


 <p>UFAL</p>	<p>Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i> <i>PPGQB</i></p>	 <p>IQB</p>
---	---	--

***Phomopsis* sp. como endofítico de *Turnera subulata*: isolamento, identificação e atividade biológica de seus extratos.**

Giancarlo de Brito Lyra Santos

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Caetano

Maceió - Alagoas
Junho de 2009

 UFAL	<p style="text-align: center;">Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia</p> <p style="text-align: center;"><i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i> <i>PPGQB</i></p>	 IQB
---	---	--

***Phomopsis* sp. como endofítico de *Turnera subulata*: isolamento, identificação e atividade biológica de seus extratos.**

Giancarlo de Brito Lyra Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz C. Caetano

Maceió - Alagoas
Junho de 2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237p Santos, Giancarlo de Brito Lyra.
Phomopsis sp. como endofítico de *Turnera subulata* : isolamento, identificação e atividade biológica de seus extratos / Giancarlo de Brito Lyra Santos, 2009.
61 f. : il., grafs.

Orientador: Luiz C. Caetano.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2009.

Bibliografia. f. 53-61.

1. Microorganismos endofíticos – Identificação. 2. *Phomopsis*. 3. *Turnera subulata* . I. Título.

CDU: 579.22/.23



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária
Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax.(82) 3214-1384
Email: cpqgb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Giancarlo Brito de Lyra Santos** intitulada: "**Phomopsis sp como Endofítico De Turnera *subulata*: Isolamento, Identificação, Química e Atividade Biológica de seus Extratos**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 06 de julho de 2009, às 14h na sala de reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.º Dr.º Luiz Carlos Caetano
Orientador – PPGQB/ IQB /UFAL

Prof.ª Dr.ª Fabiane Caxico de Abreu Galdino
PPGQB/IQB/UFAL

Prof.º Dr.º Emiliano de Oliveira Barreto
ICBS/UFAL

AGRADECIMENTOS

- *Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano pelo conhecimento imensurável transmitido, amizade, apoio, dedicação e por ter apostado em minha capacidade mesmo sem me conhecer. Certamente sem ele nada disso seria possível;*
- *Aos meus pais, Verônica Valença de Brito Lira e Juvêncio Inácio Filho, maiores responsáveis pela minha educação, maior virtude que poderia ter herdado, por acreditarem e ensinarem sempre que eu podia ser mais (serei sempre grato por isso);*
- *À minha esposa Rafaela, pela confiança e apoio em todas as minhas decisões, pelo incentivo para realização do Mestrado, pelo apoio no laboratório, por ter aguentado dias difíceis e pelo carinho dedicado diariamente;*
- *Ao meu irmão Beto Brito, professor e poeta, um espelho em minha vida, pelos conselhos, companheirismo e preocupação (participação fundamental);*
- *Ao mestrando Roberto Ramos, pela amizade, simplicidade e apoio no laboratório (sem sua ajuda com certeza nada disso seria possível);*
- *Ao Doutorando Ricardo Manoel (vulgo João Grandão) pela parceria nas disciplinas, companheirismo e força na realização desse trabalho (sua ajuda foi fundamental nesse trabalho);*
- *Ao mestre Demetrius Pereira pelo apoio, amizade e conhecimento passado;*
- *À Sandra, pela dedicação e atenção materna dedicadas a todos de forma igualitária e pelo conhecimento transmitido;*

- *À doutoranda Aliete e o companheiro Erickson, pelo apoio no trabalho, fotografias tiradas e amizade;*
- *A todos que fazem o Laboratório de Plantas e Fitoterapia; Microorganismos Endofíticos; Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia;*
- *À minha família pelo apoio incondicional e confiança em minha capacidade;*
- *Ao Prof. Dr. Luiz Antônio, à Mestre Iede Hercilia e à Graduanda em Biologia Sandra Hiromi Kamei do Laboratório de DNA Forense da UFAL, pela ajuda na identificação genética e apoio na realização desse trabalho;*
- *Ao Prof. Dr. Edson Bento pela contribuição na realização da ressonância;*
- *Ao prof. Dr. Péricles e a profª Rosanne pela ajuda nos testes de cromatografia gasosa;*
- *Aos colegas de mestrado e aos doutorandos que cursaram disciplinas comigo, pelo apoio e amizade;*
- *A todos os que fazem o Instituto de Química e Biotecnologia;*
- *Aos Professores Doutores Altair, Milton e Porfírio, pelas cartas de recomendação, fundamentais para a aprovação no processo de seleção;*
- *Aos meus alunos (fontes da força necessária para dedicação e busca intensa pelo conhecimento);*

- *A todos que contribuíram em minha educação, aos professores e funcionários do Colégio Dinâmico, em especial para professores que mais contribuíram para que eu superasse as dificuldades (Aldovandro, Vânia, Santos, Wellington - amigo Leloso- e ao grande amigo Jason Santana);*
- *A todos que fazem o curso de Odontologia da UFAL (primeira e uma das grandes fontes de conhecimento em nível superior), em especial aos colegas de turma, professores e funcionários;*
- *Aos meus amigos e familiares por terem suportado e entendido minha ausência e por acreditarem que não existe distância para uma verdadeira amizade.*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, a todos que contribuíram de uma forma ou de outra para sua realização, aos meus alunos (fontes de força para dedicação), aos alagoanos que formam este povo sofrido e ao mesmo tempo acolhedor e aos que acreditam que o estudo continua sendo a grande saída para a mudança da realidade do povo brasileiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
<i>CAPÍTULO 1. Aspectos gerais sobre a planta <i>Turnera subulata</i> L. e microrganismos endofíticos e objetivos.....</i>	<i>3</i>
<i>A planta <i>Turnera subulata</i> L.....</i>	<i>3</i>
<i>As interações entre fungos e plantas.....</i>	<i>5</i>
<i>Os microrganismos endofíticos.....</i>	<i>6</i>
<i>A ocorrência de microrganismos endofíticos</i>	<i>7</i>
<i>Microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais.....</i>	<i>9</i>
<i>CAPITULO 2. Isolamento e identificação do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. de <i>Turnera subulata</i> L.</i>	<i>12</i>
Introdução.....	12
Material e métodos	13
Preparo dos meios de cultura para o isolamento	13
Ágar-Água (AA).....	13
Batata-Dextrose (BD).....	13
Batata-Dextrose-Ágar (BDA).....	13
Cálculo da frequência de fungos endofíticos.....	14
Purificação dos fungos endofíticos.....	15
Identificação do isolado fúngico	15
Preparação de lâminas	15
Microcultivo	15
Identificação molecular do isolado	16
Extração do DNA do fungo endofítico	16
Amplificação e sequenciamento das regiões ITSs.....	16
Resultados e discussão	18
<i>CAPÍTULO 3. Produção de biomassa, preparo dos extratos e prospecção química a partir do micélio de <i>Phomopsis</i> sp.....</i>	<i>25</i>

Introdução.....	25
Material e métodos	27
Meios de cultivo para a produção de biomassa	27
Batata-Sacarose-Ágar (BSA)	27
Tryptona-Soja-Ágar (TSA).....	27
Czapek (CZA)	27
Cenoura-Ágar (CA)	28
Avaliação do crescimento do <i>Phomopsis</i> sp. em diferentes meios sólidos.....	28
Obtenção de biomassa e dos extratos	28
Resultados e discussão	30
CAPITULO 4. Antagonismo entre o fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. e fungos	
filamentosos.	36
Introdução.....	36
Material e métodos	37
Teste de antagonismo.....	37
Resultados e discussão	39
CAPITULO 5. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos do	
fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp.	43
Introdução.....	43
Material e métodos	44
Avaliação Qualitativa do Potencial Antioxidante	44
Avaliação Quantitativa do Potencial Antioxidante	44
Preparo das Soluções e Construção da Curva de Calibração do DPPH	44
Preparo das Amostras e Determinação de CI_{50}	45
Testes de atividade antimicrobiana dos Extratos de <i>Phomopsis</i> sp Contra	
Microrganismos Patogênicos Humanos	46
Incorporação dos Extratos aos Discos de Papel.....	46
Preparação dos Inóculos.....	46
Plaqueamento	46
Resultados e discussão	47
CONCLUSÕES GERAIS.....	51
ANEXO.....	52
Referências Bibliográficas.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Turnera subulata</i>	3
Figura 2. A) Fragmentos de folhas de <i>Turnera subulata</i> L. em meio AA apresentando micélio de fungos endofíticos na superfície do limbo foliar. B) Placa de Petri contendo lâminas de microcultura em meio BDA prontas para a visualização das microestruturas do fungo endofítico isolado em microscópio ótico.....	19
Figura 3. Presença de conídios α (setas) característicos do gênero <i>Phomopsis</i> em microcultura corada com azul de metileno. Aumento de 40x.....	20
Figura 4. Comparação da seqüência obtida neste trabalho com as seqüências do banco de dados genômicos do NCBI. O resultado apresentou uma cobertura de 100% com outras seqüências de fungos do gênero <i>Phomopsis</i> quanto <i>Diaporthe</i> sendo que as quatro primeiras apresentaram uma identidade máxima de 99%. Estas seqüências foram constituídas de três do gênero <i>Phomopsis</i> (fase anamórfica) e uma do gênero <i>Diaporthe</i> (fase teleomórfica).....	22
Figura 5. Representação da comparação da seqüência de bases da região ITS do rDNA (5.8S) do isolado fúngico obtido de <i>Turnera subulata</i> neste trabalho com uma da mesma região do rDNA (5.8S) do grupo <i>Phomopsis</i> registrada no banco de dados do NCBI. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#58396904). (GbDQ480356.1) <i>Phomopsis</i> sp. NR-2006-D53 seqüência parcial do gene de RNA ribossômico 18S; ITS1, 5.8S gene do RNA ribossomal, e seqüência completa do ITS2; e sequencia parcial gene do RNA ribossomal 28S; comprimento = 581.....	23
Figura 6. Árvore dicotômica obtida através da inserção da seqüência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico de folhas de <i>Turnera subulata</i> neste trabalho e comparação com o banco de dados do NCBI. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/blast_tree_view.cgi?request=page&rid=69R2RS9H01R&queryID= cl 16369&distmode=on&screenWidth=1024). Identificado como <i>Phomopsis</i> sp (teleomorfo <i>Diaporthe</i> sp).....	24
Figura 7. Estrutura da fomopsicalasina (phomopsichalasin).....	26
Figura 8. Fluxograma indicando os passos realizados no procedimento utilizado para obtenção dos extratos celulares do endófito <i>Phomopsis</i> sp. obtido de <i>Turnera subulata</i>	29
Figura 9. Colônias do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Turnera subulata</i> crescidas em placas de Petri contendo diferentes composições de meio de cultivo. Sequência: 1- Batata-dextrose-ágar (BDA), 2- Batata-	

sacarose-ágar (BSA), 3- Czapek (CZA), 4- Triptona-soja-ágar (TSA) e 5- Cenoura-ágar (CA). A) Colônias crescidas em presença de luz. B) Colônias crescidas na ausência de luz.....	30
Figura 10. Crescimento diametral do fungo <i>Phomopsis</i> sp. obtido de <i>Turnera subulata</i> em diferentes meios de cultivo sob iluminação contínua e temperatura de 25±3°C, durante 5 dias.....	31
Figura 11. Crescimento diametral do fungo <i>Phomopsis</i> sp. obtido de <i>Turnera subulata</i> em diferentes meios de cultivo sob escuro contínuo e temperatura de 25±3°C, durante 5 dias.....	31
Figura 12. Estrutura química do ergosterol, isolado do extrato n-hexânico da biomassa seca do fungo <i>Phomopsis</i> sp.....	33
Figura 13. Disposição dos fungos na placa teste para avaliação de antagonismo em meio BDA. 1) <i>Phomopsis</i> sp. e 2) Fitopatógenos: <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp., individualmente....	38
Figura 14. Crescimento micelial do fungo <i>Rhizoctonia</i> sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de 25 ± 3°C durante 5 dias. A) na presença do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Turnera subulata</i> (inoculado à esquerda da placa). B) placa inoculada somente com o fungo <i>Rhizoctonia</i> sp.....	39
Figura 15. Crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de 25 ± 3°C durante 5 dias. A) na presença do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Turnera subulata</i> (inoculado à esquerda da placa). B) Placa inoculada apenas com <i>Colletotrichum</i> sp.....	39
Figura 16. Crescimento do fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de 25 ± 3°C durante 5 dias. A) Na presença do endofítico <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Turnera subulata</i> (inoculado à esquerda da placa). Observar inibição da produção de pigmentação. B) Placa inoculada somente com o fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp. produzindo coloração escura.....	40
Figura 17. Crescimento micelial do fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp.(inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de 25 ± 3°C durante 5 dias. A) na presença do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. (inoculado à esquerda da placa) em placa com divisão do meio para verificar possível efeito de voláteis. B) Placa inoculada somente com o fungo <i>Pestalotiopsis</i> sp.....	37
Figura 18. Disposição dos discos de papel e/ou orifício na placa. 1) controle, 2-5) discos com extratos num grau de concentração decrescente.	47
Figura 19. Percentagem de atividade antioxidante (AAnt%) dos extratos em hexano e clorofórmio para o tempo de 30min, nas concentrações de	

10, 20, 30 e 40mg.mL ⁻¹	48
Figura 20. Percentual de DPPH remanescente nos tratamentos com extratos hexânico e clorofórmico a 40 mg.ml ⁻¹ e padrões ao longo de 60 minutos.....	48
Figura 21. Atividade antimicrobiana negativa (sem a presença de halos) do extrato hexânico do micélio de <i>Phomopsis</i> sp., endófito de <i>Turnera subulata</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA realizada mediante a técnica de PCR, com o objetivo de identificar molecularmente o endófito extraído da planta <i>Turnera subulata</i>	16
Tabela 2. Reagentes utilizados no preparo do MIX.....	17
Tabela 3. Reagentes utilizados para a amplificação das regiões ITS do fungo endofítico isolado de <i>Turnera subulata</i> L.....	17
Tabela 4. Protocolo de amplificação do rDNA (PCR) do fungo endofítico isolado de <i>Turnera subulata</i> L.	18
Tabela 5. Crescimento diametral de colônias do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. obtido de <i>Turnera subulata</i> submetidos a diferentes meios de cultura e estado de iluminação em um período de cinco dias de cultivo.	32
Tabela 6. Rendimento dos extratos de biomassa de <i>Phomopsis</i> sp. (30 dias) obtido de <i>Turnera subulata</i> em relação biomassa seca.....	33
Tabela 7. Tabela 7. Resultados da ressonância magnética nuclear de isótopo carbono ¹³ C do cristal obtido do extrato n-hexânico de biomassa seca de <i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Turnera subulata</i> e comparação com os dados de identificação do ergosterol obtidos por SHIRANE et al. (1996).....	34
Tabela 8. Tabela 8. Concentrações dos extratos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Agar-água;
AAnt – Atividade antioxidante;
AN – Ágar-Nutriente;
BD - Batata-dextrose;
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool;
BDA - Batata-Dextrose-Ágar;
BSA - Batata-Sacarose-Ágar;
CA - Cenoura-Ágar;
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
CZA - Czapek;
DNAr - DNA ribossômico;
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilidrazila;
FI - Frequência de Isolamento;
HRFABMS - Espectrometria de Massas de Alta Resolução de Bombardeamento Rápido de Átomos;
ITS - Espaços Internos Transcritos;
NCBI - National Center for Biotechnology Information;
pb – pares de bases;
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase;
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorfism;
RMN – Ressonância Magnética Nuclear;
TSA - Triptona-Soja-Ágar;
%AAnt - Percentual de Atividade Antioxidante.

RESUMO

Turnera subulata L. é uma planta pertencente à família Turneraceae e popularmente conhecida no Brasil como chanana. O gênero *Turnera* apresenta cerca de 120 espécies espalhadas nas Américas e África, sendo o mais representativo da família Turneraceae. Algumas espécies de *Turnera* são altamente utilizadas na medicina popular para diferentes tipos de doenças inflamatórias. A associação entre os seres vivos é uma condição vital para espécies incapazes de conseguirem, sozinhas, meios de sobrevivência como obtenção de nutrientes e defesas contra espécies predadoras. Entre os microrganismos, os fungos são os que se encontram mais frequentemente associados às plantas. Microrganismos endofíticos são os organismos que habitam órgãos de plantas sem causar dano aparente a seu hospedeiro. A partir dos fragmentos de folhas de *Turnera subulata* L. isolou-se um fungo filamentososo que foi identificado através de características morfológicas (morfo-culturais) e moleculares como sendo *Phomopsis* sp. O isolado obtido apresentou um crescimento superior nos meios BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e BSA (Batata-Sacarose-Ágar), com relações à cinco meios testados, sendo a presença de luz constante um fator de estímulo. Foi identificada por RMN a presença de ergosterol no extrato hexânico das células do *Phomopsis* sp. cultivado em meio líquido BD (Batata-dextrose). Em testes de antagonismo do endofítico *Phomopsis* sp. contra patógenos de plantas, observou-se halo de inibição deste frente a *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp. e *Pestalotiopsis* sp. Nos resultados da avaliação do percentual de atividade antioxidante dos extratos do micélio em hexano e clorofórmio pôde-se observar que extrato em hexano teve menor atividade que o extrato em clorofórmio. Os extratos hexânico, clorofórmico, acetato etílico e metanólico do micélio de *Phomopsis* sp. e o extrato acetato etílico do filtrado de cultura desse fungo isento de células não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*. Com este trabalho, portanto, podemos concluir que o *Phomopsis* sp. pode atuar como endófito de *T. subulata*, apresenta um melhor crescimento em meios BDA e BSA, bem como em presença de iluminação contínua, apresenta ergosterol em sua composição, é capaz de promover halo de inibição frente à alguns patógenos de plantas e que seus extratos celulares hexânico e clorofórmico apresentam uma pequena atividade antioxidante.

