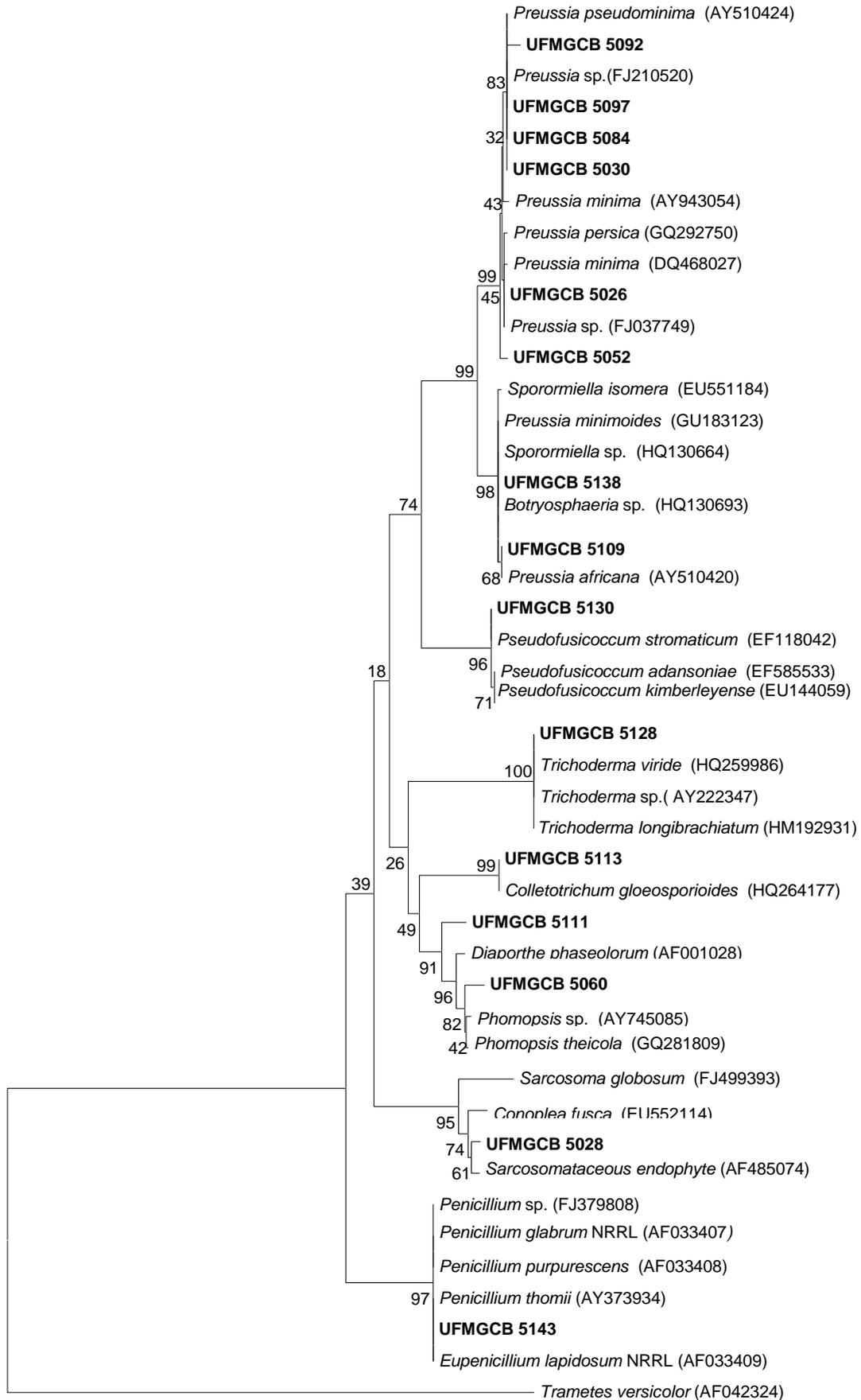
^cTáxon para os quais foram construídas árvores filogenéticas para elucidação da posição taxonômica.

A classe *Pezizomycetes* foi representada apenas pelo isolado UFMGCB 5028, que apresentou sequência com 95% de identidade em comparação com *Sarcosomataceous endophyte* (AF485074) e 92% com *Conoplea fusca* (EU552114). Na figura 9a, este isolado foi agrupado com as espécies citadas acima com um valor de 95% de “bootstrap” e diferença de nucleotídeos de 3 a 5%. Baseado nestes resultados, UFMGCB 5028 foi identificado em nível de ordem como *Pezizales* sp. De acordo Hansen & Pfister (2006), espécies de fungos da ordem *Pezizales* podem estabelecer diferentes funções ecológicas como sapróbios, micorrizicos, ou parasitas de plantas, podendo ser coletadas de solo, madeira, folhas e esterco

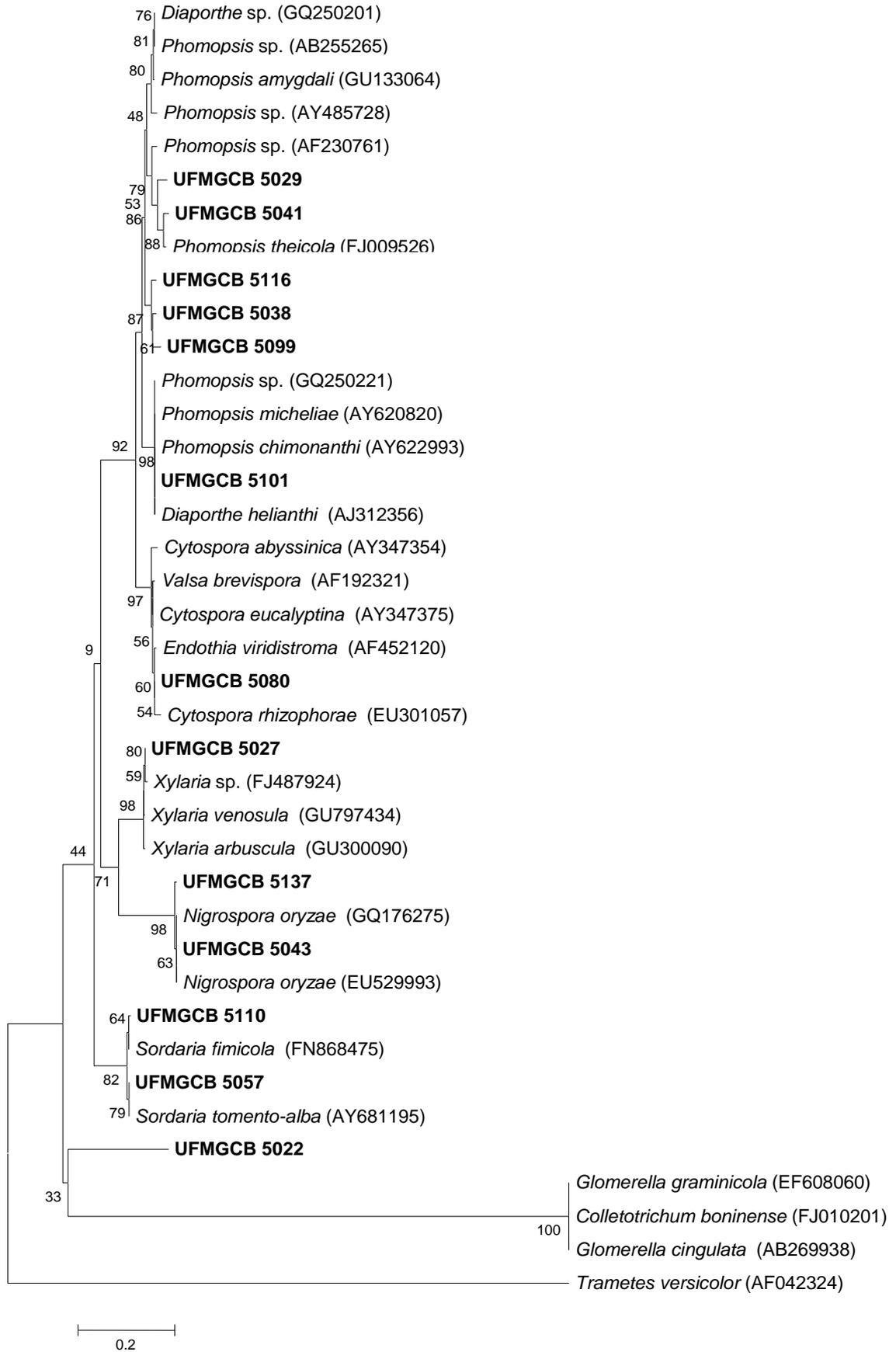
Táxons de *Sordariomycetes* foram identificados em maior frequência nos indivíduos adultos de *S. adstringens*. O isolado UFMGCB 5113, identificado como *C. gloeosporioides*, apresentou sequência com 97% de identidade *C. gloeosporioides* (HQ264177) (Tabela 3). O isolado UFMGCB 5022 apresentou sequência com 89% de identidade com a sequência de *C. boninense* (FJ010201), diferindo em 11% das linhagens de *Glomerella cingulata* (AB269938) e *G. graminicola* (EF608060). Considerando isto, UFMGCB 5022 foi identificado em nível de família como *Glomerellaceae* sp. (Figura 9b).

Os isolados UFMGCB 5049 e 5080 foram identificados como *Cytospora* sp. UFMGCB 5049 apresentou sequência com 97% de identidade com *Cytospora* sp. (DQ996039) e diferiu de 3 a 6% com sequências deste gênero (Figura 9c). Já UFMGCB 5080 apresentou sequência com 95% de identidade com *Cytospora rhizophorae* (EU301057) e foi agrupado com *Cyospora*, *Endothia* e *Valsa*, com um valor de 97% de “bootstrap”, diferindo de 1 a 6% de nucleotídeos com estas espécies (Figura 9b).

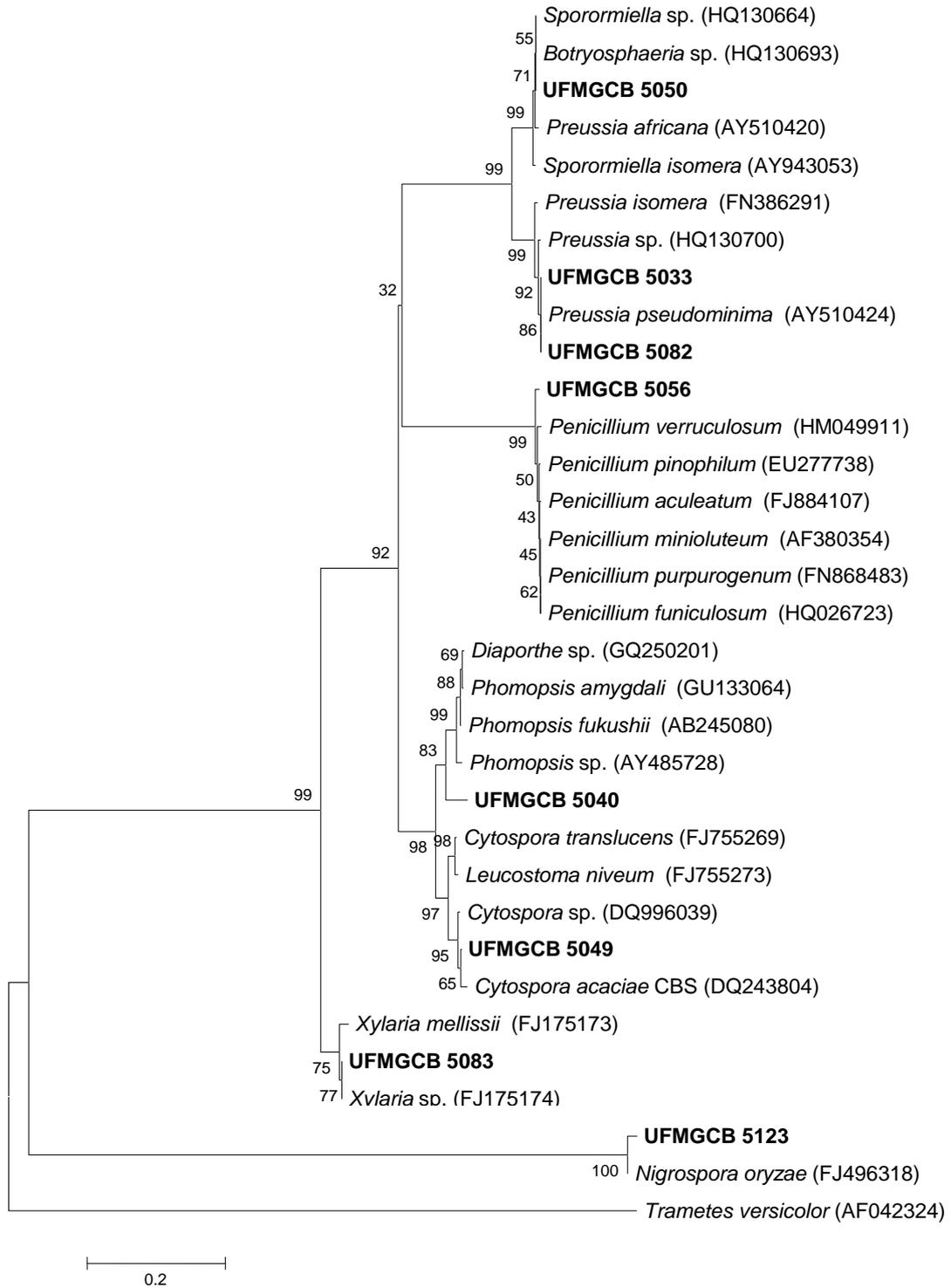
a)



b)



c)



d)