ABSTRACT

Turnera subulata L. is a plant belonging to the Turneraceae family and is popularly known in Brazil as chanana. The genus *Turnera* has about 120 species distributed in the Americas and Africa, being the most representative of the family Turneraceae. Some species of *Turnera* are highly used in popular medicine for different types of inflammatory diseases. The association between living beings is a vital condition for species unable to achieve alone, as a means of survival for obtaining nutrients and defenses against predatory species. Among the microorganisms, the fungi are those who are most often associated with plants. Endophytic are microorganisms that inhabit the bodies of plants that, at some period of their life cycle, colonize internal tissues of the plant, without causing any apparent damage to its host. From the fragments of leaves from *Turnera subulata* L. could be isolated a filamentous fungus that was identified as the fungus *Phomopsis* sp. through traditional microscopy and molecular techniques. In a statistical evaluation it was noted that the endophytic *Phomopsis* sp. presents a higher growth in BDA and BSA media, as well as in the presence of light. The steroid ergosterol could be isolated from the hexane extract of this fungus and identified by the NMR techniques. In tests of antagonism of the endophytic *Phomopsis* sp. against phytopathogens, it was observed halum of inhibition against *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp. and *Pestalotiopsis* sp. Concerning the antioxidant activity it was observed that the chloroform extract was more effective than the hexane one. On the other hand all the extracts from the mycelium of *Phomopsis* sp. and its ethylacetate extract from the cultured filtrate showed no antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*. Therefore it was concluded that *Phomopsis* sp. may act as endophytic of *T. subulata*. it has shown to grow best in BDA and BSA medium, as well as under continuous lightining. It produces and accumulates ergosterol in his micelium. It promotes inhibition zone of growth when tested against phytopathogens. His hexanic and chloroform extrat has shown very litte antioxidant activity.

CAPÍTULO 1. Aspectos gerais sobre a planta *Turnera subulata* L., microrganismos endofíticos e objetivos.

A planta *Turnera subulata* L.

Turnera subulata L. (Figura 1) é uma planta pertencente à família Turneraceae e popularmente conhecida no Brasil como chanana. Esta espécie é distribuída da Guiana até o sul do Brasil onde é considerada uma erva daninha. Esta planta ocorre em florestas tropicais, campos e jardins. Na medicina popular do Brasil, o chá de chanana é utilizado para o tratamento de doenças, principalmente das disfunções gástricas incluindo úlceras gástricas e duodenais. Varreduras fitoquímicas preliminares confirmaram que os flavonóides foram os principais constituintes do extrato aquoso de *T. ulmifolia* L., indicando dessa forma que tal extrato tem efeito antiulcerogênico (GRACIOSO et al., 2002).



Figura 1. Flor de *Turnera subulata*

Segundo Arbo (2004), a família Turneraceae possui 10 gêneros e por volta de 190 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo a América tropical o centro de diversidade destas espécies. O gênero *Turnera* apresenta cerca de 120 espécies espalhadas nas Américas e África, sendo o mais representativo da família Turneraceae. No Brasil, a *T. subulata* costuma ser

constantemente confundida com a *T. ulmifolia*, espécie não encontrada nesse país. (apud BARBOSA et al., 2007).

A *T. diffusa* (Willd.) Urb. conhecida como damiana em países como México, América Central e partes da América do Sul, é uma planta medicinal com várias aplicações tradicionais e reputação de afrodisíaca nestes países. Os óleos essenciais produzidos por esta planta são utilizados na medicina tradicional e para a preparação de licores e chá. A composição dos óleos essenciais de plantas selvagens e cultivadas utilizando métodos de micropropagação como cultivo de explantes em meio semi-sólido e suspensão celulares demonstraram diferenças qualitativas e quantitativas relevantes na constituição do seu óleo essencial, de modo que as plantas micropropagadas apresentaram uma maior uniformidade do que aquela encontrada em plantas selvagens. Os constituintes mais abundantes dos óleos foram os óxidos de cariofileno, cariofileno, δ -cadineno (provável indutor de testosterona), elemeno e o 1,8-cineol (provável indutor de uma hidroxilase da testosterona) (ALCARAZ-MELÉNDES et al., 2004).

Estudos *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Turnera ulmifolia* L. quanto a sua atividade antioxidante, realizados por Nascimento et al. (2006), apontam para uma eficiência significativa quando comparada com o α -tocoferol na mesma concentração. Esta alta atividade antioxidante para um extrato bruto indica claramente uma forte presença de substâncias responsáveis por esse efeito, as quais foram caracterizadas por análise em cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica como compostos fenólicos reduzidos. A presença de compostos fenólicos detectada neste extrato (12,35 mg de ácido tânico/ 100g de amostra), explica, portanto, suas propriedades antioxidantes. Os autores observam que nos modelos experimentais adotados a forte eficiência antioxidante observada no extrato hidroalcoólico deve-se à possível combinação de dois efeitos: um direto proveniente da atividade dos compostos fenólicos, que bloqueiam a formação de radicais, e uma indireta devido a outros compostos (e/ou os mesmos) que regeneram os radicais antioxidantes consumidos.

Algumas espécies de *Turnera* são altamente utilizadas na medicina popular para diferentes tipos de doenças inflamatórias. Em estudos feitos em ratos, foi revelado que o pré-tratamento com 250 e 500 mg.Kg⁻¹ da infusão liofilizada obtida da parte aérea de *T. ulmifolia* L. atenuou significativamente os danos inflamatórios

(colites) induzidos pelo ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) no intestino dos ratos testados. O efeito benéfico foi associado à melhora do estresse oxidativo intestinal (GALVEZ et al., 2006).

As interações entre fungos e plantas

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para espécies incapazes de conseguirem, sozinhas, meios de sobrevivência, como obtenção de nutrientes e defesas contra espécies predadoras. Entre os microrganismos, os fungos são os que se encontram mais frequentemente associados às plantas (ZOBERI, 1972)

Os fungos não produzem clorofila (são heterotróficos) e sua parede celular é constituída principalmente de quitina. Assim, para que ocorra o sucesso na sobrevivência é inevitável a sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas, ou de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente. Estas associações podem ser parasitárias, mutualistas ou comensais (RICHARDSON, 1999). Nas associações parasitárias, o fungo vive dentro da planta obtendo os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Neste caso, o metabolismo secundário do fungo de alguma forma é prejudicial à planta, pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas. O parasitismo está relacionado à patogenicidade e pode, eventualmente, causar a morte da planta hospedeira (AGRIOS, 1988). Diversos metabólitos secundários recém-acumulados pelas plantas são induzidos por microrganismos fitopatogênicos e são denominados fitoalexinas (PAXTON, 1981).

Em associações simbióticas o tamanho, o formato, a expectativa de vida e o estágio de maturidade sexual das plantas hospedeiras exercem um controle rígido sobre o crescimento do fungo de acordo com o modelo do hospedeiro (SAIKKONEN et al., 2007).

Aparentemente, o crescimento de fungos que vivem em uma relação de mutualismo com plantas é regulado pela ação hormonal e pela produção de outras substâncias, como quitinase, pelo hospedeiro. As variações sazonais nas plantas também podem regular o crescimento dos fungos (WARDLAW, 1990). A simbiose entre plantas e fungos pode ser notada pela proteção e nutrição que o hospedeiro

confere ao fungo que, em contrapartida, pode produzir uma diversidade de substâncias bioativas úteis ao hospedeiro, como reguladores de crescimento, antibióticos e inseticidas, propiciando uma vantagem competitiva contra diversos organismos na natureza (LU et al., 2000).

Os microrganismos endofíticos

No início do século XIX, o termo endofítico (ou endófito) foi utilizado pela primeira vez para definir os organismos que colonizam tecidos internos de plantas, mas foi De Bary, em 1866, quem estabeleceu inicialmente uma possível distinção entre eles e os fitopatógenos (AZEVEDO, 1998). Carroll (1986) restringiu o termo endofítico a organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo os fungos patogênicos e mutualistas, tais como micorrizas.

Petrini (1991) expandiu a definição de Carroll, incluindo todos os organismos que habitam órgãos de plantas que, em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos do vegetal, sem causar dano aparente a seu hospedeiro.

Ainda de acordo com Petrini (1991), estariam sendo considerados os endofíticos que apresentam uma fase epifítica um tanto longa, bem como patógenos latentes que podem viver assintomaticamente em seus hospedeiros por algum tempo em seu ciclo de vida. Os microrganismos endofíticos foram considerados patógenos assintomáticos, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, até o final da década de 1970. Porém, estudos posteriores revelaram propriedades interessantes, como proteção contra predadores e patógenos.

Strobel et al. (2002) afirma que há casos em que fungos endofíticos apresentam a habilidade de produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira. O primeiro exemplo mais marcante desta afirmação foi o isolamento do taxol do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado a partir de *Taxus brevifolia* (Taxaceae) (STIERLE et al., 1995). O Taxol ou paclitaxel é um potente agente antineoplástico e foi identificado inicialmente em *T. brevifolia* (WANI, 1971). Recentemente a vincristina, substância anticâncer, foi isolada a partir do fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado à *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004).

Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos (como antibióticos), imunossupressores, antitumorais, e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003). Alguns autores sugerem que certos fungos endofíticos produzem compostos igualmente presentes em suas plantas hospedeiras, como algumas enzimas (celulases e ligninases) em *Xylaria* sp., fatores de crescimento como a giberelina em *Fusarium moniliforme*, substâncias antitumorais como o taxol em *Taxomyces andreanae*, entre outros.

Existe a possibilidade de uma transposição de genes entre plantas e fungos em uma verdadeira engenharia genética *in vivo*. (AZEVEDO, 1998).

A ocorrência de microrganismos endofíticos

Possivelmente todos os vegetais apresentem em seu interior microrganismos endofíticos, até mesmo diversas espécies de microrganismos em um único hospedeiro. Alguns são mais freqüentes em determinado tipo de vegetal, chamados de dominantes, em contraposição a outros mais raros, chamados de secundários. Em alguns casos, constata-se uma especificidade endofítico-hospedeiro, em que poucas espécies de fungos são encontradas, enquanto na maioria dos casos uma variedade enorme de gêneros e espécies é observada (PEREIRA et al., 1993; GLIENKE, 1995; AZEVEDO, 1998).

A ocorrência de endófitos é bastante variada de acordo com o clima da região onde foi realizado o isolamento. A maioria dos estudos descreve a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado, que se revela bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997).

Os principais ou mais freqüentes grupos, gêneros e espécies de microrganismos endofíticos que têm sido descritos em vários trabalhos nos últimos anos, os fungos predominam em número de trabalhos na literatura científica, seguidos de bactérias e actinomicetos, não por isso menos importantes (PETRINI,

1991; FISHER; PETRINI; LAPPIN SCOTT, 1992; CHANWAY, 1996; HALLMANN et al., 1997; RODRIGUES; PETRINI, 1997; AZEVEDO, 1998; OKANE; NAKAGIRI; ITO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

O gênero *Colletotrichum* é frequentemente isolado como endofítico em uma variedade enorme de plantas. Araújo et al. (2001) observaram maior abundância de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium* sp. entre os isolados endofíticos de folhas e porta-enxertos de *Citrus*. Bussaban et al. (2001) isolaram fungos endofíticos de folhas, pseudocaules e rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Criab.), na Tailândia. *C. gloeosporioides*, *Glomerella* spp., *Xylaria* spp. e *Phomopsis* spp. foram os endofíticos dominantes. Camatti-Sartori et al. (2005) isolaram fungos endofíticos de folhas, flores e frutos de macieiras (*Malus domestica*) de três sistemas de cultivo diferentes (convencional, integrado e orgânico), no sul do Brasil, durante dois ciclos vegetativos. O cultivo orgânico proporcionou um maior número de isolados quando comparado ao integrado e convencional, e os gêneros mais freqüentes foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Botryosphaeria*, entre os fungos filamentosos, e *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*, entre as leveduras.

Photita et al. (2005) coletaram 34 isolados de *Colletotrichum* spp. que foram identificados e agrupados de acordo com a morfologia da colônia, tamanho e formato de apressórios e conídios, bem como análise molecular baseada em seqüências ITS, que correspondem a seqüências altamente conservadas em fungos de rDNA (DNA ribossômico).

Rubini et al. (2005) isolaram a comunidade de fungos endofíticos de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) resistentes e suscetíveis ao agente causal da vassoura da bruxa, o basidiomiceto *Crinipellis pernicioso*. Os endófitos foram identificados por características morfológicas e seqüenciamento de rDNA como pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cordyceps*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Xylaria*. Os autores identificaram ainda alguns endofíticos potencialmente antagonistas, destacando-se *Gliocladium catenulatum*, que reduziu em 70% a incidência da vassoura da bruxa *in vivo* em plântulas de cacau.

Santamaria e Bayman (2005) compararam comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas com folhas de café (*Coffea arabica* L.) em Porto Rico. Foram isolados 821 microrganismos agrupados em 131 morfoespécies. *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram os gêneros mais comuns entre os epifíticos, enquanto *Colletotrichum*, *Xylaria*, e *Guignardia* foram isolados com maior frequência entre os endofíticos. *Guignardia* não foi isolado como epifítico. Os autores observaram que fragmentos de folha com *Colletotrichum* são menos prováveis de conter *Xylaria* e *Guignardia* do que os sem *Colletotrichum*, sugerindo a possibilidade de competição ou antagonismo entre os endofíticos, ou seja, *Xylaria* pode estar restringindo o crescimento de *Colletotrichum*, importante patógeno de muitas plantas.

Microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais

Os microrganismos endofíticos são encontrados em muitas espécies de plantas medicinais. Em 1995, Stierle et al. relataram a presença do fungo *Taxomyces andreanae*, endofítico produtor de taxol e outros taxanos, que vive no interior da planta medicinal *T. brevifolia*, utilizada para o tratamento de câncer.

Lu et al. (2000) caracterizaram três novos metabólitos antimicrobianos de uma cultura do fungo *Colletotrichum* sp., endofítico isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L. (Asteraceae), produtora de artemisinina, droga antimalárica muito utilizada na China. Rodrigues, Hesse e Werner (2000) isolaram os fungos endofíticos *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* da planta medicinal *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). Corrado e Rodrigues (2004) isolaram o fungo *Phomopsis* sp. de pecíolos da mesma planta e de folhas de outra planta medicinal, a *Aspidosperma tomentosum*.

Wang et al. (2000) isolaram o fungo endofítico *Tubercularia* sp., linhagem TF5, da planta medicinal *Taxus mairei*, coletada na província de Fujian, sudeste da China. Os autores estudaram a atividade anticancerígena do taxol, um diterpeno produzido pela linhagem TF5, que interfere no processo de divisão celular, prevenindo a despolimerização da tubulina. Os resultados mostraram uma alta citotoxicidade *in vitro* diante de linhagens celulares cancerosas KB (carcinoma humano de epiderme) e P388 (leucemia em ratos). Por meio de técnicas de imunofluorescência e microscopia eletrônica, observaram resultados similares sobre

o mecanismo de ação do taxol autêntico (extraído da planta *Taxus* sp.), comparando-se com o taxol produzido pelo endofítico, como aumento da estabilidade dos microtúbulos e indução da polimerização da tubulina.

Zou et al. (2000) isolaram um fungo endofítico da planta *Artemisia mongolica* (Fisch. ex Bess.), da família Asteraceae, identificado como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., que produziu uma substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico.

Magalhães (2001) isolou endofíticos de folhas e segmentos nodais de *Himatanthus sucuuba* Spruce, espécie medicinal nativa da Região Amazônica pertencente à família Apocynaceae, cujo látex é utilizado como agente antitumoral, antiinflamatório, antifúngico, vermífugo e antianêmico. Foram encontrados e identificados os seguintes gêneros: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Glomerella*, *Pestalotia* e *Xylaria*. O gênero *Guignardia* foi escolhido para o estudo da variabilidade genética, por se tratar de um grupo de endofíticos freqüente em hospedeiros tropicais e potencialmente úteis na triagem de microrganismos produtores de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Um total de 50 isolados de *Guignardia* sp. foram utilizados sendo 30 isolados de *H. sucuuba* pertencentes a área da Reserva Florestal do Campus Universitário, 10 da Reserva Florestal Adolpho Ducke e 10 pertencentes a outros hospedeiros (*Copaifera multijuga* Hayne, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* e *Palicourea marcovii* St. Hill).

Shrestha et al. (2001) constataram a produção de paclitaxel pelos fungos endofíticos *Sporormia minima* e *Trichothecium* sp., isolados da planta medicinal *Taxus wallichiana*, da região do Nepal, Índia.

Gao et al. (2005) avaliaram uma comunidade de fungos endofíticos de *Heterosmilax japonica* Kunth., planta medicinal reconhecida na China por seus efeitos diuréticos, por meio de análises moleculares de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) e ITS de rDNA. Os autores observaram uma grande variedade de fungos colonizando o interior das plantas, entre eles *Mycosphaerella*, *Phomopsis*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Botryosphaeria* e *Guignardia*. Os autores verificaram maior abundância de populações endofíticas em amostras coletadas na primavera do que no verão, constatando uma flutuação sazonal para os endofíticos de *H. japonica*.

Objetivo geral

- O presente trabalho tem como objetivo isolar e identificar um fungo endofítico de folhas de *Turnera subulata*, avaliar a atividade de antagonismo frente a fungos parasitas de plantas, bem como a atividade antioxidante e antimicrobiana de seus extratos.

Objetivos específicos

- Isolar um fungo endofítico de *Turnera subulata*;
- Identificar morfológicamente, através de técnicas de microscopia, e molecularmente, através do sequenciamento de regiões rDNA o endófito isolado;
- Identificar o melhor meio de cultura, dentre cinco meios clássicos utilizados para crescimento de fungos, bem como as condições de luminosidade ou ausência de luz contínua para uma maior produção de biomassa;
- Avaliar os extratos do fungo endófito isolado do fungo em diferentes solventes, tentando identificar estruturas de cristais, caso sejam obtidos;
- Realizar testes de antagonismo do endófito obtido frente a fungos fitopatogênicos conhecidos;
- Verificar uma possível atividade antioxidante de extratos celulares, bem como de extratos do meio do endófito, obtidos com diferentes solventes;
- Verificar uma possível atividade antimicrobiana de extratos do micélio e do meio de cultura, obtidos com diferentes solventes, frente a microrganismos patogênicos humanos conhecidos.

CAPITULO 2. Isolamento e identificação do fungo endofítico

***Phomopsis* sp. de *Turnera subulata* L.**

Introdução

Os microrganismos endofíticos podem ser detectados no interior de tecidos vegetais por meio de microscopia ótica (WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993) ou eletrônica (VIRET; PETRINI, 1994), ou, ainda, por métodos sorológicos (SINCLAIR, 1991).

O processo de isolamento de endófitos envolve cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, os epífitos. A desinfecção da superfície das folhas, caules e outros órgãos vegetais é uma etapa fundamental para o adequado isolamento destes microrganismos. Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfetante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares para a adequação da metodologia de isolamento de forma que apenas os microrganismos epifíticos, mas não os endofíticos, sejam eliminados (BLANCO, 1999).

Os meios de cultura devem ser apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos. Também podem ser utilizados meios específicos que permitem o crescimento de apenas um determinado tipo de microrganismo que se deseja isolar em particular. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, a temperatura de incubação das placas para o isolamento, além da recorrência do isolado, revelando o seu verdadeiro estado endofítico (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998).

Esta etapa do trabalho teve como objetivo isolar o endófito da planta *Turnera subulata* sadia e realizar a identificação morfológica através da observação

microscópica e a identificação molecular, através do sequenciamento das regiões ITS do rDNA, que correspondem a sequências altamente conservadas em fungos.

Material e métodos

Todo o trabalho de genética e biologia molecular foi executado no Laboratório de Genética Forense do Museu de História Natural com a colaboração do Prof. Luiz Antônio Ferreira da Silva, sob o meu acompanhamento.

Preparo dos meios de cultura para o isolamento

Ágar-Água (AA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se água destilada e ágar (1% do volume final). A mistura foi aquecida em microondas até completa dissolução e esterilizada em autoclave à pressão média de 1KgF/cm^2 (121°C) durante 15 minutos.

Batata-Dextrose (BD)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se 20% de batata inglesa, água destilada e 2% (do volume final) de glicose. A batata foi cozida em cerca de 200ml de água destilada e em seguida filtrada através de camada dupla de algodão. A glicose foi adicionada ao caldo obtido e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8 e então esterilizada em autoclave à pressão média de 1KgF/cm^2 (121°C) durante 15 minutos.

Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se 20% de batata inglesa, 1,5% de ágar, água destilada e 2% (do volume final) de glicose. A batata foi cozida em em cerca de 200ml de água destilada, em seguida filtrada através de camada dupla de algodão. A glicose foi adicionada ao caldo obtido e o volume final da solução

completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8 e então esterilizada em autoclave à pressão média de 1KgF/cm^2 (121°C) durante 15 minutos.

Isolamento dos fungos endofíticos de *Turnera subulata* L.

Amostras de *Turnera* sp., coletadas na região urbana de Maceió e enviadas para o Instituto do Meio Ambiente, foram identificadas (registro MAC 34615 - ver ANEXO 1) como sendo da espécie *Turnera subulata*.

Folhas de *Turnera subulata* sadias, isto é, sem sintomas de doenças ou injúrias mecânicas, foram coletadas na região urbana de Maceió e trazidas ao Laboratório de Biotecnologia de Plantas e Microrganismos Endofíticos da Universidade Federal de Alagoas, onde foram prontamente lavadas com água corrente por cerca de uma hora. Todo o material, então, foi desinfectado superficialmente através do seguinte protocolo: 1º) Banho do material vegetal em álcool na concentração de 70% (v/v) por um minuto; 2º) Banho deste material em hipoclorito de sódio na concentração de 0,20% a 0,25% (p/v) acrescido de duas gotas de detergente comercial por vinte minutos e 3º) Em câmara de fluxo laminar, remoção total do Hipoclorito de sódio através da lavagem em água destilada estéril (por 3×).

A eficiência da desinfecção foi avaliada inoculando-se 100 μL , da última água de lavagem do material vegetal, em placa de Petri contendo o meio BDA. O crescimento de microrganismos nesta placa mostra que a desinfecção não foi eficiente.

As folhas desinfectadas superficialmente foram cortadas em secções de área de 1cm^2 , aproximadamente. O material vegetal foi introduzido em número de três fragmentos por frasco contendo meio ágar-água, totalizando vinte frascos.

Cálculo da frequência de fungos endofíticos

Após incubação durante sete dias foram contados os fragmentos com aparecimento de endofíticos. A frequência de isolamento (FI) foi estimada com a fórmula, $FI = FF/NT$, na qual FF é o número de fragmentos com fungos e NT é o número total de fragmentos utilizados.

Purificação dos fungos endofíticos

De cada colônia dos microrganismos foi tomada uma amostra do micélio vegetativo e esta foi inoculada em meio BDA durante 5 dias sob luz contínua e temperatura de 25°C (\pm 3°C) para isolamento do fungo. Análise morfológica macroscópica do desenvolvimento da cultura dos isolados foi utilizada para verificação de sua pureza.

Identificação do isolado fúngico

Preparação de lâminas

Prepararam-se esfregaços do isolado até então desconhecido. Em condição estéril, sob lâminas de microscopia, fixando-se os mesmos com lactofenol e azul de metileno. As culturas utilizadas apresentavam 30 dias de incubação.

Microcultivo

Devido à dificuldade de esporulação do isolado, em função do meio utilizado que possuía poucos aminoácidos, o microcultivo foi realizado utilizando-se: placas de Petri com lâminas e lamínulas em seu interior sobre um canudo com formato de um triângulo equilátero e um papel filtro no fundo, sendo estes esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos. Na câmara de fluxo foram retirados cubos de BDA com 1cm³ e colocados sobre a lâmina, um fragmento do micélio foi inoculado nas bordas do cubo com um leve contato, então se colocou uma lamínula e 1mL de água destilada estéril foi adicionado sobre o papel filtro para manter a umidade. Estas placas foram vedadas (num total de seis placas, sendo três cultivadas no escuro e três no claro) e mantidas sob temperatura de 25°C (\pm 3°C) por 8 dias.

Identificação molecular do isolado

Extração do DNA do fungo endofítico

O fungo endofítico isolado de *Turnera subulata* L. foi cultivado em 100mL de meio líquido BD (Batata Dextrose), contidos em frascos de Erlenmayer (250mL), a temperatura de 23 a 25°C, sem agitação por quatro dias (devido ao crescimento lento). Tais amostras foram encaminhadas ao Laboratório de DNA Forense do Museu de História Natural da Universidade Federal de Alagoas para que fossem realizadas a extração do DNA e o posterior sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 (espaços internos transcritos 1 e 2, respectivamente) do rDNA.

O micélio do isolado *Phomopsis* sp. foi separado do meio de cultura através de centrifugação por 10 (dez) minutos a 7000 rpm (após o quarto dia de crescimento) e, aquele foi submetido à extração de DNA seguindo o protocolo CTAB (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1995). Logo após, o DNA extraído foi estocado a 4°C.

Amplificação e sequenciamento das regiões ITSs

A amplificação do rDNA foi realizada mediante a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados *primers* específicos, conforme descrito por Write et al. (1990), ITS₁ ou *primer 1*, ITS₂ ou *primer 2*, ITS₃ ou *primer 3* e ITS₄ ou *primer 4*, indicados na Tabela 1, para amplificação das regiões ITS1 e ITS2. Cada *primer* utilizado foi diluído à uma concentração de 20 pmolL⁻¹. Os reagentes e as concentrações utilizadas são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA realizada mediante a técnica de PCR, com o objetivo de identificar molecularmente o endófito extraído da planta *Turnera subulata*.

ITS ₁	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS ₂	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'
ITS ₃	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'
ITS ₄	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Tabela 2. Reagentes utilizados no preparo do MIX

Reagentes (mistura inicial –MIX)	Volumes
BSA (concentração inicial 50 mgml ⁻¹)	48µL (concentração final 0,4ngµL ⁻¹)
Tampão 10X	600µL
MgCl ₂ (concentração inicial 50 mM)	180µL (concentração final 1,5 mM)
dNTPs (concentração inicial 25 mM)	48µL
H ₂ O	324µL
Total	1200µL

Para realizar a PCR, foi necessário preparar uma segunda mistura de reagentes, seguindo a Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes utilizados para a amplificação das regiões ITS do fungo endofítico isolado de *Turnera subulata* L.

Reagentes	Volumes
MIX 5X	20µL
H ₂ O	78µL
<i>Primers</i>	1 + 1 µL
Taq polimerase	1 µL
Total	100 µL

Para cada PCR foram utilizados 20 µL da segunda mistura de reagentes, acrescentado-se a cada tubo 1 µL de DNA do volume previamente extraído.

A PCR foi feita utilizando o *kit BigDye Terminator v3.1*, conforme recomendações do fabricante, em termociclador TC-412 (Techne, UK) e os ciclos conforme o protocolo de amplificação descritos na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Protocolo de amplificação do rDNA (PCR) do fungo endofítico isolado de *Turnera subulata* L.

Procedimento	Temperatura e nº de ciclos	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	5 minutos
	35 ciclos	
Desnaturação	94°C	1 minuto
Anelamento	59°C	30 segundos
Polimerização	72°C	30 segundos
Polimerização final	72°C	5 minutos

Os fragmentos produzidos foram separados por eletroforese capilar em sequenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyser, utilizando o polímero POP6 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A análise dos eletroferogramas foram feitas utilizando o programa *SeqScape* v2.5. A seqüência mista obtida apresentou 515 nucleotídeos e foram analisadas através do programa BLASTn do NCBI, que permitiu a comparação percentual de similaridade encontrada com os dados disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information). (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Resultados e discussão

A partir dos fragmentos de folhas de *T. subulata* L. (Figura 2) foi possível isolar, numa frequência de 60%, um fungo filamentososo que foi identificado através de métodos clássicos de microscopia (Figura 3) e moleculares como sendo o fungo *Phomopsis* sp.

Gomes (2008) isolou *Phomopsis* sp. de pecíolos de *Maytenus ilicifolia* (Espineira Santa) e folhas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira Vermelha), numa frequência de 10% e 11%, respectivamente.

O gênero *Phomopsis* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotin, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales, família Valsaceae, Valsaceae mitosporico. Apresenta-se na forma anamórfica, sendo o seu teleomorfo o gênero *Diaporthe* (HANLIN e MENEZES, 1996). Espécies do gênero *Phomopsis* são comumente encontradas como patógenos e endofíticos de plantas

(BODDY e GRIFFITH, 1989). Tradicionalmente, o gênero tem sido considerado altamente patogênico (REHNER e UECKER, 1994). Contudo, algumas espécies de *Phomopsis* são endófitos mutualísticos (WEBBER e GIBBS, 1984; CARROLL, 1986).

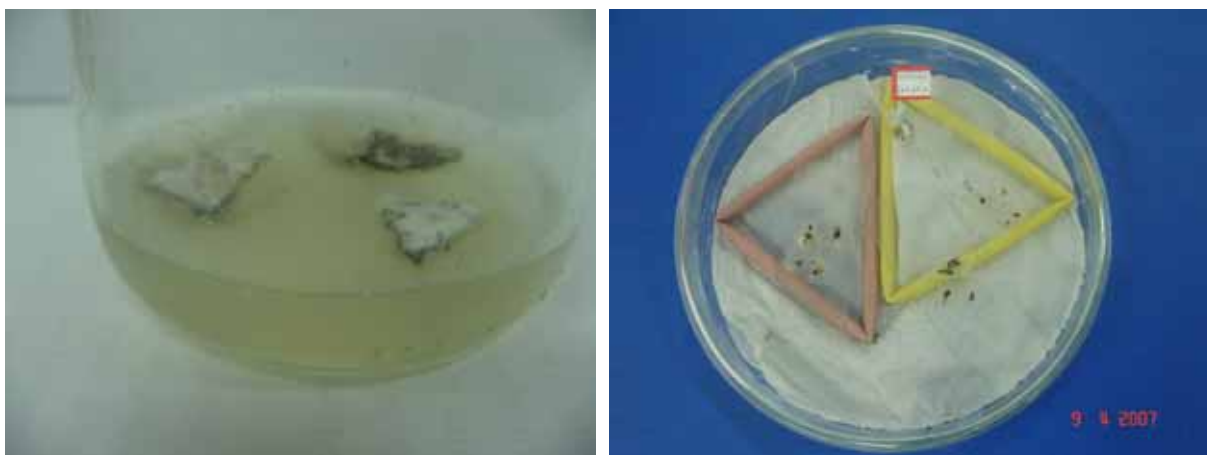


Figura 2. A) Fragmentos de folhas de *Turnera subulata* L. em meio AA apresentando micélio de fungos endofíticos na superfície do limbo foliar. B) Placa de Petri contendo lâminas de microcultura em meio BDA prontas para a visualização das microestruturas do fungo endofítico isolado em microscópio ótico.

A ausência de sintomas de doença no material vegetal coletado de *T. subulata* L. para o isolamento, aliado ao tratamento de desinfecção superficial bem sucedido, fato este comprovado pela manutenção da esterilidade da placa com meio BDA após aplicação de uma alíquota da última água de lavagem dos fragmentos foliares, evidencia o estado endofítico do isolado de *Phomopsis* sp. obtido de *T. subulata* L.

Esse gênero já foi isolado como um endofítico em várias culturas vegetais como em *Theobroma cacao* L. (RUBINI et al., 2005), *Spondias mombin* L. (RODRIGUES, HESSE e WERNER, 2000), *Aspidosperma tomentosum* (CORRADO e RODRIGUES, 2004), *Himatanthus sucuuba* Spruce (MAGALHÃES, 2001), *Heterosmilax japonica* Kunth (GAO et al., 2005), entre outras.

A técnica de microcultura foi eficiente para a visualização em microscópio óptico das microestruturas características do fungo, como os conídios α , encontrados em grande quantidade (Figura 3) (BARNETT e HUNTER, 1972).

Segundo Barnett e Hunter (1988), a formação de picnídios escuros, com ostíolo em forma de pera, conidióforos simples, conídios hialinos com gotas nas extremidades, predominantemente elipsóides, sem septos, unicelulares de forma ovóide (alfa conídio) medindo 3,0 - 7,2 x 1,56 - 2,52 μm e hialinos, sem gotas, filiformes, a maioria curvos em uma das extremidades, sem septos (beta conídio) medindo 8,4 - 33,6 x 1,2 - 1,56 μm , caracterizam o fungo *Phomopsis* sp.

A ausência de conídios β poderia levar a uma suspeita de outro gênero de fungo filamentoso, o *Phoma*, que apresenta também conídios α , mas esse gênero foi descartado com a identificação molecular através da comparação das sequências de nucleotídios das regiões ITS do fungo isolado com outras sequências de *Phomopsis* registradas no banco de dados do NCBI. (www.ncbi.nlm.nih.gov).