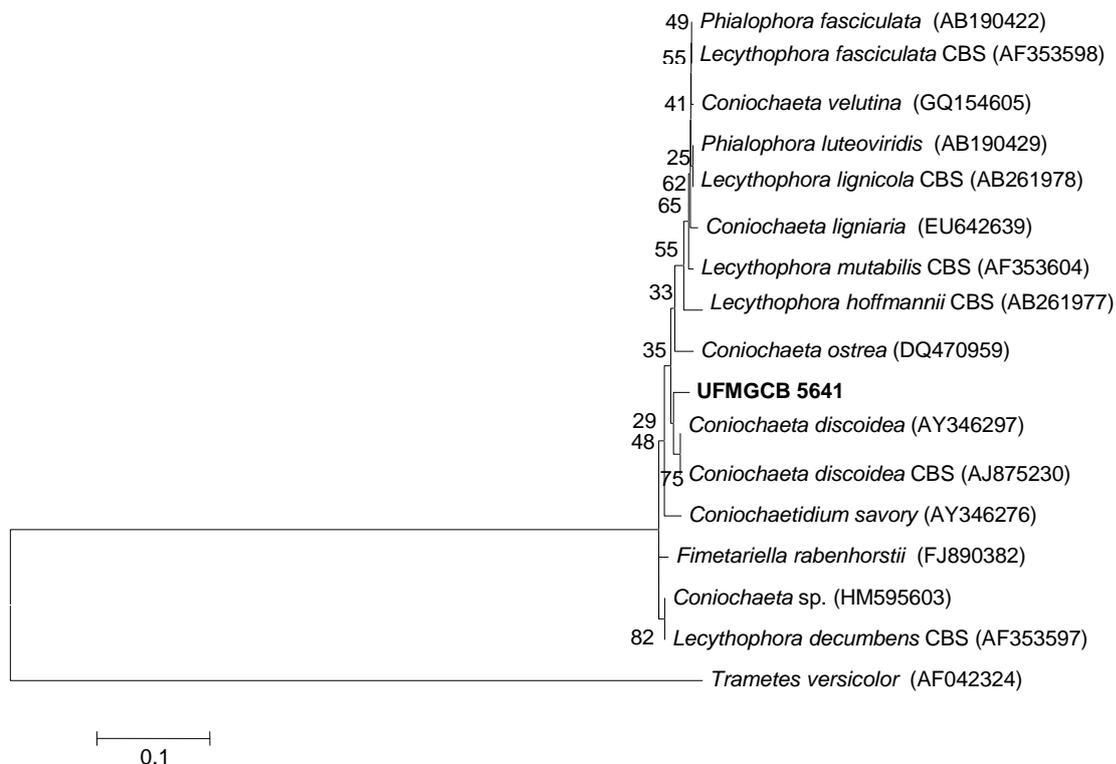


Figura 9 a, b, c e d: Árvores filogenéticas dos fungos filamentosos obtidos de exemplares adultos de *Stryphnodendron adstringens*. As árvores filogenéticas foram construídas baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA utilizando o método *Neighbour-joining*. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

O complexo *Diaporthe/Phomopsis* (teleomorfo/anamorfo) também foi predominante dentre os fungos obtidos de indivíduos adultos de *S. adstringens*, com 41 (27,9%) dos isolados ou nove morfotipos (Tabela 3). Os isolados UFMGCB 5040, 5099 e 5116 apresentaram sequências com 98, 91 e 88% de identidade com fungos pertencentes a este complexo. Estes táxons foram identificados como *Diaportheales*, pois apresentaram diferenças de 6 a 12% nucleotídeos quando comparados com as sequências das espécies mais próximas deste grupo de fungos. Já UFMGCB 5111 apresentou sequência com 92% de identidade em relação à *Diaporthe phaseolorum* (AF001028), diferindo em 8% desta; desta forma o isolado foi identificado como *Diaporthe* sp. O gênero *Phomopsis* foi representado pelos isolados 5060, 5029,

5041, 5101 e 5038, que exibiram sequências de 91 a 99% de identidade em comparação com sequências de espécies deste gênero depositadas no GenBank (Tabela 3).

O isolado UFMGCB 5641 apresentou sequência com 96% de identidade com *Coniochaeta discoidea* (AY346297) e diferindo em 4% de nucleotídeos com a sequência deste fungo e com *Coniochaeta* sp. (HM595603). Considerando isto, o isolado foi identificado em *Coniochaeta* sp. (Figura 9d). Espécies do gênero *Coniochaeta* são conhecidas como patógenos de plantas lenhosas e também possuem a capacidade de causar infecções oportunistas em humanos (DAMM et al., 2010).

O isolado UFMGCB 5123 foi identificado como *Nigrospora oryzae*, pois apresentou sequência com 97% de identidade e 3% de diferença com a sequência de *N. oryzae* (FJ496318). Os isolados UFMGCB 5083 e 5027, identificados como *Xylaria* sp., apresentaram sequências com 100 e 99% de identidade com dois isolados identificados como *Xylaria* sp. (códigos de acesso ao GenBank: FJ175174 e FJ487924) (Tabela 3).

UFMGCB 5128 apresentou sequência com 98% de identidade em relação a sequência de *Trichoderma* sp. (AY222347). Espécies do gênero *Trichoderma* são frequentemente isolados do solo e também como endofíticos de algumas espécies vegetais (SOUZA et al., 2004). Lin et al.(2007) obtiveram um isolado de *Trichoderma* associado à *Camptotheca acuminata* (Cornaceae), na China. Gazis & Chaverri (2010) isolaram *Trichoderma* e *Pestalotiopsis* como os gêneros mais abundantes associados a folhas de *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) no Peru.

Dezessete isolados foram identificados como pertencentes a classe *Dothideomycetes*. Os isolados UFMGCB 5025, 5053 e 5069 foram identificados em *Guignardia mangiferae*, *Massarina igniaria* e *Paraconiothyrium brasiliense*, respectivamente. Estes isolados apresentaram sequências com 100, 99 e 99% de identidade com *G. mangiferae* (HM222959), *M. igniaria* (EU715629) e *P. brasiliense* (AY642531) (Tabela 3), respectivamente.

UFMGCB 5130 apresentou sequência com 95% de identidade quando comparada a sequência de *Pseudofusicoccum stromaticum* (EF118042) e foi agrupado com espécies de *Pseudofusicoccum* com um valor de 96% de “bootstrap” não apresentando diferença em relação a estas espécies (Figura 9a). Considerando isto, o isolado UFMGCB 5130 foi identificado como *Pseudofusicoccum* sp.

Doze isolados foram identificados e incluídos no complexo *Preussia/Sporormiella*. Os isolados UFMGCB 5097, 5030, 5026, 5052, 5084, 5092 e 5082 apresentaram sequências com 93% a 99% de identidade em relação à sequências de espécies de *Preussia* e foram identificados como *Preussia* sp. (Tabela 3). A sequência do isolado UFMGCB 5050 apresentou 99% de identidade com a sequência de *Sporormiella* sp. (HQ130664), porém, diferiu em apenas 1% de nucleotídeos com a linhagem CBS 166.73 de *Sporormiella isomera* (AY943053). Considerando isto, o isolado UFMGCB 5050 foi identificado em *S. isomera* (Figura 9c). UFMGCB 5138 apresentou 98% de identidade em comparação com *Sporormiella* sp. (HQ130664), e 97% com *S. isomera* (EU551184) e *Botryosphaeria* sp. (HQ130693). Este isolado diferiu em 2% de *Sporormiella* sp., sendo identificado em nível de gênero (Figura 9a).

Os isolados UFMGCB 5164 e 5117 apresentaram sequências com 97% e 91% de identidade com as sequências das linhagens de *Cytospora* (DQ996039) e *C. acaciae* (DQ243804), respectivamente. Entretanto, os isolados foram nomeados como 'não identificado' devido ao baixo número de nucleotídeos sequenciados, 277 e 302, respectivamente (Tabela 3).

Os gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Cytospora*, *Diaporthe*, *Guignardia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Preussia*, *Pseudofusicoccum*, *Sordaria* e *Xylaria* ocorreram nos indivíduos jovens e adultos de *S. adstringens*. Alguns destes táxons como *Alternaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., e *Xylaria* spp. são comumente isolados como endofíticos (STROBEL & DAISY, 2003; ARNOLD, 2008).

No presente trabalho, espécies pertencentes aos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Guignardia*, *Nigrospora*, *Preussia* e *Xylaria*, referem-se ao maior número de isolamento, sendo comumente obtidos como endofíticos em diferentes plantas. Espécies de *Colletotrichum* estavam dentre os táxons dominantes obtidos de 29 plantas medicinais chinesas pertencentes a sete famílias: *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Polygonaceae*, *Lamiaceae*, *Rubiaceae* e *Solanaceae* (HUANG et al., 2009). *Guignardia mangiferae*, uma das espécies identificadas no presente trabalho, é considerada endofítica (WICKERT et al., 2009) e já foi relatada como espécie dominante em folhas de *Dendrobium nobile* (*Orchidaceae*) (YUAN et al., 2010), e em *Garcinia mangostana* e *G. parvifolia* (*Clusiaceae*) (SIN et al., 2010). Espécies de gênero *Phomopsis/Diaporthe* podem

ocorrer em associação com vegetais, como endofíticos e ou fitopatógenos. *Phomopsis* sp. já foi relatada como endofítico de *Trachycarpus fortunei* (TAYLOR et al., 1999), *P. perrottettii* e *T. guianensis* (ABREU et al., 2010), *Garcinia parvifolia* e *G. mangostana* (SIM et al., 2010) e *Hevea brasiliensis* (GAZIS & CHAVERRI, 2010).

Nigrospora oryzae já foi descrita como endofítico de *Zea mays* (milho - *Poaceae*) no Canadá (SAUNDERS & KOHN, 2008), de *Rosa hybrida* (rosa) na Colômbia (SALAZAR & GARCIA, 2005). *Nigrospora* sp. foi obtido como endofítico de *Eucalyptus globulus* (LUPO et al., 2001), *Eremanthus erythropappus* (MAGALHÃES et al., 2008), *Broussonetia papyrifera*, *Celtis occidentalis* e *Ligustrum lucidum*, (NOVAS & CARMARÁN, 2008), *Mangifera indica* (COSTA et al., 2010) e *Tylophora indica* (KUMAR et al., 2010). Espécies de *Xylariaceae* foram isoladas de folhas, hastes e raízes de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) e *Xylaria* sp. foi obtida em folhas, frutos e flores de *Malus domestica* (maçã) (CAMATTI-SARTORI et al., 2005) e em *Artemisia* (*Asteraceae*) (HUANG et al., 2009).

O gênero *Preussia* compreende espécies presentes no solo, madeira e plantas em decomposição (CAIN, 1961; AHMED & CAIN, 1972; ARENAL et al., 2004, 2005). Poucas espécies foram relatadas como endofíticos, entre elas, se destaca *P. mediterranea* que foi descrita como uma nova espécie deste gênero por Arenal et al. (2007) e obtida de plantas Mediterrâneas na Espanha. Associados a *S. adstringens*, neste trabalho, foram identificados *P. africana*, *P. pseudominima*, *P. isomera* e *Preussia* sp. perfazendo um total de 27 isolados.

Sporormiella também pertencente à classe *Dothideomycetes*, é considerado por alguns autores como um gênero similar a *Preussia* e, foi definido originalmente por incluir exclusivamente espécies coprófilas (CAIN, 1961; AHMED & CAIN, 1972). Porém, alguns estudos têm mostrado que não existe diferença quanto ao habitat e algumas características morfológicas, como a morfologia do ascoma. Portanto, alguns autores consideram mais apropriado tratá-las como sinônimo (VALLDOSERA & GUARRO, 1990; GUARRO et al., 1997; ARENAL et al., 2004, 2005). Neste trabalho, foram identificados dois morfotipos pertencentes a este táxon: *Sporormiella* sp. (com três isolados) e *S. isomera* (com dois isolados).

Além de espécies do gênero *Preussia*, relatos de espécies do gênero *Pseudofusicoccum* como endofíticos são escassos. A maioria dos relatos deste gênero estão relacionados a causa de patologias em plantações no Brasil e Venezuela. Como endofítico, Mohali et al. (2007) isolaram *P. stromaticum* associado

a *Eucalyptus* e *Acacia* na Venezuela. Esta espécie também foi obtida no presente trabalho, juntamente com isolados de *Pseudofusicoccum* sp. associados a folhas e cascas de *S. adstringens*.

Espécies pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Botryosphaeria*, *Coniochaeta*, *Fimetariella*, *Massarina*, *Muscodor*, *Paraconiothyrium* e *Trichoderma*, juntamente com a ordem *Pezizales* foram os isolados em menor número, no presente trabalho. Associado a *S. adstringens* foram obtidos apenas um isolado de fungo endofítico pertencente aos táxons citados. *Arthrobotrys* sp. foi isolado como endofítico de *Solanum cernuum* (*Solanaceae*) (VIEIRA, 2008). Mohali et al. (2007) isolaram *B. dothidea* do tecido sintomático e assintomático de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus* hibridizados, mostrando que além de endofítico esta espécie pode ser obtida como fitopatógeno.

De acordo com Damm et al. (2008) observando as sequências de DNA depositadas no GenBank, *P. brasiliense* foi descrito como endofítico de *Ginkgo biloba* e *Pinus tabulaeformis*, em folhas de *Picea glauca*, *Alliaria petiolata*, e em peixes marinhos (*Pennahia argentata*). Estes mesmos autores isolaram *P. brasiliense* de árvores de pêssego, nectarina e ameixa em duas áreas distintas no sul da África, e Abreu et al. (2010) obtiveram *P. brasiliense* como espécie dominante associado a caules e folhas de *Phoradendron perrottettii* (*Santalaceae*). *Muscodor vitigenus* já foi obtido por Daisy et al. (2002) como endofítico de *Paullinia paullinioides* (*Sapindaceae*), planta coletada no ecossistema Amazônico.

5.3 Diversidade da comunidade fúngica associada a *Stryphnodendron adstringens*

A abundância dos táxons de fungos endofíticos associados a *S. adstringens* variou de 0,31 a 20,76% (Tabela 4). Para realização destes cálculos foram utilizados 313 isolados de fungos endofíticos, pois 34 não puderam ser identificados pela metodologia utilizada, os quais foram excluídos da contagem total de isolamento.

Dentre os 42 táxons encontrados, *Phomopsis* sp., *Diaporthe phaseolorum*, *Diaporthales* sp. e *Guignardia camelliae* foram os mais abundantes, respectivamente. Entre os gêneros de fungos identificados, os gêneros *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Trichoderma*, *Alternaria* e *Phomopsis* são comumente encontrados como endofíticos (RODRIGUES & SAMUELS, 1999;

SURYANARAYANAN et al., 2002; SCHULZ & BOYLE, 2005; ARNOLD, 2008). No entanto, apenas *Phomopsis* sp. foi encontrado entre os mais abundantes (21,08%) em *S. adstringens*. Taylor et al. (1999) obtiveram *Phomopsis* spp. e *G. cingulata* como táxons dominantes associados com *Trachycarpus fortunei* (Arecaceae - China) e Xing et al. (2010) isolaram *Phomopsis* sp. como espécie predominante em raízes de *Sonneratia caseolaris* e *Diaporthe* sp. em caules de *S. hainanensis* (Lythraceae), na China.