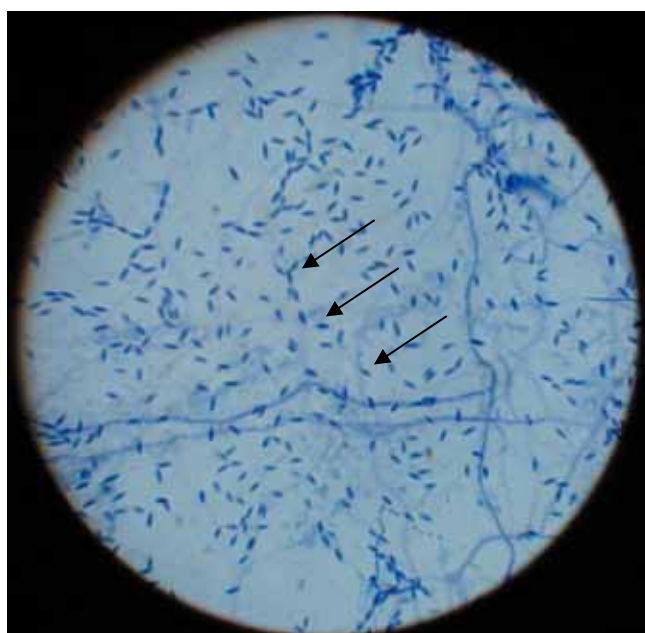


Figura 3. Presença de conídios α (setas) característicos do gênero *Phomopsis* em microcultura corada com azul de metileno. Aumento de 40x.

Portanto, a partir dos fragmentos de micélio utilizados para a análise molecular foi possível confirmar a identificação do gênero *Phomopsis*. Para a identificação da espécie há a necessidade de técnicas mais específicas como as utilizadas por Zhang et al. (1998), que trabalhou com isolados endofíticos de plantas de soja, sendo estes analisados conforme suas características morfoculturais (tipos de corpos de frutificação e de conídios avaliados de isolados coletados de ramos e

sementes de soja) e moleculares. As culturas foram identificadas como *P. longicolla*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, *D. phaseolorum* var. *meridionalis* e *D. phaseolorum* var. *sojae*. Marcadores moleculares para esses grupos foram desenvolvidos e analisados usando PCR-RFLP, sequenciamento do DNA da região ITS do rDNA 5.8S. Os *primers* ITS₄ e ITS₅ amplificaram os produtos da PCR de todos os isolados estudados. O gel de eletroforese dos produtos não digeridos da PCR e o sequenciamento do DNA produziram fragmentos de vários comprimentos, incluindo 604 bp para o *P. longicolla*, 602 e 603 bp para *D. phaseolorum* var. *caulivora*, 603 bp para *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, e de 597 a 609 bp para *D. phaseolorum* var. *sojae*. A digestão destes produtos de PCR com enzimas *AluI*, *HhaI*, *RsaI* e *SacI* resultou em bandas distintas para identificação de *P. longicolla* e das variedades de *D. phaseolorum* I. (ZHANG *et al.*, 1998).

O fragmento das regiões ITS do isolado fúngico obtido neste trabalho de *T. subulata* apresentou 439 pb (pares de bases) dispostas da forma a seguir:

```
5'CCCTTTGTGAACTTATACCTATTGTTGCCTCGGCGTAGGCCGGCCTCTTCACTGA
GGCCCCCTGGAAACAGGGAGCAGCCCGCCGGCGGCCAACTAACTCTTGTTTCTA
TAGTGAGTCTCTGAGTAAAAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCT
CTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCC
GGAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGG
GGCACTGCCTTCTAGCGAGGGCAGGCCCTGAAATCTAGTGCGAGCTCGCTAGGA
CCCCGAGCGTAGTAGTTATATCTCGTTCTGGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTGCCG 3'
```

Utilizando a ferramenta de bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, esta sequência foi comparada com as demais seqüências para esta região existentes e registradas no banco de dados do programa para isolados de *Phomopsis* e *Diaporthe*, sendo obtidas, com isso, as figuras 4 e 5. Também foi possível, através dessa ferramenta, a obtenção de uma árvore dicotômica da seqüência obtida neste trabalho (indicada anteriormente) comparada com as seqüências do banco de dados do NCBI, como podemos observar na figura 6.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ480356.1	Phomopsis sp. NR-2006-D53 18S ribosomal RNA gene, partial se	789	789	100%	0.0	99%
AY148440.1	Diaporthe sp. 36-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; ir	789	789	100%	0.0	99%
DQ235677.1	Phomopsis sp. TSM-2005-11 18S ribosomal RNA gene, partial sei	789	789	100%	0.0	99%
DQ235669.1	Phomopsis sp. TSM-2005-03 18S ribosomal RNA gene, partial sei	789	789	100%	0.0	99%
EU301113.1	Diaporthe phaseolorum strain MUCC219 18S ribosomal RNA qen	784	784	100%	0.0	98%
AY577815.1	Diaporthe phaseolorum strain E99382 18S ribosomal RNA gene,	784	784	100%	0.0	98%
AY745022.1	Phomopsis lonqicolla strain STAM-26 18S ribosomal RNA gene, p	784	784	100%	0.0	98%
AY745020.1	Phomopsis lonqicolla strain STAM-33 18S ribosomal RNA gene, p	784	784	100%	0.0	98%
AY050627.1	Phomopsis sojæ internal transcribed spacer 1, partial sequence;	784	784	100%	0.0	98%
AF001020.2	Diaporthe phaseolorum strain pssp5 internal transcribed spacer :	778	778	100%	0.0	98%
AY705839.1	Diaporthe helianthi strain HUNA internal transcribed spacer 1, pa	778	778	100%	0.0	98%
DQ480353.1	Phomopsis sp. NR-2006-D15 internal transcribed spacer 1, partia	774	774	98%	0.0	99%
DQ235673.1	Phomopsis sp. TSM-2005-07 18S ribosomal RNA gene, partial sei	771	771	100%	0.0	98%
AY050628.1	Phomopsis sp. KM-2001 internal transcribed spacer 1, partial seq	765	765	99%	0.0	98%
DQ235676.1	Phomopsis sp. TSM-2005-10 18S ribosomal RNA gene, partial sei	758	758	100%	0.0	97%
DQ235668.1	Phomopsis sp. TSM-2005-02 18S ribosomal RNA gene, partial sei	758	758	100%	0.0	97%
DQ159945.1	Phomopsis sp. XSC002 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	756	756	100%	0.0	97%
DQ145734.1	Diaporthe sp. XZ-18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	756	756	100%	0.0	97%
EF687936.1	Phomopsis sp. VeqaE4-63 18S ribosomal RNA gene, partial sequi	754	754	100%	0.0	97%
AB247182.1	Phomopsis sp. MAFF 238472 genes for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2	754	754	100%	0.0	97%
EF423532.2	Diaporthe sp. P051 internal transcribed spacer 1, partial sequenc	752	752	100%	0.0	97%
AJ582961.1	Uncultured Valsaceae 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene,	750	750	100%	0.0	97%
EF687933.1	Phomopsis sp. VeqaE2-24 18S ribosomal RNA gene, partial sequi	749	749	100%	0.0	97%
EU196746.1	Diaporthe phaseolorum isolate ZJ4 18S ribosomal RNA gene, par	749	749	100%	0.0	97%

Figura 4. Comparação da seqüência obtida neste trabalho com as seqüências do banco de dados genômicos do NCBI. O resultado apresentou uma cobertura de 100% com outras seqüências de fungos do gênero *Phomopsis* quanto *Diaporthe* sendo que as quatro primeiras apresentaram uma identidade máxima de 99%. Estas seqüências foram constituídas de três do gênero *Phomopsis* (fase anamórfica) e uma do gênero *Diaporthe* (fase teleomórfica).

```

> [gb|DQ480356.1] Phomopsis sp. NR-2006-D53 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and
28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=581

Score = 789 bits (427), Expect = 0.0
Identities = 436/440 (99%), Gaps = 2/440 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CCCTTTGTGAACTTATACCTA-TTGTTCGCTCGGCGTAGGCCGGCCTCTTCACTGAGGCC 59
      |||
Sbjct 70 CCCTTTGTGAACTTATACCTATTGTTCGCTCGGCGTAGGCCGGCCTCTTCACTGAGGCC 129

Query 60 CCCTGGAAACAGGGAGCAGCCCGCGCGGCCAACTAAACTCTTGTTTCTATAGTGAGTC 119
      |||
Sbjct 130 CCCTGGAGACAGGGAGCAGCCCGCGCGGCCAACTAAACTCTTGTTTCTATAGTGAATC 189

Query 120 TCTGAGTAAAAAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT 179
      |||
Sbjct 190 TCTGAGT-AAAAAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT 248

Query 180 CGATGAAGAAGCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC 239
      |||
Sbjct 249 CGATGAAGAAGCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC 308

Query 240 GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC 299
      |||
Sbjct 309 GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC 368

Query 300 ATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGGGGCACTGCCTTCTAGCGAGGGCAGGCCCT 359
      |||
Sbjct 369 ATTTCAACCCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGGGGCACTGCCTTCTAGCGAGGGCAGGCCCT 428

Query 360 GAAATCTAGTGGCGAGCTCGCTAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCTCGTTCTGGAAG 419
      |||
Sbjct 429 GAAATCTAGTGGCGAGCTCGCTAGGACCCCGAGCGTAGTAGTTATATCTCGTTCTGGAAG 488

Query 420 GCCCTGGCGGTGCCCTGCCG 439
      |||
Sbjct 489 GCCCTGGCGGTGCCCTGCCG 508

```

Figura 5. Representação da comparação da sequência de bases da região ITS do rDNA (5.8S) do isolado fúngico obtido de *Turnera subulata* neste trabalho com uma da mesma região do rDNA (5.8S) do grupo *Phomopsis* registrada no banco de dados do NCBI. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#58396904>).(GbDQ480356.1) *Phomopsis* sp. NR-2006-D53 sequência parcial do gene de RNA ribossômico 18S; ITS1, 5.8S gene do RNA ribossomal, e sequência completa do ITS2; e sequencia parcial gene do RNA ribossomal 28S; comprimento = 581

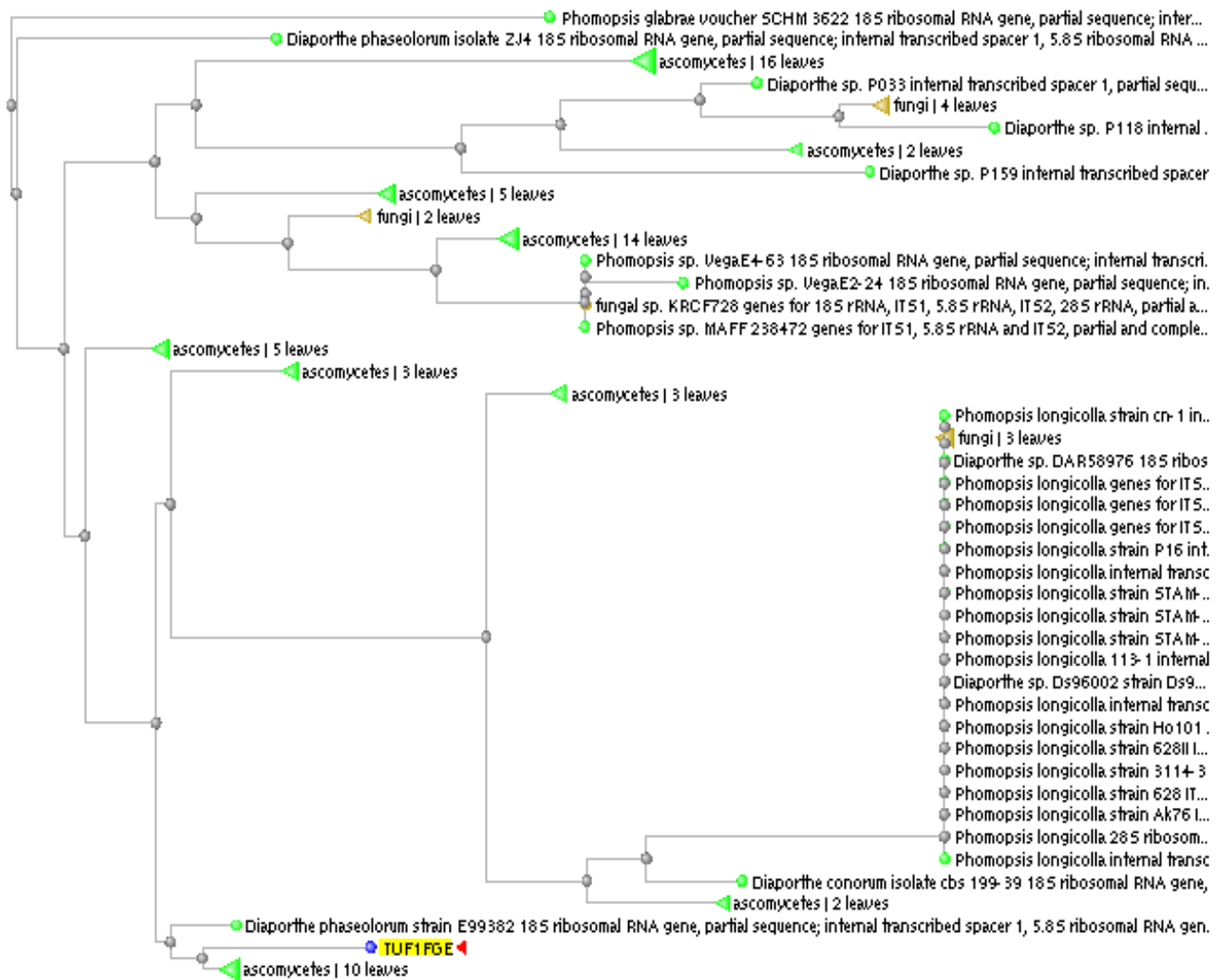


Figura 6. Árvore dicotômica obtida através da inserção da sequência de bases da região ITS do rDNA obtida do isolado fúngico de folhas de *Turnera subulata* neste trabalho e comparação com o banco de dados do NCBI. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/blast_tree_view.cgi?request=page&rid=69R2RS9H01R&queryID=|c|16369&distmode=on&screenWidth=1024). Identificado como *Phomopsis* sp (teleomorfo *Diaporthe* sp).

Portanto, segundo métodos morfológicos, de microscopia e moleculares, concluímos que o endófito isolado de *Turnera subulata* corresponde ao *Phomopsis* sp.

CAPÍTULO 3. Produção de biomassa, preparo dos extratos e prospecção química a partir do micélio de *Phomopsis* sp.

Introdução

Os meios de cultura são substratos naturais ou sintéticos utilizados no cultivo de muitos microrganismos, inclusive os fungos. Existe uma gama de meios de cultivo utilizados para atender as exigências nutricionais das diferentes espécies de fungos encontrados na natureza. Algumas espécies necessitam de substâncias específicas para seu crescimento e reprodução (MENEZES e ASSIS, 2004).

A escolha de um meio de cultivo apropriado para o crescimento do microrganismo em que se trabalha e a obtenção de compostos de interesse é uma etapa importante, já que muitas substâncias isoladas são obtidas em contextos específicos, como ausência de alguns nutrientes (CLARDY e WALSH, 2004).

Segundo Demain (1999), cerca de 100.000 metabólitos secundários com peso molecular inferior a 2.500 têm sido caracterizados e destes, metade é proveniente de microrganismos. Estima-se que somente 5% das espécies de fungos estejam descritas e grande parte destes fungos não foram avaliadas em bioensaios para detecção de atividade biológica (PEARCE, 1997). Entre as espécies descritas só 16% (em torno de 11.500) têm sido cultivadas (DEMAIN, 1999).

Os fungos endofíticos são microrganismos ainda muito pouco explorados e que constituem uma enorme diversidade de espécies que habitam diversas plantas existentes e se inserem no contexto para a descoberta de novas substâncias com variabilidade química e biológica (CLARDY e WALSH, 2004)

Um exemplo de um novo composto de atividade antimicrobiana isolado por Horn et al. (1995) é a fomopsicalasina (phomopsichalasin – ver Figura 7), substância isolada de cultivo *in vitro* do fungo endofítico *Phomopsis* sp. crescido em meio de cultivo de trigo.

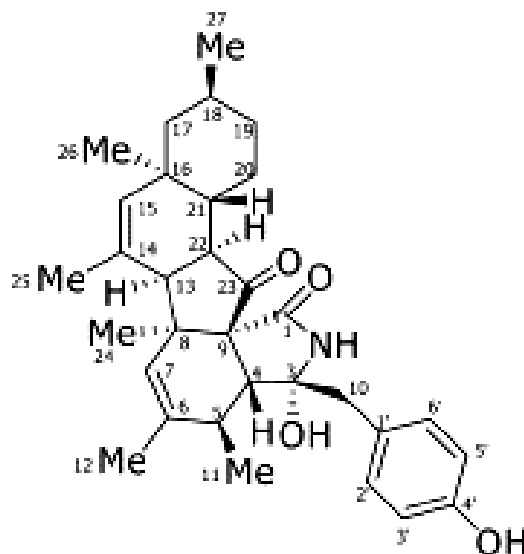


Figura 7. Estrutura da fomopsicalasina (phomopsichalasin).

Li et al. (2008), pela primeira vez, isolaram quatro terpenos do tipo A-*seco*-oleano do filtrado da cultura do fungo *Phomopsis* sp. (estirpe HK10458) oriundo da planta *Hibiscus tiliaceus*. Os terpenos foram chamados de ácido 3,4-*seco*-oleano-11,13-dieno-4,15 α ,22 β ,24-tetraol-3-oíco, ácido 3,4-*seco*-oleano-11,13-dieno-4,7 β ,22 β ,24-tetraol-3-oíco, ácido 3,4-*seco*-oleano-13-en-4,7,15,22,24-pentaol-3-oíco, e ácido 3,4-*seco*-oleano-13-eno-4,15,22,24-tetraol-3-oíco. Triterpenóides do tipo oleano são raramente encontrados em fungos, mas são frequentemente isolados de plantas terrestres. O endofítico *Phomopsis* sp. deve ter obtido a maquinária biossintética do esqueleto oleano da planta hospedeira durante a evolução. Os A-*seco*-oleanos em um endofítico pode atuar em um importante papel na proteção da planta hospedeira contra infecções ambientais.

O objetivo desta etapa do trabalho foi identificar o melhor meio de cultura para produção de biomassa pelo endófito *Phomopsis* sp., bem como as condições de luminosidade ou ausência de luz para uma maior produção de biomassa, avaliar os extratos do fungo em diferentes solventes e tentar identificar estruturas de cristais possivelmente obtidos.

Material e métodos

Meios de cultivo para a produção de biomassa

Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

O meio de cultura foi preparado conforme descrito previamente no capítulo 2 deste trabalho.

Batata-Sacarose-Ágar (BSA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se 20% de batata inglesa, 1,5% de ágar, água destilada e 2% (do volume final) de sacarose. A batata foi cozida em água destilada, em seguida filtrada através de camada dupla de algodão. A sacarose foi adicionada e o volume final da solução completado. Esta teve seu pH aferido para 5,8 e então esterilizada em autoclave à pressão média de 1KgF/cm² (121°C), durante 15 minutos.

Triptona-Soja-Ágar (TSA)

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se triptona 1,5%, soja 0,5%, NaCl 0,5%, ágar 1,5% e água destilada 96%. Este teve seu pH aferido para 5,8 e então esterilizado em autoclave à pressão média de 1KgF/cm² (121°C), durante 15 minutos.

Czapek (CZA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se: sacarose 0,3%, K₂HPO₄ 0,1%, NaNO₃ 0,2%, MgSO₄·7H₂O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO₄·7H₂O 0,001%, ágar 1,5% e água destilada (aproximadamente 97,8%). Este teve seu pH aferido para 5,8 e então

esterilizado em autoclave à pressão média de 1KgF/cm² (121°C), durante 15 minutos.

Cenoura-Ágar (CA)

O meio de cultura foi preparado utilizando-se 2% de cenoura triturada, 1,5% de ágar e água destilada 96,5%. A cenoura triturada foi mergulhada em água durante uma hora e em seguida a mistura foi fervida durante 5 minutos. O caldo foi filtrado com uma gaze e misturado ao ágar previamente fundido em água destilada. Este teve seu pH aferido para 5,8 e então esterilizado em autoclave à pressão média de 1KgF/cm² (121°C), durante 15 minutos.

Avaliação do crescimento do *Phomopsis* sp. em diferentes meios sólidos.

Na identificação do meio mais adequado para o crescimento do isolado *Phomopsis* sp. foram realizados ensaios com cinco diferentes meios (BDA, BSA, CA, CZA e TSA) na presença ou ausência de luz. Para a análise, foi instalado um experimento fatorial 5×2 num delineamento inteiramente casualizado com dado espaço constituído de um diâmetro ortogonal do crescimento do micélio fúngico e cinco réplicas por tratamento.

Inicialmente, foram preparados discos fúngicos com 5 mm de diâmetro com micélio crescido em meio AA (ágar-água) por 5 dias sob luz contínua e temperatura de 25°C (±3°C). Os discos foram depositados no centro das placas de Petri contendo cada tratamento e foram feitas duas marcações perpendiculares no verso das placas (5 por parcela), onde foram realizadas medições diárias do crescimento diametral (ortogonal) do isolado para a confecção de curvas de crescimento. Foi realizada análise de variância dos tratamentos utilizando o teste F e as médias (do 5º dia) foram comparadas pelo teste de Tukey.

Obtenção de biomassa e dos extratos

Foram preparados 40 frascos contendo 100mL de meio BD, preparado conforme descrito no capítulo 2, e inoculados com um disco fúngico com cerca de 5

mm de diâmetro e mantidos no escuro, sem aeração, à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ para a produção de biomassa. Após 30 dias de cultivo, a biomassa foi filtrada e levada à secagem em estufa a 45°C até apresentar massa seca constante (o que ocorria em aproximadamente 10 dias).

A biomassa seca (16g) foi extraída, através de maceração, com n-hexano ($5 \times 250\text{mL}$), clorofórmio ($5 \times 250\text{mL}$), acetato de etila ($5 \times 250\text{ mL}$) e metanol ($5 \times 250\text{ mL}$), conforme a Figura 8. As soluções foram concentradas em evaporador rotatório a uma temperatura de 60°C para cada solvente (50% a 55% para o metanol), como mostra a Figura 8.

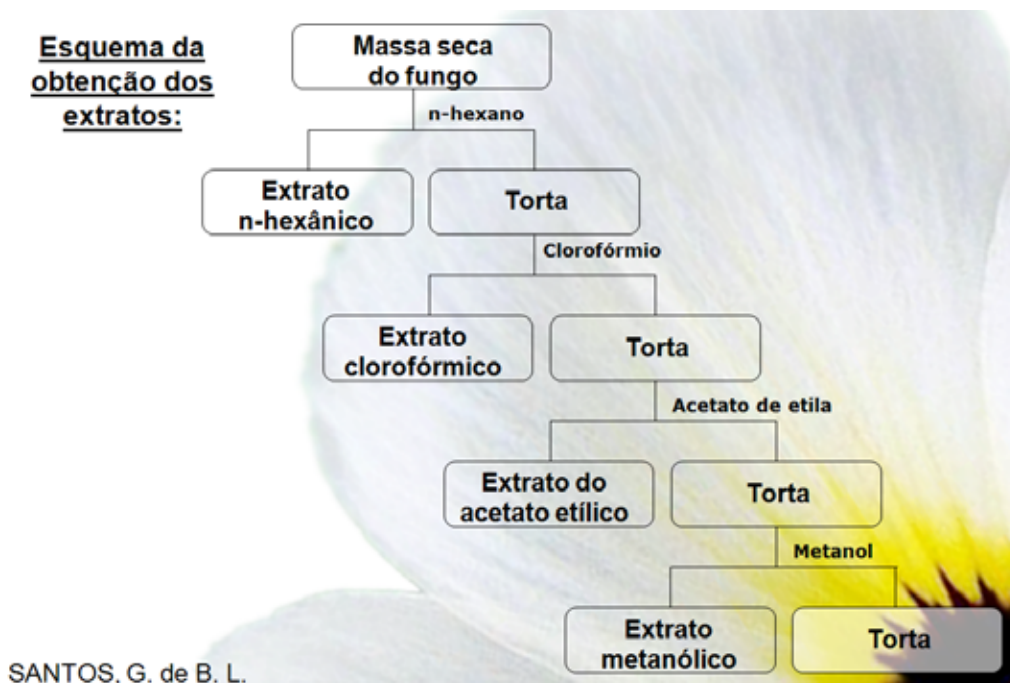


Figura 8. Fluxograma indicando os passos realizados no procedimento utilizado para obtenção dos extratos celulares do endófito *Phomopsis* sp. obtido de *Turnera subulata*.

Após o preparo do extrato n-hexânico, evidenciou-se a presença de cristais. Foi realizada a purificação dos cristais. Nela, a separação das fases líquida e sólida foi feita de forma manual e o cristal foi diluído novamente. Após a cristalização do mesmo e antes da evaporação total do solvente, retirou-se a fase sólida. O cristal foi enviado para realização de ressonância de carbonos, com a contribuição do Prof. Dr. Edson Bento, do Laboratório de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, no Centro de Ciências Exatas e Naturais, Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas.

Resultados e discussão

O crescimento diametral das colônias de fungo *Phomopsis* sp. foi analisado em diferentes meios de cultivo e na presença e ou ausência de luz (Figuras 9, 10 e 11).

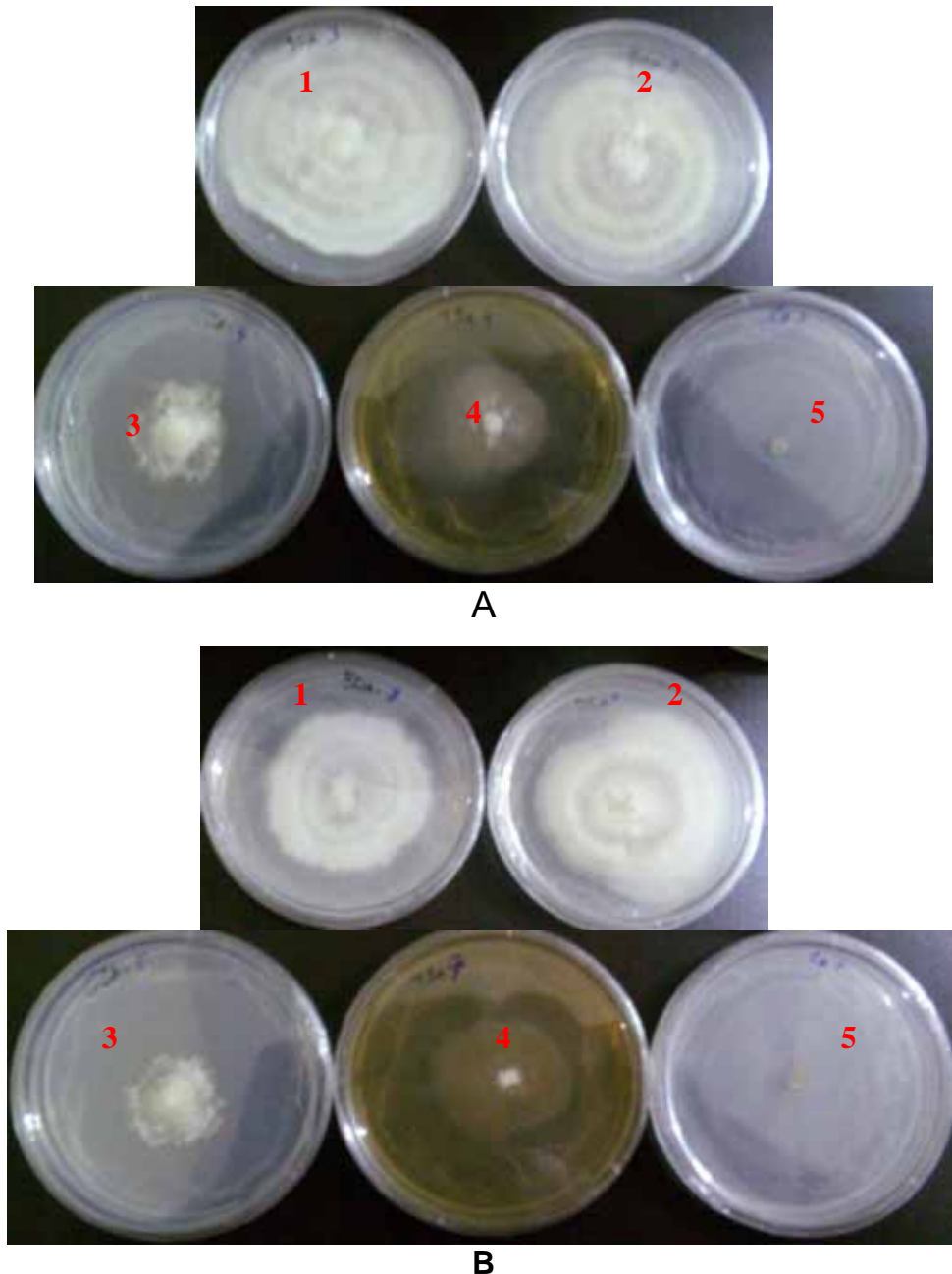


Figura 9. Colônias do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* crescidas em placas de Petri contendo diferentes composições de meio de cultivo. Sequência: 1- Batata-dextrose-ágar (BDA), 2- Batata-sacarose-ágar (BSA), 3- Czapek (CZA), 4- Triptona-soja-ágar (TSA) e 5- Cenoura-ágar (CA). A) Colônias crescidas em presença de luz. B) Colônias crescidas na ausência de luz.

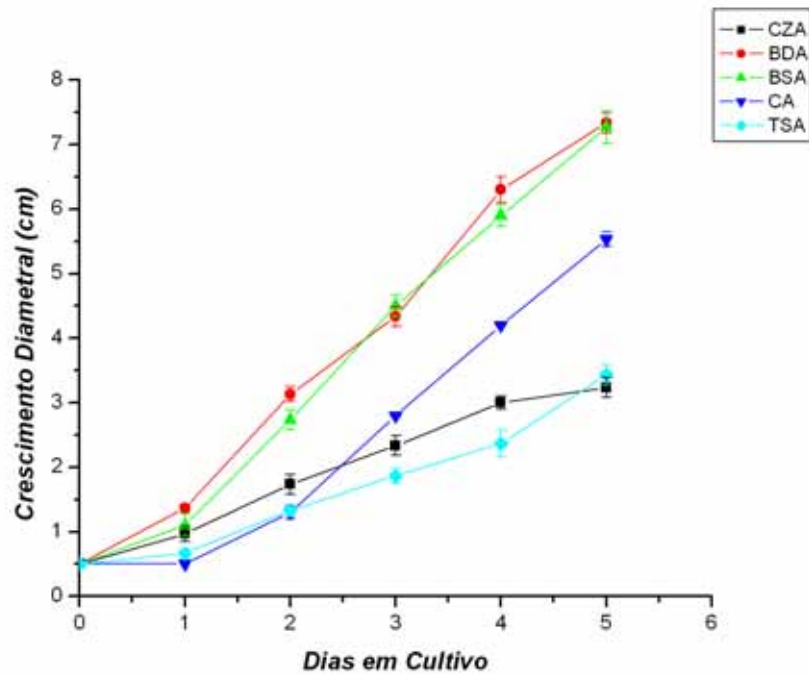


Figura 10. Crescimento diametral do fungo *Phomopsis* sp. obtido de *Turnera subulata* em diferentes meios de cultivo sob iluminação contínua e temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 5 dias.

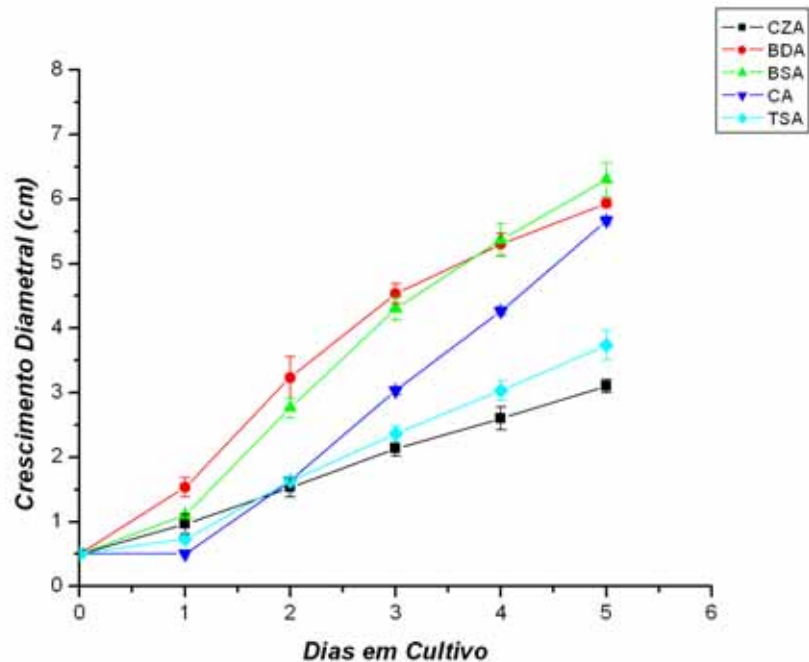


Figura 11. Crescimento diametral do fungo *Phomopsis* sp. obtido de *Turnera subulata* em diferentes meios de cultivo sob escuro contínuo e temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 5 dias.

Na seleção de um meio de cultivo que propiciasse um crescimento mais expressivo de biomassa fúngica, dois meios foram estatisticamente diferentes dos demais, isto é, o meio BDA e o BSA, que não diferiram muito estatisticamente entre si. Quando foi observado o efeito da luz no crescimento diametral, foi constatado que em geral o fungo *Phomopsis* sp. Cresce mais rapidamente sob luz constante do que quando submetido a ausência total da luz, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Crescimento diametral de colônias do fungo endofítico *Phomopsis* sp. obtido de *Turnera subulata* submetidos a diferentes meios de cultura e estado de iluminação em um período de cinco dias de cultivo.