Neste trabalho, *Guignardia camelliae* apresentou 7,34% de abundância. Xing et al. (2010) isolaram esta espécie de folhas de *S. caseolaris* com frequência de 32%. Quatorze táxons associados a *S. adstringens* apresentaram baixos valores de abundância (0,31%), os quais podem fazer parte da porção minoritária da comunidade de fungos endofíticos associados a *S. adstringens* (Tabela 4). Xu et al. (2008) obtiram nove táxons de fungos endofíticos distintos associados a *Dioscorea zingiberensis* (Dioscoreaceae) na China. Esses autores relatam que esse isolamento minoritário pode indicar a diversidade de fungos endofíticos associado com a planta hospedeira.

Uma das formas pela qual se pode mensurar diversidade de uma comunidade se dá pelo uso de índices de diversidade (MELO, 2008). O emprego de índices proporciona vantagens como combinar diferentes componentes de diversidade, expressar matematicamente os resultados, além da independência em relação ao esforço amostral. Neste trabalho, a diversidade de táxons associados a *S. adstringens* foi avaliada em termos de riqueza e equitabilidade por meio dos índices de Shannon e de Simpson, respectivamente.

O índice de Shannon (H') relaciona dois componentes de diversidade, a riqueza de espécies e a equitabilidade, atribuindo maior peso ao primeiro componente, de forma que, quanto maior for o valor do índice, maior a riqueza de espécies e quanto menor o valor do índice, menor a riqueza de espécies. Já o índice de Simpson indica a probabilidade de dois indivíduos, retirados ao acaso da comunidade, pertencer a espécies diferentes, atribuindo assim maior peso para a equitabilidade. Desta forma, os maiores valores deste índice indicam maior diversidade e ausência de dominância, e os menores valores indicam uma menor diversidade e presença de dominância.

Os valores atribuídos pelo índice de Shannon foram próximos. Para a comunidade de fungos endofíticos associada a plantas adultas de *S. adstringens* o

valor encontrado foi $H' = 2,79$ e para as plantas jovens $H' = 2,59$. Esta proximidade pode estar relacionada aos táxons identificados, 29 táxons estavam associados às plantas adultas, enquanto que 27 táxons estavam relacionados à comunidade fúngica obtida de plantas jovens de *S. adstringens* (Anexo 1).

O índice de Shannon foi calculado por Joshee et al. (2009) para comparar a comunidade de fungos endofíticos de folhas de *Dacrydium cupressinum*, *Prumnopitys ferruginea*, *Dacrycarpus dacrydioides*, *Podocarpus totara* (*Podocarpaceae*) e *Kunzea ericoides* (*Myrtaceae*). O índice revelou uma alta diversidade na comunidade de fungos endofíticos de *D. cupressinum* (3.52 e 3.96 no verão e inverno, respectivamente) e baixa diversidade em *K. ericoides* (2.57 e 2.40 no verão e inverno) quando comparado com outros hospedeiros, ao contrário do observado no presente trabalho, uma vez que os valores encontrados foram próximos.

Em relação ao índice de Simpson, os valores foram próximos, a comunidade de fungos endofíticos associada a *S. adstringens* adulto teve valor de 0,90, e a comunidade associada às plantas jovens 0,88. Estes valores próximos possivelmente indicam que poucos táxons exibiram dominância, e estes estavam distribuídos de maneira homogênea dentro da comunidade.

A abundância de cada táxon nos tecidos selecionados para o isolamento dos fungos endofíticos (folha e casca) foi calculada e os resultados apresentados na Tabela 5. De acordo com Yuan et al. (2009) existem diferenças na composição de espécies e frequência de endofíticos obtidos de diferentes tipos de tecidos de um hospedeiro. No presente trabalho, a abundância dos fungos endofíticos foi maior nas folhas em comparação com as cascas. Entretanto, alguns gêneros foram obtidos exclusivamente de um dos tecidos. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Arthrobotrys*, *Botryosphaeria*, *Coniochaeta*, *Muscodor*, *Paraconiothyrium*, *Sporormiella* e *Sordaria* foram isolados apenas das folhas de *S. adstringens*; por outro lado, *Cladosporium*, *Cytospora*, *Fimetariella*, *Massarina* e *Trichoderma* foram obtidos apenas de casca.

Tabela 4: Número de isolados e abundância (%) dos fungos endofíticos associados a indivíduos jovens e adultos de *Stryphnodendron adstringens*.

Espécie endofítica	<i>Stryphnodendron adstringens</i>		Abundância (%)
	Jovens	Adultos	
<i>Phomopsis</i> sp.	48	18	21,08
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	32	0	10,22
<i>Diaporthales</i> sp.	4	21	7,98
<i>Guignardia camelliae</i>	23	0	7,34
<i>Nigrospora oryzae</i>	2	12	4,47
<i>Preussia</i> sp.	0	14	4,47
<i>Xylaria hypoxylon</i>	13	0	4,15
<i>Xylaria</i> sp.	10	3	4,15
<i>Colletotrichum boninense</i>	7	2	2,87
<i>Neofusicoccum ribis</i>	9	0	2,87
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	6	3	2,87
<i>Guignardia mangiferae</i>	0	7	2,23
<i>Guignardia</i> sp.	7	0	2,23
<i>Preussia pseudominima</i>	1	6	2,23
<i>Diaporthe</i> sp.	3	2	1,59
<i>Cytospora</i> sp.	1	4	1,59
<i>Penicillium</i> sp.	2	3	1,59
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	4	1	1,59
<i>Preussia africana</i>	4	1	1,59
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3	1	1,27
<i>Alternaria alternata</i>	3	0	0,95
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3	0	0,95
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3	0	0,95
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	0	3	0,95

<i>Sordaria fimicola</i>	1	2	0,95
<i>Sporormiella</i> sp.	0	3	0,95
<i>Aspergillus ustus</i>	0	2	0,63
<i>Sporormiella isomera</i>	0	2	0,63
<i>Arthrobotrys</i> sp.	1	0	0,31
<i>Aspergillus flavipes</i>	1	0	0,31
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1	0	0,31
<i>Colletotrichum</i> sp.	1	0	0,31
<i>Coniochaeta</i> sp.	0	1	0,31
<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	0	1	0,31
<i>Glomerellaceae</i> sp.	0	1	0,31
<i>Massarina igniaria</i>	0	1	0,31
<i>Muscodor vitigenus</i>	1	0	0,31
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	0	1	0,31
<i>Pezizales</i> sp.	0	1	0,31
<i>Preussia isomera</i>	0	1	0,31
<i>Sordaria tomento-alba</i>	0	1	0,31
<i>Trichoderma</i> sp.	0	1	0,31
Total	194	119	100

Os índices de diversidade também foram calculados para verificar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos obtidos das folhas e cascas de *S. adstringens* (Anexo 2). Em relação ao índice de Shannon, o maior valor foi atribuído a comunidade de fungos endofíticos obtidos das folhas (2,98), indicando uma maior diversidade fúngica neste substrato. Enquanto que o menor valor foi atribuído a comunidade fúngica isolada de cascas (2,49). Na comunidade foliar de *S. adstringens* foram identificados 35 dos 42 táxons de fungos endofíticos identificados e, nas cascas 22 táxons. O índice de Simpson também foi utilizado para calcular a diversidade da comunidade fúngica dos substratos amostrados. O maior valor deste índice foi atribuído a comunidade fúngica das folhas (0,92) e o menor valor à comunidade fúngica isolada das cascas (0,86). Considerando que o índice de Simpson atribui maior peso para a equitabilidade e os valores atribuídos às duas comunidades foram próximos, sugere que as espécies tiveram uma distribuição homogênea entre as comunidades de fungos endofíticos obtidos das folhas e cascas de *S. adstringens*.

A similaridade entre as comunidades de fungos endofíticos associadas com indivíduos jovens e adultos e dos substratos amostrados em cada local de coleta foi estimada utilizando-se o coeficiente de Sorensen (Q_S) e o índice de Bray-Curtis (B). O coeficiente de Sorensen é utilizado para dados binários (presença ou ausência); atribui mais peso sobre as ocorrências comuns do que em desencontros, e utiliza valores entre 0 (nenhuma similaridade) e 1 (similaridade absoluta). Por meio do coeficiente de Sorensen, a comunidade fúngica obtida dos indivíduos adultos foi similar (0,5) em relação à obtida dos indivíduos jovens. A similaridade encontrada é oriunda do alto número de encontros (presença ou ausência de táxons) obtidos, uma vez que dos 42 táxons identificados nesse trabalho, 14 foram comuns aos indivíduos adultos e jovens. O mesmo pode ser observado comparando, por meio do coeficiente de Sorensen, a comunidade fúngica isolada das folhas e cascas, a qual apresentou similaridade de 0,52; compartilhando entre si 15 dos 42 táxons identificados.

O índice de Bray-Curtis (B) atribui maior peso a abundância das espécies, de forma que os valores mais próximos de 0 indicam que as comunidades não compartilham nenhuma espécie e que os valores mais próximos de 1 indicam que as comunidades compartilham todas as espécies com a mesma abundância. Em relação a este índice, a similaridade entre a comunidade fúngica de indivíduos

jovens e adultos foi de 0,26; a similaridade entre a comunidade das folhas e cascas foi de 0,42. Abreu et al. (2010) calcularam a similaridade da composição de espécies de fungos endofíticos, baseado em dados de presença e ausência, entre *P. perrottettii* (*Santalaceae*) e *T. guianensis* (*Anacardiaceae*), por meio do índice de similaridade de Jaccard (JI). Das 55 espécies utilizadas para o cálculo, 45 foram compartilhadas entre ambos hospedeiros e o valor atribuído ao índice foi 0,82, indicando uma significativa similaridade entre as comunidades das duas plantas hospedeiras.

Tabela 5: Número de isolados e abundância (%) dos fungos endofíticos obtidos de folhas e cascas de indivíduos jovens e adultos de *Stryphnodendron adstringens*.

Identificação	<i>Stryphnodendron adstringens</i>					
	Jovens		Adultos		Abundância (%)	
	Folha	Casca	Folha	Casca	Folha	Casca
<i>Alternaria alternata</i>	3	0	0	0	100	0
<i>Arthrotrys</i> sp.	1	0	0	0	100	0
<i>Aspergillus flavipes</i>	1	0	0	0	100	0
<i>Aspergillus ustus</i>	0	0	2	0	100	0
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1	0	0	0	100	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	3	0	0	0	100
<i>Colletotrichum boninense</i>	6	1	2	0	88,8	11,1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3	0	1	0	100	0
<i>Colletotrichum</i> sp.	1	0	0	0	100	0
<i>Coniochaeta</i> sp.	0	0	1	0	100	0
<i>Cytospora</i> sp.	0	1	0	4	0	100
<i>Diaporthales</i> sp.	2	2	10	11	48	52
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	25	7	0	0	78,1	21,9
<i>Diaporthe</i> sp.	2	1	1	1	60	40
<i>Fimetiariella rabenhorstii</i>	0	0	0	1	0	100
<i>Glomerellaceae</i> sp.	0	0	1	0	100	0
<i>Guignardia mangiferae</i>	0	0	7	0	100	0
<i>Guignardia camelliae</i>	23	0	0	0	100	0
<i>Guignardia</i> sp.	6	1	0	0	85,7	14,2
<i>Massarina igniaria</i>	0	0	0	1	0	100
<i>Muscodor vitigenus</i>	1	0	0	0	100	0
<i>Neofusicoccum ribis</i>	6	3	0	0	66,6	33,3
<i>Nigrospora oryzae</i>	2	0	11	1	92,8	7,14

<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	0	0	1	0	100	0
<i>Penicillium</i> sp.	0	2	1	2	20	80
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	3	1	0	1	60	40
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	2	0	0	33,3	66,6
<i>Pezizales</i> sp.	0	0	0	1	0	100
<i>Phomopsis</i> sp.	28	20	11	7	61	38,8
<i>Preussia africana</i>	4	0	1	0	100	0
<i>Preussia isomera</i>	0	0	1	0	100	0
<i>Preussia pseudominima</i>	1	0	6	0	100	0
<i>Preussia</i> sp.	0	0	13	1	93	7,15
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	0	0	0	3	0	100
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	5	1	1	2	66,6	33,3
<i>Sordaria fimicola</i>	1	0	2	0	100	0
<i>Sordaria tomento-alba</i>	0	0	1	0	100	0
<i>Sporormiella isomera</i>	0	0	2	0	100	0
<i>Sporormiella</i> sp.	0	0	3	0	100	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0	1	0	100
<i>Xylaria hypoxylon</i>	11	2	0	0	84,6	15,3
<i>Xylaria</i> sp.	8	2	2	1	76,9	23
Total	145	49	81	38	---	---

5. 4 Cultivos do fungos e preparo dos extratos

Um total de 347 extratos etanólicos dos fungos endofíticos e 60 extratos vegetais (30 de folhas e 30 de cascas de *S. adstringens*) foram produzidos para detecção de metabólitos bioativos. Em ensaios de triagem, diferentes técnicas podem ser utilizadas para a produção dos extratos brutos, o que pode influenciar os tipos de metabólitos obtidos (VIEIRA, 2008).

No presente trabalho, os extratos dos fungos foram obtidos pelo cultivo em meio de cultura sólido, pois estes substratos geralmente fornecem um ambiente favorável a produção de diferentes metabólitos pelos microrganismos, principalmente aos fungos filamentosos, devido ao crescimento de suas hifas, que tem a capacidade de crescer e penetrar no meio de cultura (PANDEY, 2008). Além disso, a 'SSF ("Solid State Fermentation") oferece baixa taxa de contaminação (devido à baixa umidade do meio), menor necessidade de espaço, e crescimento celular em condições mais próximas aos dos habitats naturais (SANTOS, 2007).

Outro importante fator a ser observado é o solvente utilizado na produção do extrato. Neste trabalho, foi utilizado o etanol por ser menos tóxico em comparação com outros solventes (metanol, acetato de etila, hexano, diclorometano, entre outros), por possuir uma faixa de polaridade capaz de ligar moléculas de baixo e médio peso molecular e pelo satisfatório poder de penetração em meios de cultura sólido. Na literatura existem relatos de vários solventes utilizados na extração de metabólitos secundários: etanol (HERZOG-SOARES et al., 2002), diclorometano (SETTE et al., 2006), *n*-butanol (XU et al., 2008), acetato de etila (CAMPOS et al., 2008) e metanol (VAZ et al., 2009).

Além do solvente e da técnica utilizadas no processo de extração, existem outros fatores relacionados às condições de cultivo dos microrganismos que influenciam na obtenção de metabólitos bioativos. Fatores como a composição do meio de cultura, pH, umidade e tempo de crescimento das culturas podem resultar em diferenças significativas na produção destes metabólitos (VIEIRA, 2008). No presente trabalho, a escolha da técnica, do solvente, bem como dos fatores mencionados, foram eficientes para a realização dos ensaios de triagem, uma vez que diminuiu o tempo necessário para a extração, propiciando economia de meio de cultura e de outros reagentes utilizados no processo. Além disso, as quantidades de

extrato obtidas variou de 1,3 a 14,36 mg, o que foi suficiente para a realização de todos os ensaios biológicos.