Meios de cultura	Luminosidade		Média*
	Claro*	Escuro*	
BDA	7.33 Aa	5.93 Ab	6.63 A
BSA	7.26 Aa	6.36 Bb	6.81 A
CA	5.53 Ba	5.66 Ba	5.60 B
CZA	3.23 Ca	3.10 Ca	3.16 D
TSA	3.43 Cb	3.73 Da	3.58 C
Média*	5.36 a	4.96 b	

*Letras iguais maiúsculas entre linhas e minúsculas entre colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Após o cultivo por 30 dias em meio líquido para aumento de biomassa do isolado, com rendimento total aproximado de 16g de biomassa seca do isolado de *Phomopsis* sp. (cerca de 0,4g por 100mL de meio de cultivo), foram obtidos as seguintes quantidades de extratos: em n-hexano, 1,68g, em clorofórmio, 1,28g, em acetato de etila, 0,72g e em metanol, 1,92g, apresentando um rendimento aproximado, da soma dos extratos, de 35% de biomassa total seca (Tabela 6).

Tabela 6. Rendimento dos extratos de biomassa de *Phomopsis* sp. (30 dias) obtido de *Turnera subulata* em relação biomassa seca.

Isolado	Solvente	Peso seco (g)	Rendimento (%)
<i>Phomopsis</i> sp (16g)	n-hexano	1,68	10,5
	Clorofórmio	1,28	8,0
	Acetato de etila	0,72	4,5
	Metanol	1,92	12,0
Total			35,0

No espectro de RMN do ^{13}C dos cristais obtidos a partir do extrato n-hexânico foi possível detectar a presença de 28 carbonos. A análise dos carbonos e a comparação com os dados da literatura (Tabela 7) indicaram ser a molécula purificada a estrutura do ergosterol (Figura 12), esteróide comum em membranas de fungos.

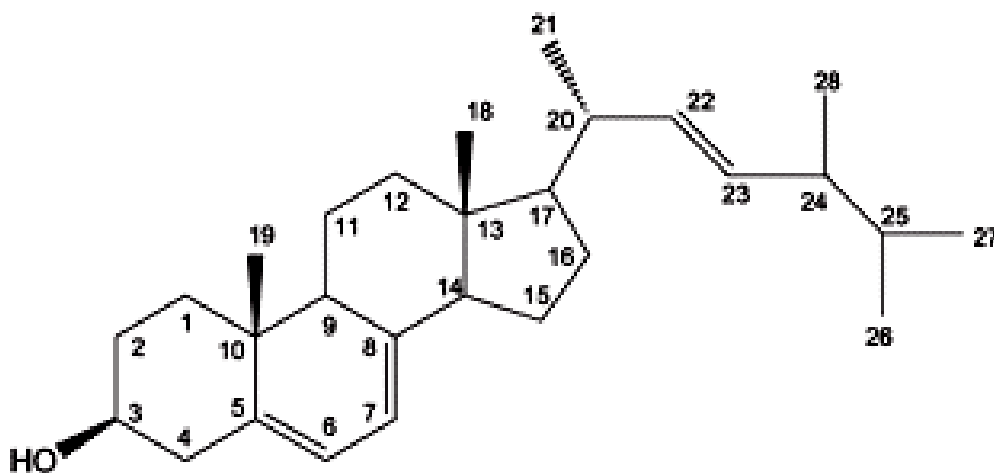


Figura 12. Estrutura química do ergosterol, isolado do extrato n-hexânico da biomassa seca do fungo *Phomopsis* sp.

Tabela 7. Resultados da ressonância magnética nuclear de isótopo carbono ^{13}C do cristal obtido do extrato n-hexânico de biomassa seca de *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* e comparação com os dados de identificação do ergosterol obtidos por SHIRANE et al. (1996).

Carbono	Valor obtido	Ergosterol (SHIRENE et al., 1996)
1	38,37	38,3
2	31,98	32
3	70,46	70,4
4	40,78	40,8
5	139,79	139,8
6	119,59	119,6
7	116,29	116,3
8	141,37	141,3
9	46,25	46,2
10	37,02	37,0
11	21,10	21,1
12	39,08	39,1
13	42,82	42,8
14	54,55	54,5
15	23,00	23,0
16	28,30	28,2
17	55,71	55,7
18	12,05	12,0
19	16,29	16,2
20	40,44	40,4
21	21,11	21,1
22	135,57	135,5
23	131,97	132,0
24	42,82	42,8
25	33,09	33,1
26	19,70	19,9
27	19,65	19,6
28	17,60	17,6

O ergosterol, provavelmente constituinte da membrana plasmática do fungo, é uma substância que já foi isolada de outros fungos endofíticos como o *Rhizoctonia* sp. (SANTOS, 2001) e *Pestalotiopsis microspora* (LI et al., 1998) e em fungos utilizados na alimentação humana como o *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum*. Ma et al. (2004) observaram atividade inibitória mínima de ergosterol contra *Helicobacter pylori* em uma concentração de 30,0 µg.mL⁻¹.

Guimarães (2006) isolou ergosterol de extratos obtidos a partir de fungos endofíticos de *Viguiera arenaria* (Asteraceae).

Rukachaisirikul et al. (2008) isolaram três metabólitos do fungo endofítico *Phomopsis* sp. PSU-D15 denominados de fomoenamida, fomonitroéster e deacetilfomoxantona B. Estes foram isolados juntos com três compostos conhecidos: dicerandrol A, (1S,2S, 4S)-*p*-mentano-1,2,4-triol e uridina.

Horn et al. (1995) isolaram o agente antimicrobiano fomopsicalasina do fungo endofítico *Phomopsis* sp. fermentado em meio de cultivo de trigo. Fomopsicalasina representa o primeiro composto citocalasin com um sistema de três anéis em lugar do anel citocalasin macrolídico.

As outras frações de extratos obtidos nesta etapa ainda estão sendo estudadas.

Com esta etapa, foi possível concluir que o fungo *Phomopsis* sp., endófito isolado de *Turnera subulata*, cresce melhor nos meios BDA (batata-dextrose-ágar) e BSA (batata-sacarose-ágar), quando comparado com o crescimento que ocorre nos meios Czapek (CZA), Triptona-soja-ágar (TSA) e Cenoura-ágar (CA), bem como apresenta também um melhor crescimento em presença de iluminação contínua. Foi possível também detectar a presença de ergosterol no extrato n-hexânico da biomassa seca do fungo isolado.

CAPITULO 4. Antagonismo entre o fungo endofítico *Phomopsis* sp. e fungos filamentosos.

Introdução

A produção de metabólitos por fungos tem elevada importância ecológica em interações químicas com outros organismos. Neste sentido, é importante o estabelecimento de relações entre organismos vizinhos, as quais podem ser classificadas como: neutra, simbiótica ou antagônica. Na relação antagônica, um dos integrantes da associação sofre efeito negativo em função da presença do outro organismo, o qual produz substâncias tóxicas que interferem no crescimento e reprodução (MENEZES e ASSIS, 2004).

A seleção de microrganismos antagônicos pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. Vários trabalhos publicados abrangem uma seleção inicial ensaiada em laboratório, para posteriormente testar *in vivo*, no campo ou em casa de vegetação, sob condições controladas (MARIANO, 1993). Os métodos de seleção *in vitro* disponíveis podem ser qualitativos e quantitativos. Em geral, os qualitativos são realizados simultaneamente ao isolamento dos antagonistas, com a finalidade de abreviar o processo de seleção. A partir de amostras de solo supressivo ou de órgãos vegetais sadios, utilizam-se suspensões em solução tampão ou água esterilizada, diluídas em série ou concentradas por centrifugação.

A partir destas metodologias, os antagonistas são pré-selecionados para ensaios quantitativos. Para a seleção de biocontroladores, os métodos qualitativos são menos frequentemente utilizados que os quantitativos. Entre os quantitativos, estão os métodos do ágar em placa, do ágar em lâmina e do meio líquido, sendo preferencialmente usados os de ágar em placa.

Dependendo dos objetivos do estudo, pode-se optar pelos métodos da cultura pareada, do papel celofane, da placa sobreposta, da camada dupla ou do líquido metabólico. O método da cultura pareada, também conhecido como pareamento, é o

mais comumente utilizado em estudos de antagonismo *in vitro*. Consiste em diversas formas de plaqueamento de antagonista e fitopatógeno em placas de Petri contendo meio de cultivo adequado ao crescimento de ambos os microrganismos.

Em se tratando de dois fungos, deve-se observar a taxa de crescimento, a fim de que ocorra igualdade de condições competitivas. Outros fatores que podem influenciar são o tipo e a espessura do meio de cultura, bem como a temperatura de incubação. De acordo com MARIANO (1993), existem várias formas de pareamento, entre elas estão os de discos de ágar que consiste na deposição em um ou mais pontos da placa de Petri, de um cilindro de ágar contendo as estruturas do provável antagonista e do patógeno. Decorrido o período de incubação, observa-se e mensura-se o crescimento micelial do patógeno, bem como os diferentes tipos de interação (sobreposição de micélio, lise, vacuolação de hifas, formação de clamidósporos, etc).

O objetivo desta etapa do trabalho foi detectar atividade de antagonismo do endófito *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* frente aos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp.

Material e métodos

Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

O meio de cultura BDA foi produzido conforme descrito no capítulo 2 deste trabalho.

Teste de antagonismo

O isolado *Phomopsis* sp. foi avaliado como antagonista, frente aos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp., gentilmente obtidas do laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas. Para tanto, utilizou-se o método de cultura pareada em placa de Petri contendo meio de cultivo BDA (MARIANO, 1993).

Assim, discos de micélio (5mm de diâmetro) do antagonista *Phomopsis* sp. e de cada fitopatógeno individualmente, foram depositados em pólos opostos nas

placas de Petri, a 1cm da borda interna dos meios (Figura 13). Estas culturas mantidas no escuro a temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias. Cada ensaio foi constituído de cinco réplicas num delineamento inteiramente casualizado. Para “testemunha” foram inoculados discos de micélio dos fitopatógenos em uma base e, na oposta apenas meio BDA. Após incubação, investigou-se a presença de halo de inibição do crescimento micelial dos fungos patogênicos em relação ao endófito.

A fim de se investigar a possibilidade de produção de substâncias inibidoras voláteis pelo endófito, foram testados os isolados patogênicos utilizando o método de DICK e HUTCHINSON (1966), com algumas modificações. Ao invés das placas sobrepostas, foram usadas placas onde se retirou o meio de cultura formando uma divisória, impedindo assim o contato direto entre o antagonista e o patógeno. Foram ensaiados os fungos *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp.

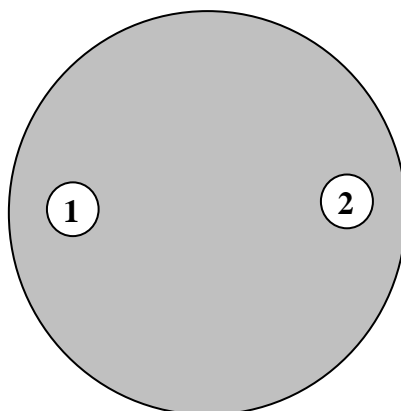


Figura 13. Disposição dos fungos na placa teste para avaliação de antagonismo em meio BDA. 1) *Phomopsis* sp. e 2) Fitopatógenos: *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp., individualmente.

Resultados e discussão

Nos testes de antagonismo do endofítico *Phomopsis* sp. contra patógenos de plantas, observou-se produção de halo de inibição deste frente a *Rhizoctonia* sp. (Figura 14), *Colletotrichum* sp. (Figura 15) e *Pestalotiopsis* sp. (Figura 16).

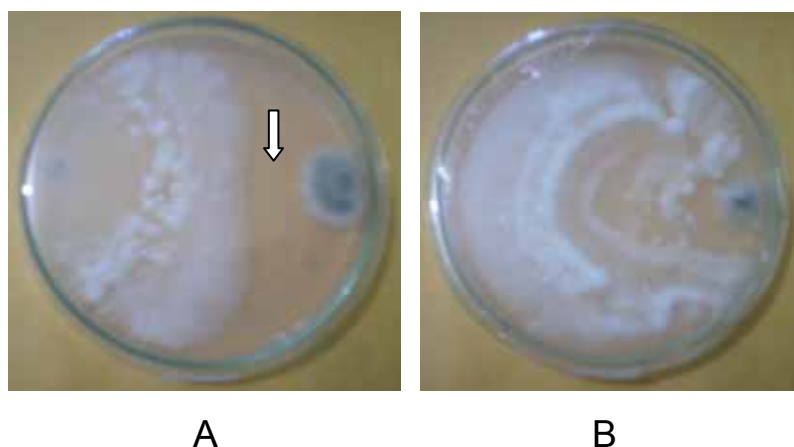


Figura 14. Crescimento micelial do fungo *Rhizoctonia* sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 5 dias. A) na presença do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* (inoculado à esquerda da placa). B) placa inoculada somente com o fungo *Rhizoctonia* sp.

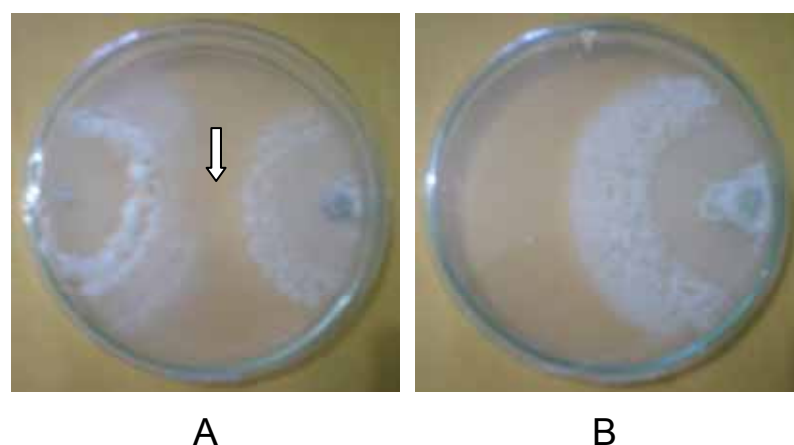


Figura 15. Crescimento micelial do fungo *Colletotrichum* sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 5 dias. A) na presença do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* (inoculado à esquerda da placa). B) Placa inoculada apenas com *Colletotrichum* sp.

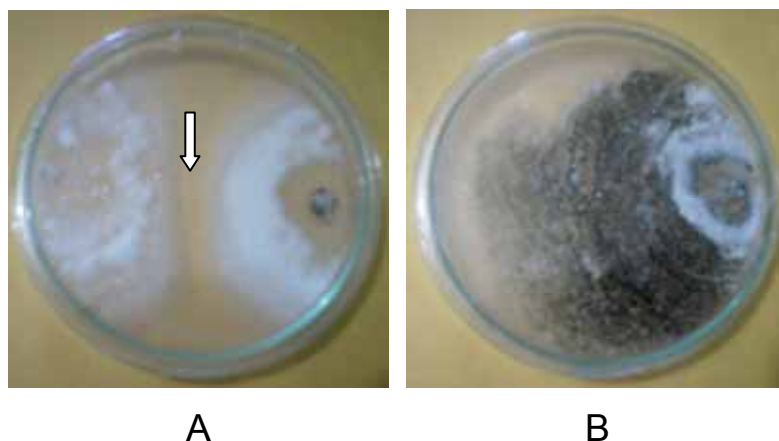


Figura 16. Crescimento do fungo *Pestalotiopsis* sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 5 dias. A) Na presença do endófito *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* (inoculado à esquerda da placa). Observar inibição da produção de pigmentação. B) Placa inoculada somente com o fungo *Pestalotiopsis* sp. produzindo coloração escura.

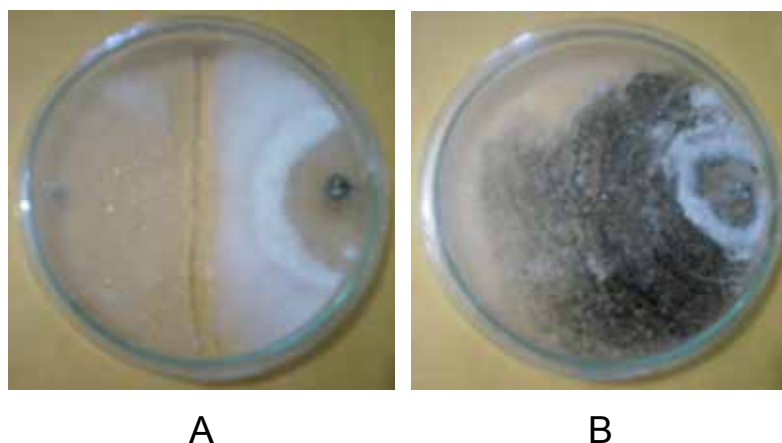


Figura 17. Crescimento micelial do fungo *Pestalotiopsis* sp. (inoculado à direita da placa) no escuro a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 5 dias. A) na presença do fungo endófito *Phomopsis* sp. (inoculado à esquerda da placa) em placa com divisão do meio para verificar possível efeito de voláteis. B) Placa inoculada somente com o fungo *Pestalotiopsis* sp.

O endófito *Phomopsis* sp. foi capaz de inibir o crescimento de *Rhizoctonia* sp. (Figura 14), provavelmente devido a um antagonismo por espaço e nutrientes. Este fato foi evidenciado, pois houve formação de halo de inibição por pareamento. Este tipo de experimento, não verificou se a ação antagonista foi devido à produção de voláteis, sendo necessária a realização de um procedimento para tentar detectar a possível ação de voláteis. Desta forma, não se pode sugerir que o endófito produz

substâncias bioativas voláteis contra o patógeno *Rhizoctonia* sp. O mesmo resultado foi observado para *Colletotrichum* sp. (Figura 15). O endofítico *Phomopsis* sp. não foi capaz de reduzir o crescimento de *Pestalotiopsis* sp, contudo promoveu alterações morfológicas, impedindo a produção de pigmentos (Figura 16). Por isso foi realizado o procedimento de avaliação do crescimento dos fungos em antagonismo utilizando placas com divisão de meio (Figura 17), onde obtivemos o mesmo resultado. Este fato que merece melhor investigação em trabalhos futuros, principalmente envolvendo alterações na taxa de esporulação deste fungo. Pode-se sugerir que este efeito inibitório foi produzido por algum composto volátil, já que não houve contato direto entre os fungos.

Moretto et al. (2001) demonstraram que houve inibição de *Colletotrichum acutatum* por *Trichoderma* spp., tanto em cultura pareada, quanto pela produção de metabólitos tóxicos. Neste trabalho foi observada inibição no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. quando este foi submetido a uma cultura pareada com o isolado *Phomopsis* sp.

Rodrigues; Hesse e Werner (2000) pesquisaram a bioatividade de extratos de fungos endofíticos isolados da planta *Spondias mombin* L. (cajazeiro). Estes extratos, incluindo o de *Phomopsis* sp., apresentaram atividade contra actinomicetos.

De acordo com Bell et al. (1982) a redução do crescimento micelial e diminuição da esporulação do patógeno podem ser devido ao micoparasitismo direto pelos antagonistas e produção de antibióticos que podem interferir no desenvolvimento do fitopatógeno.

Melo e Faull (2000) observaram parasitismo de *Trichoderma harzianum* e *T. koningii* sobre *R. solani* impedindo o crescimento micelial deste fungo. O estudo mostrou baixa ou nenhuma presença de substâncias antibióticas presentes no momento da inibição. Neste trabalho foi observada inibição do crescimento de *Rhizoctonia* sp por *Phomopsis* sp.

Gomes (2008) estudando atividade antagônica por isolados de *Phomopsis* sp., endofíticos de plantas medicinais, através de cultura pareada, observou significativa inibição do crescimento do fitopatógenos como *Guignardia* sp.

O gênero *Phomopsis* é um grupo de fungos com elevado potencial biotecnológico. Isso se deve à produção de metabólitos secundários como alcalóides

com capacidades farmacológicas, tais como fomopsinas (COCKRUM, PETERSON e EDGAR, 1994) e 2,4-diidroxí-5,6-dimetil benzoato de etila e fomopsilactona, que exibiram forte atividade antifúngica contra fitopatógenos, produzidos por *Phomopsis cassiae* endofítico de *Cassia specatabilis* (SILVA et al., 2005).

Além da produção de antimicrobianos, fungos endofíticos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico, por competição, como relatado por Bao e Lazarovits (2001). Como o isolado *Phomopsis* sp., endófito de *Turnera* sp., apresentou significativa atividade antagônica contra os fitopatógenos testados, aquele pode apresentar grande potencial no controle biológico de doenças de plantas.

Durante a realização da etapa de cultivo do *Phomopsis* sp., evidenciamos que o mesmo produz um volátil de odor agradável, lembrando muito o cheiro de flores. É importante a realização de pesquisas futuras com o objetivo de identificar este volátil, bem como sua possível ação contra outros organismos.

Estão sendo desenvolvidas pesquisas para avaliar o efeito de frações dos extratos acetatos etílicos do endófito *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata* frente a fungos fitopatogênicos, para verificar a possível existência de compostos relacionados ao antagonismo.

Os resultados sugerem que o antagonismo existente entre os fungos fitopatogênicos observados e o endófito *Phomopsis* sp. deve ser por espaço e nutrientes.

Com isso, podemos concluir que *Phomopsis* sp. é capaz de promover halo de inibição frente aos patógenos de plantas: *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp. e *Pestalotiopsis* sp., o que sugere ação de antagonismo.

CAPITULO 5. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos do fungo endofítico *Phomopsis* sp.

Introdução

Nas interações entre plantas e endofíticos, os microrganismos muitas vezes produzem e induzem a produção de metabólitos primários e secundários no hospedeiro que podem conferir diversas vantagens à planta hospedeira tais como o controle de outros microrganismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES e DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993)

Nestas interações, foram encontrados diversos compostos que apresentaram bioatividade, como nos bioensaios utilizando frações do extrato orgânico proveniente da cultura de *Phomopsis longicolla* fungo isolado como endofítico em plantas de menta *Dicerandra frutescens*. Tais frações apresentaram os dicerandros A, B e C. Exaustivos experimentos utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução de Bombardeamento Rápido de Átomos (HRFABMS) conduziram à identificação de um novo antibiótico de cor amarela e compostos citotóxicos como as 2,2'-dimerico tetrahidroxantonas (WAGENAAR e CLARDY, 2001).

O ácido Hidroxipropiônico foi isolado de extratos obtidos pelo fracionamento guiado pela bioatividade de culturas submersas de vários fungos endofíticos de órgãos aéreos de plantas. Este composto mostrou atividade nematocida seletiva contra o nematóide parasita de plantas, *Meloidogyne incognita*,. Este composto foi obtido dos fungos *Phomopsis phaseoli* isolado de folhas de uma árvore tropical e de quatro estirpes de *Melanconium betulinum* isolado de brotos de *Betula pendula* e *B. pubescens* na Alemanha. Este foi o primeiro relato do ácido 3-hidroxipropiônico em fungos e de sua atividade nematocida deste metabólito (SCHWARZ et al., 2004).

O objetivo desta etapa do trabalho foi verificar a atividade antioxidante dos extratos celulares n-hexânicos e clorofórmicos do endófito *Phomopsis* sp. isolado de *Turnera subulata*, bem como a atividade antimicrobiana destes frente aos

microrganismos patogênicos humanos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Material e métodos

Avaliação Qualitativa do Potencial Antioxidante

Para avaliação do potencial antioxidante frente ao radical estável sintético DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), alíquotas dos extratos em n-hexano e clorofórmio foram aplicadas individualmente em cromatoplasas (gel de sílica, Merck) e eluídas em sistemas de solventes adequados. Após eliminação do solvente à temperatura ambiente e aplicação do padrão [(+)-catequina (Sigma)], as cromatoplasas foram submersas, durante 10 s, em solução metanólica 0,4 mM do radical sintético DPPH. Após secagem dos cromatogramas à temperatura ambiente, o aparecimento de manchas esbranquiçadas sob um fundo violeta nas posições dos fatores de retenção (R_fs) de cada substância, quando comparado com o padrão, sugeriu a atividade antioxidante positiva.

Avaliação Quantitativa do Potencial Antioxidante

O método utilizado para avaliação quantitativa do potencial antioxidante foi descrito por Brand-Williams et al. (1995) e Sánchez-Moreno et al. (1998), no qual a substância ou extrato cuja atividade antioxidante deseja-se avaliar, reage DPPH em solução metanólica. O consumo do radical é monitorado pelo decréscimo da absorvância do radical DPPH em espectrofotômetro UV-VIS, em comprimento de onda de 515 nm.

Preparo das Soluções e Construção da Curva de Calibração do DPPH

Foi preparada solução estoque de DPPH 40 mg/L (~100 µmol/L), mediante solubilização do radical em metanol (grau CLAE, TEDIA). O balão contendo a solução foi protegido com papel alumínio contra a ação da luz, e mantido sob refrigeração. A partir dessa solução, foram preparadas as diluições (36, 32, 28, 24,

20, 16, 12, 8 e 4 mg/L) necessárias para a construção da curva de calibração do DPPH.

A curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorvância da radiação UV a 515 nm de todas as soluções do DPPH (4 a 40 mg/L), medidas em cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm. Utilizou-se metanol como “branco” e 1 mL de cada solução do DPPH. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de tempo de 1 min entre cada leitura. Após obtenção dos valores de absorvância, determinou-se, através de regressão linear do programa Origin 7.0, a equação matemática da curva de calibração ($Y = a.X + b$, onde: a = coeficiente angular ou inclinação da reta; b = coeficiente linear).

Preparo das Amostras e Determinação de CI_{50}

As soluções estoque das amostras (extratos secos), na concentração de 40 mg/mL, foram preparadas a partir da solubilização de cada amostra em metanol (grau CLAE). A partir dessas soluções, foram preparadas as diluições nas concentrações de 30, 20 e 10 mg/mL. Foram efetuados cinco experimentos dos extratos secos individuais com cada uma das soluções (10 a 40 mg/mL). Misturas reacionais constituídas por 0,1 mL da solução teste e 0,9 mL da solução estoque de DPPH 40 mg/mL (~100 μ mol/L) foram preparadas e as medidas de absorvância de cada uma foram feitas a 515 nm, em triplicata a cada 15 minutos, durante 1 h.

Substituindo-se Y da curva de calibração do DPPH ($Y = a.X + b$) pela média dos valores de absorvância no tempo de 30 minutos para cada concentração testada, foi possível determinar X, que correspondeu aos percentuais de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}).

A CI_{50} representou a concentração da solução teste necessária para diminuir a concentração do radical DPPH em 50 %. Esse parâmetro foi determinado a partir de uma equação linear obtida pela relação entre as concentrações das soluções (10 a 40 mg/mL) *versus* a percentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}), através do programa Origin 7.0.

A comparação de atividade antioxidante foi feita frente aos padrões de ácido gálico (AG), ácido ascórbico (AAs) e 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT).

Testes de Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Phomopsis* sp Contra Microrganismos Patogênicos Humanos

Os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico de partição do micélio e, o extrato em acetato de etila do filtrado da cultura de *Phomopsis* sp foram testados contra *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (URM 4126), *Candida tropicalis* (URM 4977) e *Candida glabrata* (CCIBM), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), através do método de difusão em ágar, descrito por Bauer et. al. em 1996 (com algumas modificações).

Incorporação dos Extratos aos Discos de Papel

Os extratos foram diluídos em seis concentrações diferentes (Tabela 8). Em seguida, foi adicionado 20µL de cada concentração aos discos de papel filtro Whatman nº 5 (0,5cm) devidamente esterilizados e em orifícios de cerca de 5mm efetuados com o auxílio de um furador de ágar.

Preparação dos Inóculos

As bactérias e leveduras cultivadas em meio Ágar-Nutriente (AN) por 48h sob temperatura de 25±3°C foram obtidas e diluídas segundo o tubo nº 5 da escala de Mc Farland (6×10^8 UFCml⁻¹).

Plaqueamento

Para inoculação, utilizou-se 100µL de cada suspensão bacteriana/leveduriforme, depositando-se a mesma em meio ágar-nutriente contidos em placas de Petri. Em seguida, foram adicionados os discos de papel contendo os extratos (Figura 18). Para cada teste foram feitas três repetições num delineamento inteiramente casualizado.

Tabela 8. Concentrações dos extratos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.

Discos	Concentrações dos extratos do isolado <i>Phomopsis</i> sp. (mg.mL ⁻¹)*				
	Hexânico	Clorofórmico	Acetato de Etila	Metanol	Acetato (Filtrado)
1**	0	0	0	0	0
2	120	160	40	160	40
3	60	80	20	80	20
4	30	40	10	40	10
5	15	20	5	20	5

* os extratos foram dissolvidos no solvente original.

** disco “controle” embebido apenas em solvente.

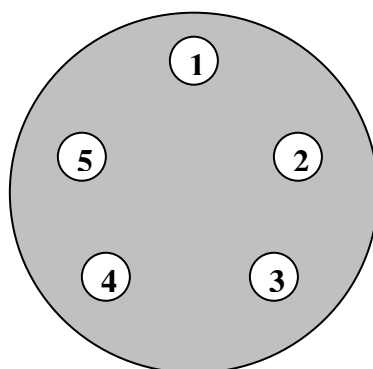


Figura 18. Disposição dos discos de papel e/ou orifício na placa. 1) controle, 2-5) discos com extratos num grau de concentração decrescente.

Resultados e discussão

Os resultados da avaliação do percentual de atividade antioxidante (%AAnt) dos extratos em hexano e clorofórmio estão expressos na figura 19. Pôde-se observar que ambos tiveram AAnt baixa, embora o extrato em clorofórmio, conforme previsto pelo tipo de composto que pode ser por ele removido, tenha atingido uma atividade superior entre ambos na concentração de 40mg.mL⁻¹.

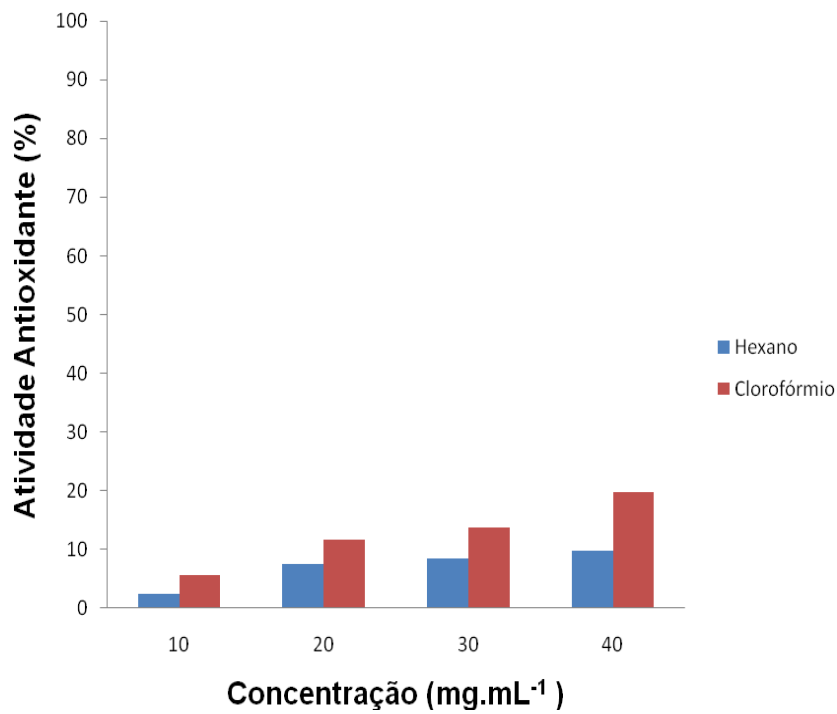


Figura 19. Percentagem de atividade antioxidante (AAnt%) dos extratos em hexano e clorofórmio para o tempo de 30min, nas concentrações de 10, 20, 30 e 40mg.mL⁻¹.

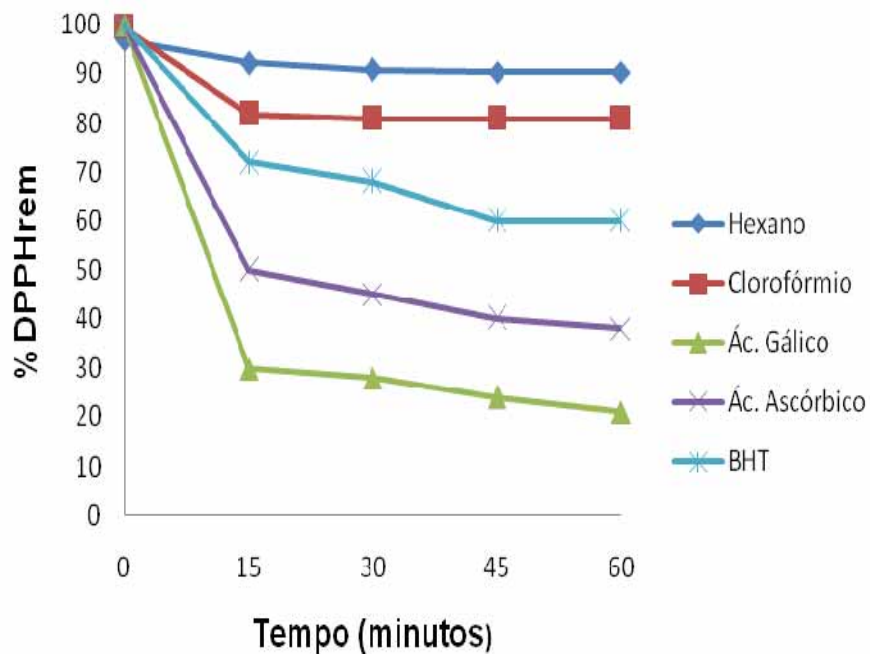


Figura 20. Percentual de DPPH remanescente nos tratamentos com extratos hexânico e clorofórmico a 40 mg.ml⁻¹ e padrões ao longo de 60 minutos.