5.5 Ensaio Biológicos

Do total de extratos produzidos a partir de fungos endofíticos obtidos de *S. adstringens*, 16 (4,6%) extratos foram considerados promissores ou ativos para pelo menos um dos alvos nos ensaios biológicos realizados. Dentre estes, 13 extratos (81,3%) foram considerados promissores nos ensaios antifúngicos. Na determinação da atividade contra células tumorais humanas, três extratos (18,7%) foram ativos. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* (Figura 10a).

O número de isolamento de fungos filamentosos endofíticos pode ter sido influenciada por fatores como, idade dos indivíduos coletados, distribuição geográfica, a umidade relativa do ambiente, entre outros (PETRINI et al., 1992; CARROL, 1995; RODRIGUES & PETRINI, 1997; SAIKKONEM et al., 1998; STROBEL, 2003), sendo a idade o fator mais prevalente. Estes mesmos fatores, principalmente a idade dos indivíduos coletados, podem ter influenciado também na atividade biológica dos extratos fúngicos produzidos. Na Figura 10b é possível notar que do total de extratos ativos e promissores, sete (44%) foram produzidos a partir de fungos endofíticos obtidos de indivíduos jovens; e nove (56%) de fungos obtidos de indivíduos adultos.

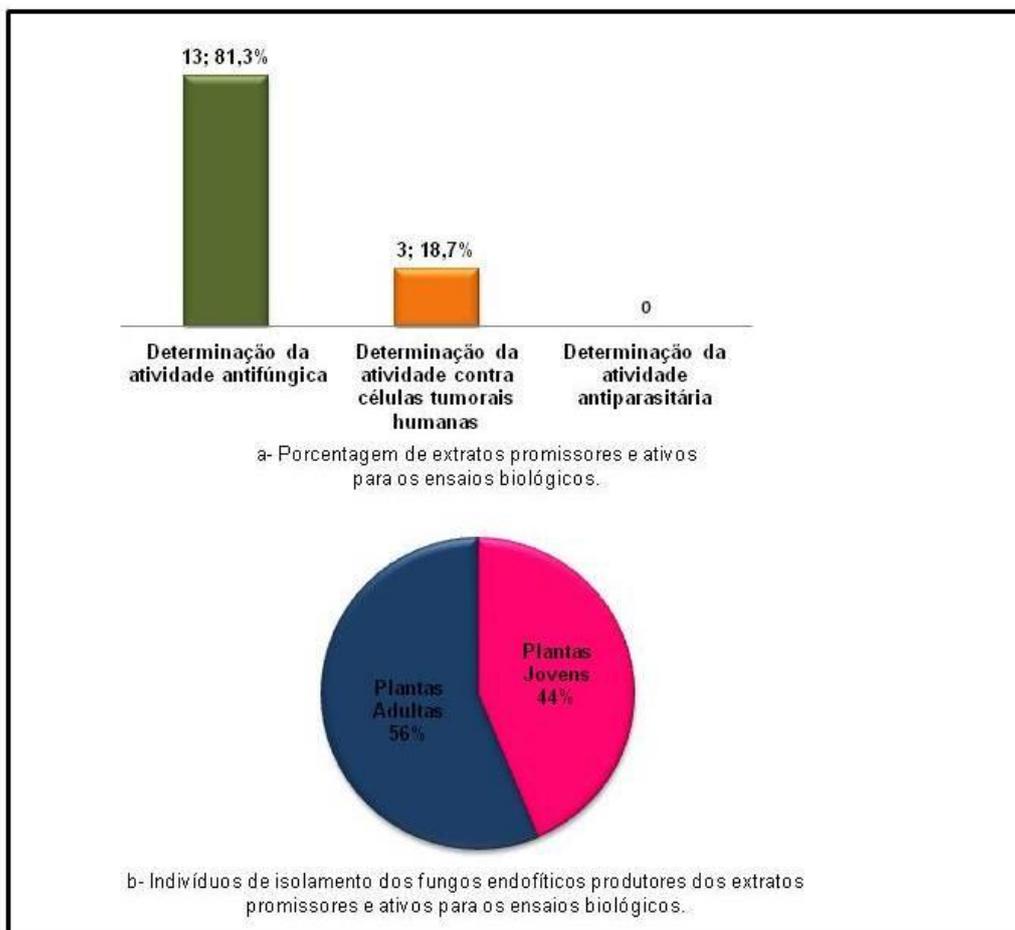


Figura 10: Porcentagem de extratos de fungos endofíticos isolados de *Stryphnodendron adstringens* considerados ativos e promissores nos ensaios biológicos de acordo com o indivíduo coletado.

Como já mencionado anteriormente, o *S. adstringens* é amplamente utilizado pela população brasileira para fins medicinais e seu uso está intimamente associado às conhecidas propriedades apresentadas pela casca. No presente trabalho, 10 (62%) dos extratos de fungos endofíticos, ativos ou promissores, foram obtidos das folhas, e seis (38%) das cascas (Figura 11). Apesar do número de isolados de fungos endofíticos obtidos a partir das cascas ter sido menor, como esta apresenta atividade antimicrobiana, estes isolados merecem especial atenção, uma vez que muitas das propriedades medicinais que eram atribuídas as plantas, podem estar na realidade, relacionadas aos endófitos que a colonizam (STROBEL & DAISY, 2003).

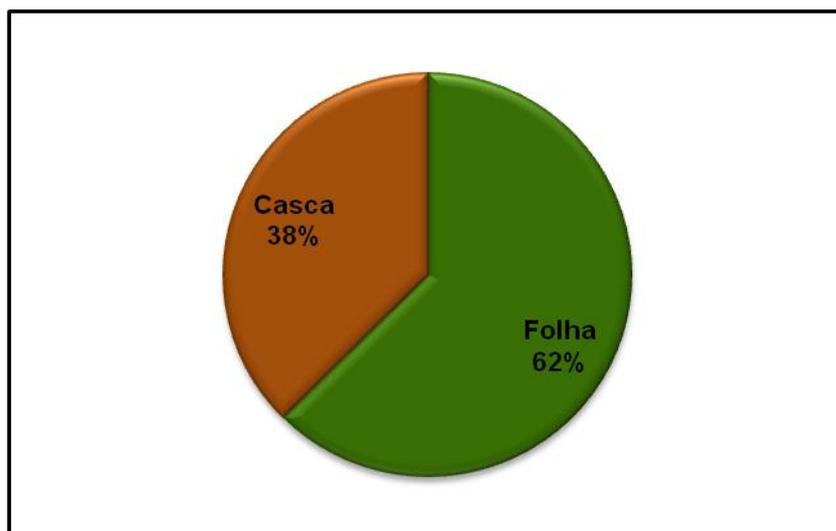


Figura 11: Tecido de isolamento dos fungos endofíticos classificados como promissores e ativos associados à *Stryphnodendron adstringens*.

5.5.1 Determinação da atividade antifúngica

De acordo com Scorzoni et al. (2007), os métodos utilizados para testes antifúngicos são classificados em três principais grupos: difusão, diluição e bioautografia. No presente trabalho, a avaliação antifúngica dos extratos, produzidos a partir dos fungos endofíticos e dos exemplares de *S. adstringens*, foi realizada pelo método de microdiluição em placa, de acordo com a metodologia descrita pelo Documento 7.1 AFST-EUCAST 2002, com modificações.

Do total de 347 extratos dos fungos endofíticos testados contra as linhagens de *C. albicans* alvo, pelo menos um foi promissor ou medianamente promissor em ambas as concentrações utilizadas (Tabela 6). Houve um aumento considerável no número de extratos promissores (13 extratos) e medianamente promissores (197 extratos) na concentração de 250 µg/mL, quando comparada a com a concentração de 100 µg/mL. Entretanto, observou-se também uma diminuição no valor de inibição de alguns extratos nesta concentração como observado no Anexo 3. De acordo com Vieira (2008) é possível que ocorra perdas da atividade de alguns extratos em função de fatores como alterações físico-químicas imperceptíveis durante o processo de armazenamento dos extratos; ou mesmo devido à instabilidade da(s) substância(s) ativa(s) presentes nos extratos brutos, que podem ter sido degradadas ao longo do processo.

Dos 200 extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos isolados de plantas jovens, 149 (74,5%) foram de fungos endofíticos isolados de folhas. Destes, quando testados a 100 µg/mL, apenas dois extratos (UFMGCB 4624 e 4636) foram medianamente promissores para *C. albicans* 2.1A. Cinquenta e um (25,5%) extratos foram produzidos a partir de fungos endofíticos obtidos de cascas, e apenas o extrato do fungo UFMGCB 4688 foi medianamente promissor para *C. albicans* 2.1A.

Três extratos de fungos obtidos das folhas, testados na concentração de 250 µg/mL, exibiram valores de inibição de 74% (UFMGCB 4693), 71% (UFMGCB 4624) e 70% (UFMGCB 4596) sobre *C. albicans* ATCC 18804, *C. albicans* 2.1 A, *C. albicans* 15.3C, respectivamente. Cento e vinte e quatro extratos de fungos endofíticos obtidos das folhas foram medianamente promissores, sendo 18 contra a linhagem ATCC 18804, 46 contra a linhagem 2.1 A e 60 contra a linhagem 15.3C.

Entre os extratos produzidos de fungos isolados das cascas, somente dois extratos (UFMGCB 4614 e 4675) foram promissores contra a linhagem de *C. albicans* 2.1A. Cinquenta e cinco extratos foram medianamente promissores quanto a capacidade de inibir o crescimento das linhagens de *C. albicans* testadas, 10 contra a linhagem ATCC 18804, 18 contra a linhagem 2.1 A e 27 contra a linhagem 15.3C.

Tabela 6: Classificação dos extratos fúngicos em relação ao nível de atividade antifúngica apresentada.

Hospedeiro	Nº de extratos	Distribuição de extratos fúngicos em diferentes níveis de atividade antifúngica ($\mu\text{g/mL}$)					
		Promissor*		Medianamente promissor**		Não promissor***	
		100	250	100	250	100	250
Plantas Jovens	200	0	5	3	113	197	82
Plantas Adultas	147	1	8	15	84	131	55
Total	347	1 (0,3%)	13 (3,7%)	18 (5,2%)	197 (56,8%)	328 (94,5%)	137 (39,5%)

*Valor de inibição maior ou igual que 70%;

** Valor de inibição entre 50 e 69%;

*** Valor de inibição menor ou igual que 49%.

Dos 147 extratos fúngicos produzidos a partir dos isolados obtidos dos indivíduos adultos, 86 (58,5%) foram de fungos isolados de folhas. Quando testados a 100 µg/mL, apenas um extrato produzido a partir do isolado UFMGCB 5031 foi classificado como promissor na capacidade de inibir o crescimento das três linhagens de *C. albicans* alvo. Dez extratos foram classificados como medianamente promissores frente a linhagem 2.1A. Sessenta e um (41,5%) extratos foram produzidos a partir de fungos endofíticos isolados de cascas, e apenas cinco foram medianamente promissores na capacidade de inibir a linhagem 2.1A (UFMGCB 5056, 5089, 5116, 5128 e 5143).

Na concentração de 250 µg/mL, dos extratos produzidos a partir de fungos obtidos das folhas, seis apresentaram valores de inibição considerados promissores, um para a linhagem ATCC 18804 (extrato do fungo UFMGCB 5031), três para a linhagem 2.1A (extratos dos fungos UFMGCB 5031, 5061 e 5098) e dois para a linhagem 15.3C (extratos dos fungos UFMGC 5022 e 5024). Destes fungos, 75 extratos foram considerados medianamente promissores frente as linhagens de *C. albicans* testadas (oito contra a linhagem ATCC 18804, 51 contra a linhagem 2.1 A e 16 contra a linhagem 15.3C).

Dentre aqueles produzidos a partir de fungos obtidos das cascas, três extratos (UFMGC 5056, 5081 e 5089) foram classificados como promissores para a linhagem 2.1A. Cinquenta e um extratos foram medianamente promissores para as três linhagens, sendo cinco para a linhagem ATCC 18804, 32 para a linhagem 2.1 A e 14 para a linhagem 15.3C.

Na concentração de 100 µg/mL somente um extrato, produzido a partir do fungo UFMGCB 5031, foi considerado promissor na capacidade de inibir o crescimento das três linhagens alvo, com valores de inibição entre 76 e 94%. Os demais extratos foram capazes de inibir apenas uma das linhagens de *C. albicans*.

Na concentração de 250 µg/mL, nenhum extrato foi promissor na capacidade de inibir o crescimento das três linhagens de *C. albicans*. Porém, 22 extratos fúngicos foram considerados medianamente promissores frente as três linhagens de *C. albicans*. Destes extratos, 17 foram obtidos a partir de isolados de fungos endofíticos provenientes de indivíduos jovens e cinco obtidos a partir de isolados de indivíduos adultos de *S. adstringens*. Para duas linhagens de *C. albicans*, 51 extratos (26 produzidos a partir de fungos associados a plantas jovens e 25 associados a plantas adultas), foram medianamente promissores. Todavia, alguns

extratos apresentaram diferentes percentuais de inibição sendo considerados promissores para uma linhagem e medianamente promissores para outra na mesma concentração testada. Isto pode ser observado na triagem realizada na concentração de 250 µg/mL nos testes feitos com o extrato produzido a partir do fungo UFMGCB 4675. Este extrato apresentou capacidade de inibir o crescimento da linhagem de *C. albicans* 2.1A em 87%, sendo classificado como promissor, bem como em inibir o crescimento das linhagens ATCC 18804 e 15.3C em 57% e 66%, respectivamente, portanto sendo classificado como medianamente promissor para estas linhagens.