Com relação à atividade antimicrobiana testada, os extratos hexânico, clorofórmico, em acetato de etila e metanólico do micélio de *Phomopsis* sp., e o extrato em acetato do filtrado, como mostra a figura 21, não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (URM 4126), *Candida tropicalis* (URM 4977) e *Candida glabrata* (CCIBM). Isso contraria os resultados obtidos por Chareprasert et al. (2006), onde *Phomopsis* sp. endofítico de *Tectona grandis* e de *Samanea saman*, produziu substâncias inibidoras contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. No entanto, os processos de cultivo e extração foram diferentes.

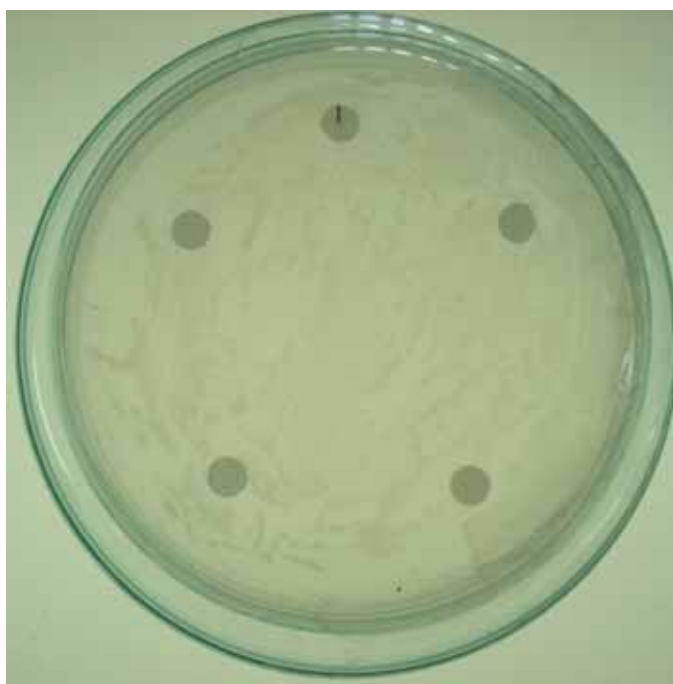


Figura 21. Atividade antimicrobiana negativa (sem a presença de halos) do extrato hexânico do micélio de *Phomopsis* sp., endófito de *Turnera subulata*.

Podemos supor que os extratos não apresentaram atividade antioxidante devido ao meio de cultura utilizado que não deve ter proporcionado resposta.

Corrado e Rodrigues (2004) observaram a atividade bactericida de linhagens do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado das folhas de *Aspidosperma tomentosum* e pecíolos da planta medicinal *Spondias mombin*. Todos os extratos avaliados inibiram o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras testadas, mostrando o grande potencial deste fungo como fonte de produtos bioativos.

Fomopsicalasina, composto isolado de *Phomopsis* sp., mostrou atividade antimicrobiana principalmente em ensaios de difusão em discos. Com 4µg.disco⁻¹, fomopsicalasina exibiu zonas de inibição de 12 mm contra *Bacillus subtilis*, 11 mm contra *Salmonella fgallinarum* e 8 mm contra *Staphylococcus aureus*. Foi exibida também uma zona de 8 mm contra a levedura *Candida tropicalis* (Horn et al., 1995).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). O surgimento e elevação da incidência de várias patologias causadas por espécies de *Candidas* e outros patógenos, e a resistência dos mesmos a terapias já existentes, levam a busca de outros princípios ativos.

Portanto, os extratos celulares n-hexânico e clorofórmico de *Phomopsis* sp., endófito de *Turnera subulata* apresentaram atividade antioxidante baixa, sendo a do extrato em clorofórmio levemente superior e atingindo um máximo de atividade de 20%.

Os extratos hexânico, clorofórmico, em acetato de etila e metanólico do micélio de *Phomopsis* sp. e o extrato em acetato do filtrado não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.


Devido ao tempo curto, outros extratos não puderam ser avaliados. Sugerimos a realização dos mesmos testes com outros tipos de extratos obtidos a partir do cultivo de *Phomopsis* sp.

CONCLUSÕES GERAIS

- *Phomopsis* sp. corresponde a um endófito que pode ser obtido a partir de fragmentos de folhas saudáveis de *Turnera subulata* L..
- *Phomopsis* sp. apresenta um crescimento mais expressivo de biomassa fúngica nos meios BDA e BSA.
- O fungo *Phomopsis* sp. cresce de forma superior em presença de luz contínua, quando comparado com o crescimento observado na ausência da luz.
- O ergosterol é um esteróide que pode ser isolado a partir do extrato hexânico de *Phomopsis* sp.
- *Phomopsis* sp. é capaz de promover halo de inibição frente aos patógenos de plantas: *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp. e *Pestalotiopsis* sp.
- O endófito *Phomopsis* sp. pode atuar inibindo o crescimento de *Rhizoctonia* sp.
- O endófito *Phomopsis* sp. pode atuar inibindo o crescimento de *Colletotrichum* sp.
- *Phomopsis* sp. não foi capaz de reduzir consideravelmente o crescimento de *Pestalotiopsis* sp, porém pode atuar impedindo a produção de pigmentos.
- Na avaliação do percentual de atividade antioxidante (%AAnt) dos extratos de *Phomopsis* sp. em hexano e clorofórmio pôde-se observar que ambos tiveram AAnt, contudo o extrato em hexano teve menor atividade que o extrato em clorofórmio atingindo um máximo de atividade de 20%.
- Os extratos hexânico, clorofórmico, em acetato de etila e metanólico do micélio de *Phomopsis* sp. e o extrato em acetato do filtrado não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

ANEXO

Identificação da planta *Turnera subulata* utilizada no trabalho:

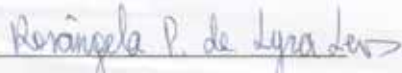


GOVERNO DO ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA DE ESTADO DE PLANEJAMENTO
INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE - IMA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a planta enviada para identificação no herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, pela estudante Sandra Hiromi Kamei do curso de Ciências Biológicas – UFAL trata-se de: *Turnera subulata* Sm. pertencente a família Turneraceae com o número de registro MAC 34615.

Maceió, 02 de Dezembro 2008


Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do herbário MAC

Rosângela P. de Lyra Lemos
Mat. 56329-3
CURADORA HERBÁRIO MAC - IMA/AL

Av. Major Cícero de Góes Monteiro, 2197 - Mutange - CEP: 57017-320 - Maceió/AL
Fones: (0**82) 221.8683 / 221.8976 - Fone/fax: (0**82) 221.6747 / 223.3406
e-mail: ima.al.gov.br - Disk Ecologia: 0800 82 1523

Referências Bibliográficas

- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. New York: Academic Press, 3 ed., p. 40, 1988.
- ALCARAZ-MELÉNDES, Lilia; DELGADO-RODRIGUEZ, Javier; REAL-COSÍO, Sergio. Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, v.75, p. 696–701, 2004.
- ARAUJO, W.L. **Isolamento e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citrus**. Msc Thesis. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil. 99 p., 1996.
- ARAÚJO, W. L. de; MACCHERONI Jr., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 3; p. 229-236, 2001.
- ARBO, M. M. Turneraceae (*Turnera* family). In N. Smith, S. A. Mori, A. Henderson, D. Wm. Stevenson, and S. V. Heald [eds.], **Flowering plants of the Neotropics**, 380–382. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA, 2004.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 117- 137.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. de Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, abr. 2000.
- BAO, J. R.; LAZARVITS, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. *Phytopathology*, Lancaster, v. 91, p. 449-456, 2001.
- BARBOSA, D. de A.; SILVA, K.N.; AGRA, M. de F. Estudo farmacobotânico comparativo de folhas de *Turnera chamaedrifolia* Cambess. e *Turnera subulata* Sm. (Turneraceae) *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.17, n.3, p.396-413, Jul.-Set. 2007.
- BARNETT, H. L. & HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Ed. 3^a, 1972.
- BARNETT, H. L. & HUNTER, B.B. **Illustrated General of the the Imperfect Fungi**,

4th edition. APS press, St. Paul, Minnesota. 1998

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, 493-496, 1966.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, Saint Paul, US, v. 72, p. 379-382, 1982.

BLANCO, C. G. de. **Guignardia citricarpa Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo. 200 f. Piracicaba, 1999.

BODDY, L.; GRIFFITH, G. S. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia*, v. 41, p. 41-73, 1989.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*. N. 28, v. 1, p. 25-30, 1995.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 10, p. 943-948, 2001.

CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T. da; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology*, v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

CARROLL, G. C. The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEAVEL, J. Van Der (Eds.). **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 205-222.

CHAREPRASERT S.; PIAPUKIEW J.; THIENHIRUN S.; WHALLEY A. J. S.; SIHANONTH P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, n. 5, p. 481-486, 2006.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! *Canadian Journal of Botany*, v. 74, p. 321-322, 1996.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, 432:829-37, 2004.

COCKRUM, P. A.; PETERSON, D. S.; EDGAR, J. A. Identification of novel *Phomopsis* in Lupin seed extracts. In *Plant-associated toxins. Agricultural, phytochemical and ecological aspects*, DORLING, P. R. p. 232-237. Wallingford: CAB International, 1994.

COELHO, A. S. G. *Software Bood v3.04*, 2005.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v.36(5). Pp. 599-607, 2003.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 157-160, 2004.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.52, p.455-463, 1999.

DICK, C. M.; HUTCHINSON, S. A. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Nature*, v. 211, p. 868, 1966.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. 2ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

FERREIRA, P. M.; OLIVEIRA, C. N.; OLIVEIRA, A. B.; LOPES, M. J.; ALZAMORA, F.; VIEIRA, M. A. R. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. *Planta*, v. 219, p. 319-324, 2004.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, v. 122, p. 299-305, 1992.

GALVEZ, J.; GRACIOSO, J. de S.; CAMUESCO, D.; GALVEZ, J.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S.; ZARZUELO, A. Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. *Fitoterapia*. v.77, p. 515–520, jul 2006.

GAO, X.; ZHOU, H.; XU, D.; YU, C.; CHEN, Y.; QU, L. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters*, v. 249, p. 255-266, 2005.

- GIBBS, J. N. A study of the epiphytic growth habit of *Fomes annosus*. *Annals of Botany*, v. 31, p. 755-774, 1967.
- GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 115 f. Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Universidade Federal do Paraná. 115 f. Curitiba, 1995.
- GOMES, R. R. **Phomopsis spp. endófitos de plantas medicinais : diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa***. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética. Defesa: Curitiba, 142 p. 2008.
- GRACIOSO, J.de S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.;BRITO, A.R.M.S. Effects of Tea from *Turnera ulmifolia* L. on Mouse Gastric Mucosa Support the Turneraceae as a New Source of Antiulcerogenic Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* v.25, n.4, p. 487-491, abril 2002.
- GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. Ribeirão Preto, 2006, 208p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – USP). Ribeirão Preto, 2006.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE. Recife- PE. 1996. 274p.
- HORN, W. S.; SIMMONDS, M. S. J.; SCHWARTZ, R.E.; BLANEY, W. M. Phomopsichalasin, a Novel Antimicrobial Agent from an Endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* v. 51, n. 14, p. 3969-3978, 1995.
- LI, J. Y.; SIDHU, R.S.; BOLLON, A.; STROBEL. G. A. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycological Research*, v.102, p.461-464, 1998.
- LI, L.; SATTLER, I.; DENG, Z.; GROTH, I.; WALTHER, G.; MENZEL, K.; PESCHEL, G.; GRABLEY, S.; LIN, W.. A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Phytochemistry* v.69, p.511–517, 2008.
- LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites

- produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, v. 151, p. 67-73, 2000.
- MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J.Y.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*, v.75, p.451-456, 2004.
- MAGALHÃES, A. A. da S. **Isolamento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* SPRUCE (WOOD) Apocynaceae.** 130 f. São Carlos, 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos. 130 f. São Carlos, 2001.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. I, p. 369-409, 1993.
- MATSUURA, A. B. J.; MENEZES, M. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 25, p. 161-164, 1999.
- MELO, I. S.; FAULL, J.L. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Sci. agric.* v. 57 n.1 Piracicaba Jan./Mar. 2000.
- MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos.** Ed. 2ª revisada e ampliada, p. 19-29 e 153-155, 2004.
- MORETTO, K.C.K, GIMENES-FERNANDES, N. & SANTOS, J. M. dos. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of 'Tahiti' lime detached flowers. *Summa Phytopathologica* 27:357-364. 2001.
- NASCIMENTO, M. A. ; SILVA,A.K.; FRANÇA, L.C.B.; QUIGNARD, E.L.J.; LÓPEZ, J.A.; ALMEIDA, M. G. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity . *Bioresource Technology*, v.97, p. 1387–1391, 2006.
- OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. *Canadian Journal of Botany*, v. 76, p. 657-663, 1998.
- PAXTON, J. D. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology* Z, v. 101, p. 106-109, 1981.
- PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, v. 44, p. 1-68, 1997.

- PENNA, E. B. da S. **Microorganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis*, ST. HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD.** 123 f. Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal do Paraná. 123 f. Curitiba, 2000.
- PEREIRA, J.O. **Fungos Endofíticos de Hospedeiros Tropicais.** Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p., 1993.
- PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. *Mycologia*, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves.** New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197.
- PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J., FOTO, R.; RYCE, K. D.; LUMYONG, S. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, v.18, p.117-1333, 2005.
- REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botanic*, v. 72. p.1666-1674, 1994.
- RICHARDSON, D. H. S. War in the world of lichens: parasitism an simbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. *Mycological Research*, v. 103, p. 641-650, 1999.
- RODRIGUES, K.F. AND DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Manrandu and *Brachiaria humidicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31:904-909, 1996.
- RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.
- RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. **Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions.** In: HYDE, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi.** Hong Kong, University of Hong Kong Press, 1997. p. 57-69.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York, Exeter Publishing, 1988.
- RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R. dos; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal

- community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, v. 1, p. 24-33, 2005.
- RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KIRTIKARA, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*. v. 69, p. 783–787, 2008.
- SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*. v. 21, p. 67-74, 2007.
- SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276, 1998.
- SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SANTOS, D.A.P. **Isolamento e identificação de metabólitos secundários dos fungos comestíveis *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 170p. São Carlos/SP, 2001.
- SCHWARZ, M.; KÖPCKE, B.; WEBER, R. W. S.; STERNER, O.; ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi *Phytochemistry*, v. 65, p. 2239–2245, 2004.
- SHIRANE, N.; TAKENA, H.; UEDA, K.; HASHIMOTO, Y.; KATOH, H.; ISHII, H. Sterol analysis of dmi-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis*. ***Phytochemistry***, V. 41, n. 5, p. 1301-1308, 1996.
- SHRESTHA, K.; STROBEL, G. A.; SHRIVASTAVA, S. P.; GEWALI, M. B. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal. *Planta Medica*, v. 67, n. 4, p. 374-376, 2001.
- SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A. R. New Bioactive Metabolites Produced by *Phomopsis cassiae*, an Endophytic Fungus in *Cassia spectabilis*. *Journal Brasileiro Chemical Society*, v. 16, n. 6, p. 1463-1466, 2005.
- SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease*, St. Paul, v. 75, n. 3, p. 220-224, 1991.
- STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M.

Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardioopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 105-109, 2002.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products*, v.58, n.9, p. 1315-1324, sep.1995.

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

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R. M. W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*, v. 60, 179-183, 2002.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002.

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). *Mycological Research*, v. 98, p. 423-432, 1994.

WAGENAAR, M. M.; CLARDY J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. *Journal of natural products*. v. 64, n°8, pp. 1006-1009, 2001.

WANI, MC; TAYLOR, HL; WALL, ME; COGOON, P; MCPHAIL, AT. Plant antitumor agent.VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc*, 93: 2325-2327, 1971.

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

WARDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist*, v. 116, p. 341-381, 1990.

WEBBER, J. F., AND GIBBS, J. N. Colonization of elm bark by *Phomopsis oblonga*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82:352-354, 1984.

WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A. C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agriculture Ecosystems & Environment*, Amsterdam, v. 44, p. 13-37, 1993.

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*. pp.315-322. Academic Press, San Diego. 1990.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. *Zhongcaoyao*, v. 35, n. 1, p. 79-81, 2004.

ZHANG, A. W.; RICCIONI, L.; PEDERSEN, W. L. ; KOLLIPARA, K. P.; HARTMAN, G. L. Molecular Identification and Phylogenetic Grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* Isolates from Soybean. *Phytopathology*. v.88, n.12, p.1306-1314, 1998.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y., TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, 2000.

ZOBERI, M. H. *Tropical Microfungi*. London: *The Macmillan Press*, 1^a ed., p. 1, 1972.

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#58396904>

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/blast_tree_view.cgi?request=page&rid=69R2RS9H01R&queryID=|cl|16369&distmode=on&screenWidth=1024