Os isolados considerados promissores na determinação da atividade antifúngica foram identificados como pertencentes a nove táxons (Tabela 7). Os fungos endofíticos UFMGCB 4624 (promissor contra a linhagem de *C. albicans* 2.1A) e os isolados UFMGCB 4596 e 5024 (promissores contra a linhagem 15.3C) foram identificados como *Colletotrichum boninense*. Todos os três táxons foram obtidos a partir da folha de *S. adstringens*. Vários trabalhos citam que espécies do gênero *Colletotrichum* estão relacionadas com atividades biológicas. *Colletotrichum* sp., endofítico de *P. longiflora* e *S.cogens*, (plantas tóxicas da Amazônia), mostrou atividade antibacteriana frente a *Bacillus* sp., *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus* (SOUZA et al., 2004). *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico de *Cryptocarya mandiocana*, planta típica de regiões de Cerrado, apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (INÁCIO et al., 2006). *Colletotrichum* sp., endofítico de *Artemisia annua*, erva chinesa tradicional, apresentou atividade frente a fungos patógenos humanos, vegetais e bactérias (GUO et al., 2008); *C. truncatum*, endofítico da planta medicinal *Tylophora indica*, foi ativo contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *F. oxysporum* (KUMAR et al., 2010). Substâncias de interesse para o homem, tais como aspergilomasmina A e B (BALLIO et al., 1969), gloeosporona (MEYER et al., 1987) e ferricrocina (OHRA et al., 1995) também foram purificadas a partir de extratos obtidos de *C. gloeosporioides*.

O extrato do fungo UFMGCB 5022, identificado como pertencente a família *Glomerellaceae*, foi promissor contra *C. albicans* 15.3C. Isolados de *Glomerella* sp. (estádio teleomorfo de *Colletotrichum*), associados à *Coffea arabica* e *C. robusta* apresentaram atividade frente a *S. choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* STEC, *E. coli* EIEC, *E. coli* ETEC e *E. coli* EPEC (SETTE et al., 2006). Guimaraes et

al. (2008) isolaram cinco linhagens de *Glomerella cingulata*, endofíticas de *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, com atividade frente a *C. albicans*, o que mostra o potencial antifúngico de espécies pertencentes a família *Glomerellaceae*, como observado no presente trabalho.

O extrato do fungo UFMGCB 5056, identificado como *Penicillium* sp. 1, foi considerado promissor contra a linhagem 2.1A de *C. albicans*. Wang et al. (2008) isolaram, a partir do extrato do fungo endofítico *Penicillium* sp., associado a folhas de *Hopea hainanensis*, na China, seis metabólitos identificados como monometilsulocrina, ácido rizoctônico, asperfumoide, fisciona, 7-8-dimetil-issoaloxazina e ácido 3-5 dicloro-p-anisico. Todos estes seis metabólitos foram testados quanto às suas atividades antifúngicas e citotóxicas. O ácido rizoctônico, asperfumóide, fisciona e ácido 3-5 dicloro-p-anisico inibiram o crescimento de *C. albicans* com CIMs de 40, 20, 50 e 15 µg/mL, respectivamente. O ácido 3-5 dicloro-p-anisico foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger* (CIM 40 µg/mL). A atividade citotóxica foi avaliada frente às linhagens tumorais humanas HepG2 (fígado) e KB (nasofaringe epidermóide). Nestes testes, a monometilsulocrina, ácido rizoctônico, asperfumoide e ácido 3-5 dicloro-p-anisico exibiram atividade citotóxica contra KB (IC₅₀ 30, 20, 20, 5 µg/mL) e contra Hepg2 (IC₅₀ 30, 25, 15, 10 µg/mL). O fungo endofítico *Penicillium* sp. obtido de *Garcinia* foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, e o isolado *P. paxilli* foi capaz de inibir *Microsporium gypseum* (PHONGPAICHIT et al., 2006).

Os extratos dos fungos *Pestalotiopsis clavispora* UFMGCB 4614, e *Pestalotiopsis* sp. UFMGCB 4675 foram promissores contra *C. albicans* 2.1A na concentração de 250 µg/mL. São inúmeros os relatos de substâncias bioativas obtidas de algumas espécies de *Pestalotiopsis*, como por exemplo, o taxol (um importante quimioterápico utilizado no tratamento de câncer); pestacina e isopestacina, produzidos por *P. microspora* isolados de *Taxus wallichiana* e *Terminalia morobensis* (METZ et al., 2000; TAN & ZOU, 2001; STROBEL, 2003); o pestalosídeo, um beta-glicosídeo aromático com atividade antifúngica, produzido também por *P. microspora* isolado de *Torreya taxifolia* (STROBEL et al., 2004); pestalachlorides A–C isolado do endofítico *P. adusta* (LI et al., 2008); pestalofones A–E (1–5), derivados de ciclohexanonas, isolados do endofítico *Pestalotiopsis fici* (LIU et al., 2009). Esses e outros relatos mostram o potencial biotecnológico de espécies de *Pestalotiopsis*.

O fungo *Phomopsis* sp. 2 UFMGCB 5061 produziu um extrato promissor contra *C. albicans* 2.1A. Lin et al. (2007) verificaram atividade em 33,3% dos isolados endofíticos de *Phomopsis* sp. associados a *Camptotheca acuminata*. Guimarães et al. (2008) obtiveram um isolado de *Phomopsis* sp. e um de *P. longicolla*, endofíticos de *Viguiera arenaria* (*Asteraceae*), com capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans*, com halos de inibição de 14 e 14,7 mm; respectivamente. Espécies de *Phomopsis* também foram relatadas como produtores de metabólitos bioativos, como fomopsicalasina obtida de uma cultura de *Phomopsis* sp. (endofítico de *Salix gracilostyla*), o qual foi ativo contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. gallinarum* e *C. albicans*.

O extrato de *Guignardia mangiferae* UFMGCB 5098 foi promissor contra a linhagem 2.1A de *C. albicans*. *Guignardia mangiferae*, endofítico de *Viguiera arenaria*, apresentou atividade contra *C. albicans* (GUIMARÃES et al., 2008). Outras espécies deste gênero também foram relatadas com atividade frente bactérias de interesse clínico. *Guignardia* sp., endofítico de *Coffea arabica* e *C. robusta*, apresentou atividade contra *S. choleraesuis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* EPEC (SETTE et al., 2006); *G. vaccinii*, endofíticos de *Garcinia mangostana* e *Garcinia parvifolia*, apresentaram atividade frente *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *Streptococcus faecalis* (SIM et al., 2010).

Tabela 7: Isolados de fungos endofíticos obtidos de *Stryphnodendron adstringens* considerados promissores para as linhagens alvo de *Candida albicans*.

Extrato UFMGCB*	Identificação	Porcentagem de Inibição					
		<i>Candida albicans</i> ATCC 18804		<i>Candida albicans</i> 2.1A		<i>Candida albicans</i> 15.3C	
		100 (ug/mL)	250 (ug/mL)	100 (ug/mL)	250 (ug/mL)	100 (ug/mL)	250 (ug/mL)
4596	<i>Colletotrichum boninense</i>	0	0	0	0	0	70
4624	<i>C. boninense</i>	0	0	0	71	0	0
5024	<i>C. boninense</i>	0	0	0	0	0	70
5022	<i>Glomerellaceae</i>	0	0	0	0	0	74
5098	<i>Guignardia mangiferae</i>	0	0	0	72	0	0
4693	<i>Nigrospora oryzae</i>	0	74	0	0	0	0
5031	<i>N. oryzae</i>	92	89	94	97	76	0
5081	<i>N. oryzae</i>	0	0	0	70	0	0
5056	<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	70	0	0
4675	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	0	0	87	0	0
4614	<i>P. clavispora</i>	0	0	0	72	0	0
5061	<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	0	70	0	0
5089	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	0	0	0	73	0	0

*UFMGCB: Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os fungos UFMGCB 4693, 5031 e 5081 foram identificados como *Nigrospora oryzae*. Destes, o extrato produzido a partir de UFMGCB 5031, foi o único promissor na concentração de 100 µg/mL frente as três linhagens oportunistas de *C. albicans*. Contudo, na concentração de 250 µg/mL este mesmo extrato foi promissor apenas contra as linhagens ATCC 18804 e 2.1A. Já os fungos UFMGCB 4693 e 5081 apresentaram 74 e 70% de inibição contra as linhagens ATCC 18804 e 2.1A, respectivamente. Algumas substâncias já foram isoladas de espécies do gênero *Nigrospora*: nigrosporna A e B produzido por *N. oryzae* e ativo contra *Bacillus subtilis* (TANAKA et al., 1997); fomalactona produzida por *N. sphaerica* e ativa contra o fitopatógeno *Phytophthora infestans* (KIM et al., 2001). Soluções aquosas de extratos orgânicos de *N. oryzae* inibiram a germinação de esporos e crescimento do micélio de *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. lateritium* e *Botrytis cinerea* (SZEWCZUK et al., 1991).

O extrato do fungo *Pseudofusicoccum* sp. UFMGCB 5089 foi promissor contra *C. albicans* 2.1A, na concentração de 250 µg/mL. Na literatura são escassos os trabalhos que relatam atividade biológica de isolados de *Pseudofusicoccum* como endofíticos. O resultado obtido neste trabalho mostra a capacidade de fungos deste gênero em produzir extratos com atividade biológica e a importância em realizar pesquisas com este fim.

Trinta e seis táxons foram classificados como medianamente promissores quanto à capacidade de inibir o crescimento de pelo menos uma das linhagens de *C. albicans* (Figura 12). Estes extratos apresentaram valores de inibição entre 50 e 69%, e podem ser considerados como promissores para novos estudos de bioprospecção com diferentes microrganismos alvo, a fim de isolar e caracterizar as substâncias bioativas.

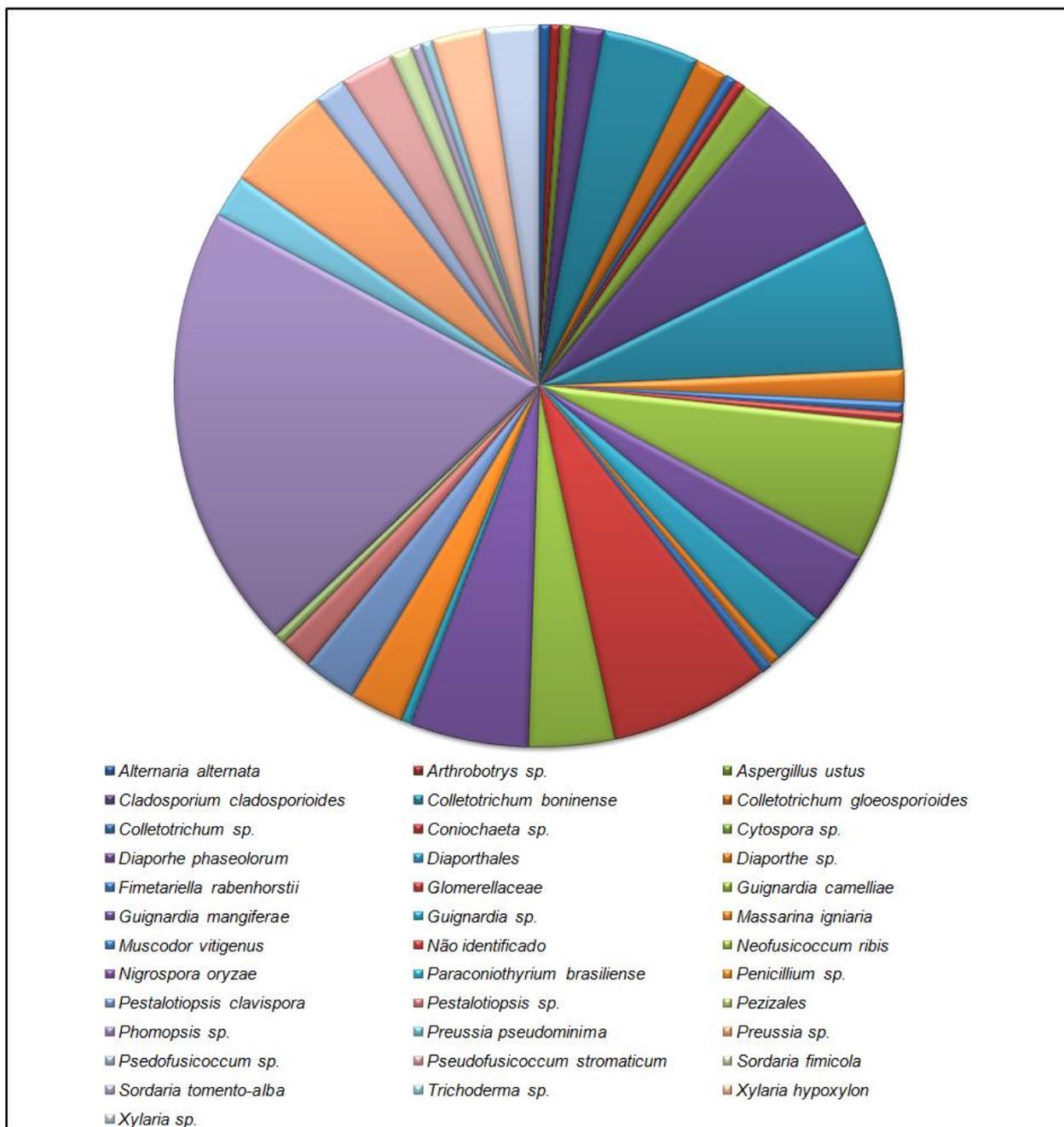


Figura 12: Táxons identificados considerados medianamente promissores para alguma linhagem alvo de *Candida albicans*.

Além dos extratos produzidos a partir dos fungos endófitos, 60 extratos vegetais foram testados (30 produzidos a partir das folhas e 30 das cascas de *S. adstringens*). Todos os extratos produzidos das cascas foram promissores e/ou medianamente promissores, quanto a capacidade de inibir o crescimento de pelo menos uma das linhagens alvo, em uma das duas concentrações testadas. Já os extratos produzidos a partir das folhas foram classificados como não promissores,

por apresentarem valores de inibição mais baixos, com variação de 0 a 27% para 100 µg/mL e de 0 a 36% para a concentração de 250 µg/mL.

Em resumo, a triagem realizada com os extratos na concentração de 250 µg/mL apresentou um número maior de extratos promissores e medianamente promissores em comparação com aquela realizada a 100 µg/mL. Scorzoni et al. (2007) relataram que até o momento nos testes de suscetibilidade realizados para determinação de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima de diferentes extratos de vegetais, são utilizadas concentrações a partir de 250 µg/mL, estas são consideradas relevantes nos experimentos que visam a busca de substâncias com atividade terapêuticas.

5.5.2 Determinação da atividade contra células tumorais humanas

O ensaio de toxicidade de células tumorais foi realizado contra as linhagens tumorais MCF-7 (mama) e TK-10 (renal). No ensaio realizado com a linhagem MCF-7 (mama), cinco extratos ainda não foram testados. Dentre os ativos, o extrato da espécie *Diaporthe phaseolorum* UFMGCB 4769 foi ativo contra as linhagens MCF-7 e TK-10, e UFMGCB 4783, ativo contra TK-10. *Diaporthe phaseolorum* UFMGCB 4769, obtido da casca do *S. adstringens*, foi o único que apresentou atividade contra as duas linhagens tumorais com alta porcentagem de inibição (92% para MCF-7 e 100% para TK-10). Os isolados de *D. phaseolorum* identificados neste trabalho apresentaram atividade somente frente às células tumorais. Porém, existem relatos de endofíticos desta espécie com capacidade de inibição de leveduras de importância médica, como *C. albicans* (GUIMARÃES et al., 2008).

O fungo *Xylaria* sp. 1 - UFMGCB 5096 foi ativo contra a linhagem MCF-7. Alguns trabalhos indicam que espécies do gênero *Xylaria* podem ser produtoras de diferentes metabólitos secundários bioativos, como as citocalasinas, com atividade antibiótica e antitumoral, porém, com toxicidade celular (STROBEL, 2003; SOUZA et al., 2004). Os metabólitos amino cumarina e 7-amino-4-metilcumarina, produzidas por um endofítico de *Xylaria* isolado de *Ginkgo biloba*, apresentaram atividades contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Aermonas hydrophila*, *Yersinia* sp., *Shigella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* e *C. albicans* (SALEEM et al., 2009). *Xylaria* sp. isolada de *P. longiflora* e *S.cogens* apresentaram fraca ação antibiótica contra *Bacillus* sp. (SOUZA et al., 2004). Os metabólitos ácido

2-hexilideno-3-metilbutanodióico, citocalasina D, 7-declorogriseofulvina, citocalasina B e griseofulvina, foram isolados de *Xylaria* sp. (endofítico de *Palicourea marcgravii*), sendo os dois primeiros ativos frente às linhagens *C. cladosporioides* e *C. spahaerospermum* (CAFÊU et al., 2005). Estes resultados mostram que fungos deste gênero podem ser fontes de novas substâncias bioativas.

5.5.3 Determinação da atividade antiparasitária

No ensaio realizado com a forma amastigota *like* de *L. amazonensis* foram testados 327 (80,3%) dos 407 extratos. Destes, nenhum extrato produzido a partir de fungos endofíticos ou vegetal foi capaz de inibir a proliferação das células em pelo menos 70%. Os valores de inibição dos extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos obtidos de indivíduos jovens apresentaram uma média de 12,73%, e os extratos produzidos a partir das folhas e cascas de *S. adstringens* apresentaram uma média de 9%. Já a média dos valores de inibição dos extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos isolados de indivíduos adultos foi de 17%. Nenhum extrato produzido a partir das folhas e cascas de *S. adstringens* adulto foi testado até o momento.

6 CONCLUSÃO

No Brasil é frequente a utilização de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças e muitas espécies vegetais endêmicas de ecossistemas brasileiros abrigam uma elevada riqueza de fungos endofíticos produtores de metabólitos. Dessa forma, apesar deste trabalho representar um estudo inicial sobre a riqueza e bioprospecção da micota endofítica associada a *S. adstringens*, é possível concluir que:

- A abundância de isolamento de diferentes espécies, gêneros, famílias e ordens de fungos endofíticos, assim como a capacidade destes microrganismos de produzir metabólitos com atividades antifúngica, citotóxica e antiparasitária podem ter sido influenciadas por diferentes fatores, dentre eles a idade e o tipo de tecidos das plantas hospedeiras;
- O total de isolados de fungos endofíticos obtido das folhas foi maior do que o obtido das cascas de *S. adstringens*, o que pode ter sido influenciado pelo teor de tanino encontrado na casca;
- Houve uma baixa dominância dentro da comunidade de endófitos de *S. adstringens*, uma vez que os valores encontrados utilizando o índice de Simpson para as comunidades fúngicas associadas aos indivíduos adultos e jovens foram próximos.
- O sequenciamento da região ITS da subunidade maior do gene do rRNA foi útil para a identificação dos fungos endofíticos associados a *S. adstringens*. Esta técnica permitiu a identificação a nível de espécie ou gênero da maioria dos fungos endofíticos isolados, independente das características morfológicas dos mesmos.
- Como alguns morfotipos não puderam ser identificados pelas técnicas utilizadas nesse trabalho, novos procedimentos deverão ser adotados a fim de se obter suas identificações em nível de espécie;

- Os fungos filamentosos cujos extratos foram considerados promissores ou ativos nos ensaios biológicos podem ser considerados potenciais candidatos a estudos de isolamento e caracterização dos metabólitos bioativos;

- Os extratos considerados medianamente promissores na determinação da atividade antifúngica podem ser considerados como promissores para novos estudos de bioprospecção frente a outros microrganismos alvo, a fim de isolar e caracterizar as substâncias bioativas;

- Por fim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que as plantas medicinais brasileiras podem representar um rico reservatório de fungos endofíticos produtores de metabólitos bioativos, os quais podem conter moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.M.; ALMEIDA, A.R.; SALGADO, M.; PFENNING, L.H. Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottettii* and its host tree *Tapirira guianensis*. **Mycological Progress**, 2010.

AFTS-EUCAST. European Committee on Antibiotic Susceptibility. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E.Dis 7.1. Taufkirchen, Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002.

AHMED, S.I. & CAIN, R.F. Revision of the genera *Sporormia* and *Sporormiella*. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, p. 419-477, 1972.

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

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; JÚNIOR, A.S.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.367-373, 2000.

ALVEZ, R.J.V.; KOLBEK, J. Lists of Species. Summit vascular flora of Serra de São José, Minas Gerais, Brasil. **Check List**, v. 5, p. 35-73, 2009.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Variability of spore length in some species of the genus *Preussia* (*Sporormiella*). **Mycotaxon**, v. 89, p. 137-151, 2004.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Two new *Preussia* species defined based on morphological and molecular evidence. **Fungal Diversity**, v. 20, p. 1-15, 2005.

ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. A new endophytic species of *Preussia* (*Sporormiaceae*) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 1-17, 2007.

ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARNOLD, A. E.; MEJIA L. C.; KYLLO D.; ROJAS E. I.; ROBBINS N.; HERRE E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, E. A. Endophytic fungi: Hidden components of tropical community ecology. In: Carson, W P, Schnitzer, S A (Eds.) **Tropical forest community ecology**. Blackwell Publishing Ltd. p. 254-271, 2008.

ATCC – Disponível em: <http://www.atcc.org/> Último acesso em 04 fevereiro 2011.

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

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-64, 2000.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker Inc.,2000.

BALLIO, A.; BOTTALICO, A.; BUONOCORE, V.; CARILLI, A.; DI VITTORIO, V.; GRANITI, A. **Phytopathology**, v. 1, p. 08-17, 1969.

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

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. A personal View. **The Journal of antibiotics**, v. 58(1), p. 1-26, 2005.

BOTELLA, L. & DIEZ, J.J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, 2010.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S. **Plantas Medicinais da Estrada Real**. 1ªed Belo Horizonte: Editora O Lutador, 2008.

BRIZUELA, M.A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.69-74, 1998.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.; HYDE, K.D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, p.943-948, 2001.

CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, A.R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 991-995, 2005.

CAIN, R.F. Studies of coprophilous ascomycetes. VII. *Preussia*. **Canadian Journal of Botany**, v. 39, p. 1633-1666, 1961.

CALLAHAN, H.L. et al. An axenic amastigota system for frug screening. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.41, p.818-822, 1997.

CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.W.; KELLER, N.P.; Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Reviews**, v.66, p.447-459, 2002.

CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; PAGNOCCA, F.C.; ECHEVERRIGARY, S.; AZEVEDO, J.L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*)

orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 5, p. 397-402, 2005.

CAMPOS, F.F.; ROSA, L.H.; COTA, B.B.; CALIGIORNE, R.B.; RABELLO, K.T.; ALVES, T.M.A.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, 2008.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, p. 210-220, 2002.

CARROL, G. Forest endophytic: pattern and process. **Canadian Journal of Botanic**, v. 73, p.1316-1324, 1995.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p.181-184, 1967.

CASTRO, A.H.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão. [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 385-390, 2009.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.C.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8 (2), 2006.

CLAYDON, N.; GROVE, J.F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v. 24, p.937-994, 1985.

COLLADO, J.; PLATAS, G. & PELÁEZ. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. **Nova Hedwigia**. v. 63, p.347-360, 1996.

COSTA, V.S.O.; MICHEREFF, S.J.; MARTINS, R.B.; GAVA, C.A.T.; MIZUBUTI, E.S.G.; CÂMARA, M.P.S. Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, p. 509-519, 2010.

CRAGG, M. G. & NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 7-24, 2005.

DAISY, B.H.; STROBEL, G.A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D.K.; RUNYON, J.B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 148, p. 3737-3741, 2002.

DAMM, U.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H.; HAEGI, A.; RICCIONI, L. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. **Personia**, v. 20, p. 9-17, 2008.

DAMM, U.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. **Persoonia**, v. 24, p. 60-80, 2010.

DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. **Science**, v. 214, p. 987-994, 1981.

DE PAULA, R.C.; SANCHEZ, E.F.; COSTA, T.R.; MARTINS, C.H.G.; PEREIRA, P.S.; LOURENÇO, M.V.; SOARES, A.M.; FULY, A.L. Antiophidian properties of plant extracts against *Lachesis muta* venom. **The Journal of Venemous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 311-323, 2010.

FELFILI, J. M.; & BORGES FILHO, H.C. Extrativismo racional da rasca de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Universidade Federal de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal, 32 p. 2004.

FELLER, I.C. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Ecological Monographs**, v. 65, p. 477-505, 1995.

FERRARA, M.A. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.73-79, jun, 2006.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia, Bratislava**, v.62(3), p.251-257, 2007.

GABLER, I.G. **Prevalência de espécies de *Candida* em pacientes com AIDS, tuberculose e paracoccidioidomicose, com presença e ausência de candidoses bucais.** 2008. TESE (Doutor em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

GABLER, I. G.; BARBOSA, A. C.; VILELA, R. R.; LYON, S.; ROSA, C. A. Incidence and anatomic localization of oral candidiasis in patients with AIDS hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brasil. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, p. 247-250, 2008.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. A novel endophytic taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, 2010

GODOY, A.L.; FERREIRA, L.A.M.; STEHMANN, J.R.; BRANDÃO, M.G.L. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 27-34, 2002.

GOMES, R.R. ***Phomopsis* spp. endofíticos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa*.** 2008. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidades Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GUARRO, J.; ABDULLAH, S.K.; GENÉ, J.; AL-SAADOON, A.H. A new species of *Preussia* from submerged plant debris. **Mycological Research**, v. 101, p. 305-308, 1997.

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

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, p.134-144, 2008.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.44, p.136-142, 2008.

HANSEN, K. & PFISTER, D.H. Systematics of the *Pezizomycetes* – the operculate discomycetes. **Mycologia**, v. 98, p. 1029-1040, 2006.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K. ; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 1-2, 2002.

HU, H.; JEEWON, R.; ZHOU, D.; ZHOU, T.; HYDE, K.D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**, v. 24, p.1-22, 2007.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 61-75, 2009.

INÁCIO, M. L.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; TRVISAN, H.C.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M; PFENNING, L.H.; ARAÚJO, A.R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in

Cryptocarya mandioccana Nees (*Lauraceae*). **Biochemical systematics and ecology**, v. 34, p.822-824, 2006.

ISHIDA, K. **Atividade antifúngica de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre leveduras de isolados clínicos**. 2006. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; SIMPSON, J.A.; HODGKISS, I.J.; HYDE, K.D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 372-383, 2003.

JIANQIU, S.; LIANGDONG, G.; WEI, Z.; WENXIANG, P.; DEFU, C. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Science in China Series C: Life Sciences**, v.51, p.751-759, 2008.

JOSHEE, S.; PAULUS, B.C.; PARK, D.; JOHNSTON, P.R. Diversity and distribution of fungal endophytes in New Zealand *Podocarpaceae*. **Mycological Research**, 2009.

KIM, J.C.; CHOI, G.J.; PARK, J.H.; KIM, H.T.; CHO, K.Y. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. **Pest Management Science**, v. 57, p. 554-559, 2001.

KOBAYASCHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: C.W.BACON & J.F. WHITE (ed.) **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, p. 199-236, 2000.

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

KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PROKSC, P. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 2010.

LI, E.; JIANG, L.; GUO, L.; ZHANG, H.; CHE, Y. Pestalochlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7894-7899, 2008.

LI, H.Y.; ZHAO, C.A.; LIU, C.J.; XU, X.F. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 1-6, 2010.

LIN, X.; LU, C.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 1037-1040, 2007.

LIU, L.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 606-613, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 85-94, 2005.

LUPO, S.; TISCORNIA, S.; BETTUCCI, L. Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of *Eucalyptus globules*. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 18, p. 38-41, 2001.

MAGALHÃES, W.C.S.; MISSAGIA, R.V.; COSTA, F.A.F.; MENDES COSTA, M.C. Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne**, v.14, p.267-273, 2008.

MAKI, C.S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)** 2006. Tese (Doutor em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, 2006.

MARINHO, A.M.R.; MARINHO, P.S.B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp., um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (*Rutaceae*). **Revista de Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, p. 189-199, 2007.

MARQUES, A.R.; GARCIA, Q.S.; REZENDE, J.L.P.; FERNANDES, G.W. Variations in leaf characteristics of two species of *Miconia* in the Brazilian cerrado under different lights intensities. **Tropical Ecology**, v. 41, p. 47-60, 2000.

MELO, A.S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**, v. 8, p. 21-27, 2008.

METZ, A.M.; HADDAD, A.; WORAPONG, J.; LONG, D.M.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, v. 146, p. 2079-2089, 2000.

MEYER, W.L., SCHWEIZER, W.B., BECK, A.K., SCHEIFELE, W., SEEBACH, D., SCHREIBER, S.L., KELLY, S.E **Phytopathology**, v. 1, p. 08-17, 1987.

MOHALI, S.R.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. Identification of Botryosphaeriaceae from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 103-125, 2007.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: Uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

National Center For Biotechnology – Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> Último acesso em 29 janeiro 2011.

NOVAS, M.V.; CARMARÁN, C.C. Studies on diversity of foliar fungal endophytes of naturalised trees from Argentina, with a description of *Haplotrichum minutissimum* sp. nov. **Flora**, p.610-616, 2008.

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. D. L. Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae), **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 384-386, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; MACHADO, J.N.M. Composição florística de uma floresta semidecídua Montana, na Serra de São José, Tiradentes, Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica**, v. 7(2), p. 71-88, 1993.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão)**, 2005, Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde), Universidade de Franca, 2005.

OHRA, J., MORITA, K., TSUJINO, Y., TAZAKI, H., FUJIMORI, T., GOERING, M.,EVANS, S., ZORNER, P. **Biotechnology Biochemistry**, v. 59, p.113-125, 1995.

PANDEY, A. 2008 - **Solid-state fermentation** – Disponível em http://www.scitopics.com/Solid_state_fermentation.html / Último acesso 04.01.2011.

PETERS, A.F. Field and culture studies of *Streblonema-Macrocystis* new species Ectocarpales Phaeophyceae from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. **Phycologia**, v. 30, p. 365-377, 1991.

PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**. v.1, p.185-196, 1992.

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

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 12, p. 1508-1513, 2001.

RODRIGUES, K.F.; & DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 31, p. 905-909, 1996.

RODRIGUES, K.F.; PETRINI, O. **Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions**. In: *Diversity of tropical microfungi*. HYDE, K.D. (Ed.), University of Hong Kong press. p. 57-69, 1997.

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

RODRIGUEZ. R. J.; WHITE JR. J. F.; ARNOLD. A. E.; REDMAN R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, p. 314–330, 2009.

ROSA, L. H.; VAZ A. B. M.; CALIGIORNE, R.L. B.; CAMPOLINA, SA.; ROSA C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). **Polar Biology**, v.32, p.161–167, 2009.

ROSA, L.H.; VIEIRA, M.L.A.; SANTIAGO, I.F.; ROSA, C.A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 178-189, 2010.

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

RYAN, G.S.; HARPER, D.A.T.; WHALLEY, J.S.; **PALSTAT, Statistics for palaeontologist**. Chapman & Hall., 2005.

SAIKKONEN,K; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual review of ecology and systematics**, v.29, p.319-345, 1998.

SALAZAR, C.S.; GARCÍA, M.C.C. Aislamento de hongos endófitos em rosa (*Rosa hybrida*) em Bogotá, Colombia. **Revista Iberoamericana Micología**, v. 22, p. 99-101, 2005.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y.S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SAUNDERS, M.; KOHN, L.M. Host-synthesized secondary compounds influence the in vitro interactions between fungal endophytes of maize. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 136-142, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (*Lleuque*). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 27-32, 2005.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.K.; DAMMANN, U.; AUST, H.J; STRACK,D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycology Research**, v.103, p.1275-1283, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106: p.996-1004, 2002.

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

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; GIANINNI, M.J.S.M. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

Serra do Cipó – Disponível em <http://www.serradocipo.com/> Último acesso em 06 agosto 2009.

SETTE, L.D.; PASSARINI, M.R.Z.; DELARMELENA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M.C.T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, p. 1185-1195, 2006.

SILVA, A.C.; VIDAL-TORRADO, P.; CORTIZAS, A.M.; RODEJA, E.G. Solo do topo da Serra São José (Minas Gerais) e suas relações com o paleoclima no sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 455-466, 2004.

SIM; HORNG, J.; KHOO, C.H.; LEE, L.H.; CHEAH, Y.K. Molecular diversity of fungal endophytes isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 651-658, 2010.

SOARES, S. P.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 23(2), p.141-144, 2008.

SOUSA, E.C. **Avaliação da atividade *in vitro* de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra *Candida* spp.** 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) 2007 Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 2007.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazônica**, v.34(2), p.185-195, 2004.

SOUZA, C.D. & FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.20, n.1, p.135-142, 2006.

STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., GROTHAUS, P. & BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacifiyew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1315-1324, 1995.

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C.W. BACON & J.F. WHITE (Ed.) **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker.pp. 3-30, 2000.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.F. Endophytic fungi. In: Muller, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods**.Elsivier Academic Press. p. 241-270, 2004.

STOPPA, M.A.; CASEMIRO, L.A.; VINHOLIS, H.C.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, p. 498-502, 2009.

STROBEL, G.A.; Microbial gifts from rain forests. **The Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 14-20, 2002.

STROBEL, G.A.; Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535-544, 2003.

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

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, p.257-268, 2004.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, p. 818-826, 2002.

SZEWCZUK, V.; KITA, W.; JAROSZ, B.; TRUSKOWSKA, W.; SIEWINSKI, A.; Growth inhibition of some phytopathogenic fungi by organic extracts from *Nigrospora oryzae* (Berkeley and Broome) Petch. **Journal of Basic Microbiology**, v. 31, p. 69-73, 1991.

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

TANAKA, M.; FUKUSHIMA, T.; TSUJINO, Y.; FUJIMORI, T. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antimicrobial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 1848-1852, 1997.

TAYLOR, J.E.; HYDE, K.D.; JONES, B.G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, p. 335-346, 1999.

VALLDOSERA, M. & GUARRO, J. Estudios sobre hongos coprófilos aislados em España. XV. El género *Preussia* (*Sporormiella*). **Boletín de La Sociedad Micológica de Madrid**, v. 14, p. 81-94, 1990.

VAZ, A.B.M.; MOTA, R.C.; BOMFIM, M.R.Q.; VIEIRA, M.L.A.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1381-1391, 2009.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R.N.; STROBEL, G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, v. 54, p. 119-125, 2007.

VIEIRA, M.L.A. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

XING, X.K.; CHEN, J.; XU, M.J.; LIN, W.H.; GUO, S.X. Fungal endophytes associated with *Sonneratia* (*Sonneratiaceae*) mangrove plants on the south coast of China. **Forest Pathology**, 2010.

XU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, J.; LI, J.; LI, X.; WANG, J. Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 68-72, 2008.

ZHANG, B.; SALITURO, G.; SZALKOWSKI, D.; LI, Z.; ZHANG, Y.; ROYO, I.; VILELLA, D.; DÍEZ, M. T.; PELAEZ, F.; RUBY, C.; KENDALL, R. L.; MAO, X.; GRIFFIN, P.; CALAYCAY, J.; ZIERATH, J. R.; HECK, J. V. SMITH, R. G.; MOLLER, D. E. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 284, p. 974-977, 1999.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1707-1717, 2010.

WANG, F.W.; HOU, Z.M.; WANG, C.R.; LI, P.; SHI, D.H. Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. **World Journal Microbiologist Biotechnology**, v. 24, p. 2143-2147, 2008.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v. 292. p. 449-451. 1981.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WICKERT, E.; GOES, A.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.; SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, F.D.; RINALDO, D. Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8S-ITS2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 360-380, 2009.

WILSON, D. Endophytes – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, p. 274-276, 1995.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSET-KANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.20, p.265-272, 2004.

YUAN, Z.L.; CHEN, Y.C.; YANG, Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, p. 295-303, 2009.

8 ANEXO

Anexo 1: Índices de diversidade dos fungos endofíticos isolados de plantas jovens e adultas de *Stryphnodendron adstringens*.

Índices de Diversidade	Indivíduos de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	
	Jovem	Adulto
Shannon (H')	2,59 (2,76/3,07)*	2,79 (2,64/3,04)*
Simpson (1-D)	0,88 (0,89/0,93)*	0,90 (0,88/0,93)*

*Os números entre parênteses representam os menores e maiores valores de diversidade, respectivamente. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições.

Anexo 2: Índices de diversidade do total de fungos endofíticos isolados de folhas e cascas de *Stryphnodendron adstringens*.

Índices de Diversidade	Substrato	
	Folha	Casca
Shannon (H')	2,98 (2,77/3,08)*	2,49 (2,54/3,02)*
Simpson (1-D)	0,92 (0,89/0,93)*	0,86 (0,87/0,93)*

*Os números entre parênteses representam os menores e maiores valores de diversidade, respectivamente. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1.000 repetições.

Anexo 3: Porcentagem de inibição dos extratos produzidos a partir de fungos endofíticos, folhas e cascas de *Stryphnodendron adstringens* frente às linhagens alvo utilizadas nos ensaios biológicos.

Extrato UFMGCB*	Porcentagem de Inibição								
	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804		<i>Candida albicans</i> 2.1A		<i>Candida albicans</i> 15.3C		MCF-7**	TK-10***	<i>Leishmania amazonensis</i>
	100 (ug/mL)	250 (ug/mL)	100 (ug/mL)	250 (ug/mL)	100 (ug/mL)	250 (ug/mL)	20 (mg/mL)	20 (mg/mL)	20 (mg/mL)
4596	30	64	38	60	6	70	-	0	15
4597	0	44	15	16	2	55	-	11	36
4598	2	40	21	45	6	57	-	12	47
4599	10	37	18	34	0	55	-	15	42
4600	8	45	22	61	0	68	-	15	34
4601	2	37	15	33	0	61	15	46	19
4602	0	33	10	20	4	50	13	0	20
4603	22	36	2	26	9	51	15	0	21
4604	2	53	25	51	0	61	15	0	24
4605	20	42	12	29	0	55	9	0	27
4606	13	49	25	52	0	62	9	0	20
4607	11	43	26	37	6	52	9	0	44
4608	13	45	21	46	0	63	6	30	11
4609	40	45	27	47	8	62	14	0	20
4610	26	51	24	46	0	62	11	1	26
4611	9	47	2	37	10	55	15	3	27
4612	18	52	30	56	8	68	12	0	22
4613	19	53	24	51	12	66	13	0	30
4614	17	63	48	72	6	68	14	0	21
4615	11	29	0	13	0	8	13	3	30
4616	24	46	20	61	0	63	5	0	16
4617	12	47	34	49	0	58	15	50	20

4618	0	53	32	52	0	67	23	0	26
4619	0	37	17	18	1	49	16	0	66
4620	0	58	36	64	26	65	14	0	33
4621	24	49	25	51	4	68	7	9	32
4622	22	51	29	58	15	66	12	0	30
4623	23	45	26	49	0	57	14	0	28
4624	33	61	52	71	12	67	7	0	17
4625	18	29	14	25	2	52	13	0	29
4626	10	43	38	36	10	60	20	0	23
4627	11	39	19	40	12	55	18	2	17
4628	32	49	23	30	18	52	12	2	25
4629	17	48	27	45	18	58	4	1	33
4631	28	46	29	39	20	63	18	2	19
4632	9	27	23	13	4	44	5	4	29
4633	14	43	21	29	24	53	9	1	0
4634	26	46	32	49	7	58	16	24	0
4635	0	30	15	8	0	27	20	0	7
4636	18	64	60	69	15	58	19	0	23
4637	15	41	12	30	3	51	8	0	21
4638	13	51	31	53	0	61	10	2	34
4639	0	31	20	12	0	32	17	0	43
4640	2	29	12	44	0	56	13	3	46
4641	24	41	26	45	0	55	9	0	39
4642	34	52	41	65	8	54	13	0	14
4643	21	36	18	30	17	49	17	0	22
4644	16	59	33	67	16	61	23	9	30
4645	1	51	27	16	13	51	11	1	25
4646	8	46	22	37	7	62	6	4	27
4647	19	41	20	33	5	63	10	6	20
4648	18	39	37	54	9	69	11	17	18

4649	11	40	25	47	41	64	7	8	8
4650	0	33	29	31	4	66	9	1	23
4651	0	40	19	29	0	55	16	0	6
4652	12	54	32	49	8	56	18	0	19
4653	0	37	7	6	19	24	11	0	24
4654	0	55	23	31	21	67	10	0	32
4655	0	45	17	23	16	59	16	4	20
4656	0	37	22	44	4	56	8	0	21
4657	3	38	25	40	17	60	6	7	20
4658	6	32	18	13	12	52	14	2	14
4659	10	33	12	8	5	35	17	0	22
4660	16	43	10	20	9	34	15	3	23
4661	19	50	21	31	8	59	18	12	20
4662	31	57	40	54	9	68	6	0	22
4663	2	41	22	6	0	46	20	0	22
4664	15	40	28	44	0	62	15	0	21
4665	16	48	17	34	0	51	12	7	30
4666	15	40	16	31	5	60	15	0	18
4667	18	40	17	27	10	44	16	12	22
4668	31	53	36	62	16	60	17	0	44
4669	11	41	16	21	10	47	17	0	33
4670	26	39	20	17	0	43	13	0	18
4671	8	53	33	62	7	66	18	1	23
4672	0	27	26	43	4	55	18	1	27
4673	0	23	23	14	6	31	12	10	43
4674	23	45	36	58	21	46	8	1	13
4675	22	57	49	87	9	66	17	0	0
4676	34	44	28	40	7	56	14	0	19
4677	10	26	17	50	40	33	13	3	12
4678	20	16	9	37	28	22	10	4	35

4679	7	8	0	27	23	6	16	0	46
4680	18	22	14	40	19	29	14	7	41
4681	18	15	37	51	26	37	11	17	34
4682	8	5	41	33	36	33	7	13	13
4683	11	22	33	37	16	11	13	12	4
4684	20	18	9	41	19	24	3	12	4
4685	26	43	16	45	33	9	5	17	2
4686	27	46	32	61	21	40	2	17	20
4687	7	30	21	45	19	30	2	13	3
4688	18	53	50	68	32	40	8	20	2
4689	5	33	30	27	22	0	9	16	5
4690	24	25	49	45	43	19	7	11	5
4691	11	32	5	41	11	11	3	6	5
4692	10	26	0	47	19	19	6	12	4
4693	21	74	18	56	38	46	4	12	2
4694	34	44	34	59	23	34	6	12	3
4695	43	61	46	66	31	60	5	12	5
4696	18	40	20	50	16	39	6	12	1
4697	14	34	19	50	27	43	12	10	1
4698	12	34	14	40	21	41	13	11	7
4699	11	49	12	48	17	41	3	6	3
4700	10	37	0	33	12	12	0	8	0
4701	14	23	0	31	16	13	0	9	0
4702	5	19	1	34	19	36	0	9	0
4703	4	30	0	43	15	4	0	11	0
4704	27	51	29	68	25	54	5	16	2
4705	7	26	18	39	13	23	0	13	4
4706	0	6	0	33	22	26	7	7	5
4707	4	27	12	39	24	35	2	4	3
4708	16	27	12	46	19	36	0	5	1

4709	12	33	10	42	17	34	0	7	0
4710	16	27	0	41	13	31	0	8	2
4711	24	39	22	58	19	52	0	10	1
4712	22	50	34	51	41	53	0	16	5
4713	15	37	19	45	41	47	3	11	5
4714	14	30	6	32	24	38	4	8	7
4715	0	21	0	34	13	18	0	6	2
4716	16	32	5	38	16	29	0	4	2
4717	18	40	16	47	25	32	0	9	2
4718	12	42	11	49	18	36	0	12	1
4719	12	28	13	41	18	26	0	11	1
4720	11	38	11	51	18	34	0	7	4
4721	14	27	9	41	31	25	1	11	0
4722	18	40	27	60	26	49	6	9	7
4723	9	49	15	44	19	47	0	5	5
4724	4	25	18	36	10	38	0	1	3
4725	16	34	0	52	23	38	0	8	0
4726	10	28	8	48	7	18	0	11	0
4727	18	34	8	51	15	38	2	9	6
4728	9	20	0	37	9	10	4	11	2
4729	11	22	0	37	21	1	0	11	6
4730	11	31	8	46	14	32	5	9	2
4731	19	37	13	55	20	43	0	8	0
4732	16	45	13	52	15	40	1	4	1
4733	24	28	7	32	34	15	0	2	0
4734	24	36	9	44	18	26	0	14	0
4735	14	29	0	39	24	6	0	12	1
4736	28	50	17	42	25	45	0	19	3
4737	16	44	9	58	33	40	3	12	3
4738	13	34	3	37	32	32	1	9	4

4739	3	25	0	26	21	13	0	1	3
4740	9	37	4	30	26	18	0	1	0
4741	18	17	6	28	14	16	0	10	0
4742	24	28	17	42	20	31	1	6	0
4743	30	40	16	47	21	39	0	6	3
4744	26	31	13	47	21	32	2	5	4
4745	20	24	14	22	22	17	0	3	2
4746	21	37	23	47	21	40	4	10	5
4747	21	24	10	45	20	29	6	11	2
4748	33	36	14	47	18	19	3	2	0
4749	22	45	20	50	19	39	0	5	0
4750	12	26	9	35	19	22	1	11	0
4751	27	43	24	52	19	47	0	10	0
4752	26	49	32	60	26	47	0	7	4
4753	14	37	15	41	19	20	1	0	2
4754	17	42	19	54	21	43	10	14	13
4755	23	44	31	52	25	42	7	10	4
4756	11	21	6	15	12	0	3	4	4
4757	18	28	8	41	21	36	2	13	3
4758	21	41	31	56	21	43	1	17	2
4759	13	27	16	41	11	34	3	16	5
4760	20	31	13	44	4	46	5	9	4
4761	9	28	14	34	19	53	3	5	6
4762	5	36	26	42	17	48	8	0	5
4763	0	28	17	42	14	35	5	0	9
4764	14	33	24	38	23	45	3	0	11
4765	15	35	24	35	24	58	0	0	10
4766	15	36	24	45	31	57	0	17	11
4767	7	30	21	46	15	49	0	15	11
4768	25	45	30	51	16	57	0	0	10

4769	2	28	15	45	14	65	92	100	1
4770	14	37	28	44	17	61	9	0	4
4771	11	42	27	59	30	46	8	0	13
4772	24	44	39	59	36	53	4	0	12
4773	5	37	36	60	28	54	3	0	12
4774	10	33	28	43	19	56	0	0	9
4775	31	49	24	52	15	58	0	0	10
4776	24	35	33	50	21	47	9	18	13
4777	18	42	15	54	23	58	12	18	1
4778	25	39	26	43	32	49	10	0	4
4779	8	29	20	44	19	33	19	8	13
4780	29	41	38	58	39	46	3	1	10
4781	6	4	16	10	15	0	7	3	11
4782	13	31	29	50	23	43	1	0	11
4783	33	43	30	56	16	57	0	100	11
4784	23	46	38	61	34	58	0	0	13
4785	24	39	21	50	4	31	7	0	6
4786	22	30	22	44	11	41	12	20	1
4787	26	32	14	37	12	38	18	14	12
4788	5	25	23	50	12	32	6	0	14
4789	11	34	28	51	17	50	0	0	13
4790	22	40	25	46	28	49	0	0	10
4791	19	37	25	53	24	47	0	0	15
4792	18	39	29	53	28	50	0	0	12
4793	17	41	32	58	23	46	3	9	5
4794	23	45	28	60	14	56	3	0	3
4795	14	30	20	42	25	54	5	0	10
4796	28	62	43	58	46	56	0	0	12
F1	18	26	16	0	0	0	5	0	10
F2	12	24	5	0	15	0	0	0	12

F3	14	27	16	0	0	1	0	19	11
F4	23	24	13	0	0	0	0	0	13
F5	12	29	14	25	0	7	0	0	6
F6	17	19	6	1	0	0	8	0	3
F7	16	25	7	15	0	0	20	0	11
F8	13	12	14	13	0	7	7	0	11
F9	11	24	11	10	0	1	9	0	11
F10	19	19	7	2	0	0	2	0	10
F11	27	10	11	5	0	10	0	0	13
F12	14	22	16	9	0	3	0	0	13
F13	14	17	10	8	0	0	40	0	7
F14	16	21	17	3	8	8	13	46	0
F15	14	20	7	0	5	13	0	0	10
C1	9	48	0	59	81	74	0	0	9
C2	0	48	0	50	76	77	4	0	12
C3	0	44	0	51	84	76	0	5	10
C4	0	53	0	64	78	79	0	100	11
AC5	0	50	0	58	84	75	0	0	12
AC6	0	33	0	31	73	75	18	19	3
AC7	0	50	0	66	72	76	6	0	3
AC8	0	43	0	53	81	75	5	0	12
AC9	0	35	0	43	77	72	7	0	12
AC10	0	36	0	30	78	74	5	0	11
AC11	0	43	0	56	82	76	3	0	10
AC12	0	47	0	54	81	79	4	0	10
AC13	0	38	0	31	80	73	0	0	12
AC14	0	40	0	51	79	77	10	0	6
AC15	0	60	0	63	82	75	9	0	1
5018	4	28	30	40	11	17	3	14	22
5019	15	45	17	58	23	52	1	14	18

5020	24	30	19	38	28	54	7	13	23
5021	25	42	38	56	35	62	12	5	11
5022	31	57	44	68	47	74	14	13	7
5023	19	39	22	51	14	48	13	15	15
5024	32	56	42	65	40	70	35	12	10
5025	27	40	32	57	37	60	12	14	18
5026	18	29	15	5	40	59	1	13	16
5027	10	21	6	49	23	45	4	21	28
5028	13	14	27	51	20	34	5	55	22
5029	20	28	20	47	19	47	7	23	18
5030	27	38	44	61	3	50	10	21	24
5031	93	89	94	97	76	30	9	18	22
5032	24	24	25	54	0	39	10	16	22
5033	22	27	30	53	0	38	10	15	27
5034	29	32	42	56	0	37	1	20	34
5036	11	19	28	44	11	15	12	10	12
5037	14	22	21	41	0	16	13	21	5
5038	0	8	8	19	11	5	12	11	12
5039	23	22	28	48	0	32	14	11	10
5040	26	24	35	52	17	31	16	24	9
5041	24	39	26	62	3	40	16	10	14
5042	21	21	17	37	2	26	5	21	22
5043	17	41	17	57	0	33	4	26	28
5044	13	24	20	51	10	48	13	11	23
5045	36	49	42	68	29	59	17	21	8
5046	14	19	14	45	14	35	14	29	8
5047	34	31	35	62	1	49	15	19	9
5048	30	32	38	65	13	55	18	19	14
5049	24	29	28	53	0	41	14	10	18
5050	15	19	11	41	0	0	12	15	19

5051	28	20	13	41	0	25	24	19	31
5052	8	31	30	55	0	39	11	18	10
5053	6	37	37	57	11	33	13	56	10
5054	0	20	11	47	11	19	12	10	14
5055	7	33	23	50	0	45	19	14	10
5056	30	49	51	70	16	57	17	20	14
5057	17	26	31	55	0	40	16	11	12
5058	5	14	7	29	0	0	10	9	15
5059	10	23	25	52	6	35	11	18	34
5060	19	43	46	52	17	51	20	58	16
5061	34	53	61	70	15	64	14	7	15
5062	29	41	51	65	26	56	13	10	9
5063	21	32	44	62	5	48	17	34	25
5064	21	26	35	58	21	46	14	9	16
5065	27	43	47	64	13	55	14	10	17
5066	19	36	27	61	5	16	9	1	25
5067	9	34	34	63	5	36	6	13	35
5068	23	52	49	64	11	45	5	17	11
5069	20	37	43	58	17	48	12	10	19
5070	1	1	8	10	20	0	10	8	8
5071	35	53	39	63	17	57	10	11	12
5072	21	35	36	59	18	42	12	12	11
5073	23	39	50	64	5	50	16	10	13
5074	14	26	28	48	0	30	10	4	15
5075	36	38	33	55	1	41	12	14	20
5076	9	32	25	53	8	49	11	13	11
5077	30	54	56	66	23	63	12	13	9
5078	12	16	31	46	18	35	12	9	14
5079	19	25	25	52	0	23	14	11	14
5080	18	42	45	65	17	54	18	10	17

5081	23	49	47	70	2	60	15	7	13
5082	21	31	24	53	9	43	7	10	15
5083	18	17	23	46	0	40	67	15	23
5084	15	29	41	58	8	48	9	23	13
5085	-1	16	3	41	0	0	8	15	9
5086	2	12	10	37	0	0	11	15	21
5087	22	22	39	58	13	47	17	22	23
5088	21	25	28	62	5	25	33	16	26
5089	42	56	54	73	17	51	16	18	20
5090	24	27	33	57	2	36	12	4	21
5091	11	28	19	46	10	29	8	11	29
5092	17	35	41	58	0	46	13	22	15
5093	20	34	12	60	0	43	11	17	16
5094	13	31	30	54	1	46	14	7	14
5095	25	22	22	45	0	23	16	15	13
5096	16	12	46	49	0	0	73	8	26
5097	16	35	40	58	0	48	16	12	19
5098	36	56	63	72	12	54	15	9	16
5099	6	21	25	52	10	34	16	8	24
5100	16	4	20	49	0	44	10	19	18
5101	20	31	28	53	8	43	17	33	14
5102	34	45	56	67	17	49	16	22	15
5103	26	21	24	55	8	19	16	24	11
5104	15	13	6	35	11	0	16	14	14
5105	29	29	29	57	0	35	14	25	18
5106	31	39	42	63	9	53	13	14	19
5107	23	29	29	59	12	35	12	15	25
5108	22	24	23	45	7	31	8	28	18
5109	1	23	16	42	0	3	15	32	15
5110	18	21	19	50	7	30	17	18	19

5111	13	28	46	57	10	55	13	26	17
5112	0	18	25	39	8	36	15	16	19
5113	24	54	56	66	20	66	12	14	21
5114	13	38	18	60	0	46	13	16	24
5115	17	27	44	48	16	39	12	18	32
5116	32	60	53	69	29	67	7	10	-
5117	20	29	43	56	6	46	10	21	-
5118	25	44	45	65	12	58	8	11	-
5119	14	28	36	55	13	39	13	11	-
5120	0	5	2	29	0	0	13	24	-
5123	15	40	36	63	17	57	13	10	-
5124	7	26	21	48	1	30	7	21	-
5125	8	28	25	47	2	42	17	26	-
5126	7	13	15	27	0	0	18	11	-
5127	19	29	41	57	11	41	13	21	-
5128	40	60	63	43	14	51	12	29	-
5129	14	33	25	48	18	40	15	19	-
5130	25	41	47	58	26	49	19	19	-
5131	6	27	25	41	12	7	15	10	-
5132	14	28	28	46	14	30	14	15	-
5133	17	22	31	46	8	33	1	19	-
5134	18	25	27	43	0	27	13	18	-
5135	19	22	22	39	0	5	38	56	-
5136	32	21	23	35	1	1	15	10	-
5137	21	27	27	52	6	24	23	14	-
5138	9	20	16	29	3	0	15	20	-
5139	0	18	11	30	0	0	20	11	-
5140	14	27	31	46	0	18	21	9	-
5141	0	5	0	20	0	0	18	18	-
5142	16	26	29	49	0	18	21	58	-

5143	33	52	54	67	16	56	15	7	-
5144	35	27	27	49	0	39	40	10	-
5145	12	33	31	53	15	48	40	34	-
5146	15	30	36	52	11	43	17	9	-
5147	6	32	30	54	9	47	18	10	-
5148	13	39	27	57	0	45	20	1	-
5149	8	27	29	41	4	21	13	13	-
5150	9	30	33	47	8	40	10	17	-
5151	0	10	5	34	0	0	11	10	-
5152	15	16	40	54	3	35	10	8	-
5153	12	42	35	62	0	48	11	11	-
5154	0	0	-4	13	13	0	14	12	-
5155	4	24	27	43	11	35	18	10	-
5156	0	0	4	1	0	0	20	4	-
5158	10	37	20	54	23	62	11	14	-
5159	11	17	27	46	12	5	13	13	-
5160	25	43	50	60	11	46	11	13	-
5161	38	56	55	68	10	48	10	9	-
5162	15	29	35	50	17	47	15	11	-
5163	13	35	43	53	22	52	19	10	-
5164	0	23	1	36	0	0	20	7	-
5165	17	42	39	54	7	42	13	10	-
5166	10	26	22	37	3	2	12	15	-
5167	0	23	21	31	6	0	16	23	-
5641	25	41	55	61	6	44	11	15	-
F1	3	11	9	10	2	0	9	15	-
F2	0	2	14	11	18	5	17	22	-
F3	0	10	17	13	14	0	15	16	-
F4	0	0	9	3	0	0	13	18	-
F5	0	0	8	0	4	15	15	4	-

F6	0	0	0	9	0	0	3	11	-
F7	7	0	0	3	4	0	17	22	-
F8	3	13	8	24	3	0	9	17	-
F9	1	16	7	25	0	0	12	7	-
F10	0	0	8	8	0	0	15	15	-
F11	0	8	1	21	0	0	12	8	-
F12	0	0	0	8	0	0	17	12	-
F13	0	0	4	1	0	36	17	9	-
F14	0	0	0	8	0	0	0	8	-
F15	2	9	5	26	3	0	7	19	-
C1	59	64	54	58	77	76	34	33	-
C2	65	63	61	67	83	74	17	22	-
C3	68	66	67	65	87	71	28	24	-
C4	63	68	17	66	88	76	13	14	-
C5	70	68	64	63	88	73	20	25	-
C6	71	70	40	63	87	74	37	14	-
C7	68	70	43	66	89	76	11	15	-
C8	71	69	54	64	90	76	6	28	-
C9	72	70	58	63	89	74	26	32	-
C10	71	67	62	57	89	77	7	18	-
C11	71	67	52	64	88	74	21	26	-
C12	73	71	38	69	90	78	15	16	-
C13	72	70	26	69	89	77	11	14	-
C14	76	68	51	64	90	77	25	16	-
C15	65	70	41	68	91	80	7	18	-

*UFMGCB: Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;

**MCF-7: Célula de adenocarcinoma de mama humano;

***TK-10: Célula de câncer renal.