



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SUELEN MATA DA SILVA

**CORRELAÇÃO METABÓLICA ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
AMARYLLIDACEAE E AS PLANTAS HOSPEDEIRAS NA BUSCA POR
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Belém
2016

SUELEN MATA DA SILVA

**CORRELAÇÃO METABÓLICA ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
AMARYLLIDACEAE E AS PLANTAS HOSPEDEIRAS NA BUSCA POR
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Alberdan Silva Santos.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Silva, Suelen Mata da, 1986-

Correlação metabólica entre fungos endofíticos de
amaryllidaceae e as plantas hospedeiras na busca por
substâncias bioativas / Suelen Mata da Silva. - 2016.

Orientadora: Alberdan Silva Santos.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2016.

1. Fungos - Fisiologia. 2. Metabólitos. 3.
Fungos endofíticos. I. Título.

CDD 22. ed. 579.55

Belém

2016

SUELEN MATA DA SILVA

**CORRELAÇÃO METABÓLICA ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
AMARYLLIDACEAE E AS PLANTAS HOSPEDEIRAS NA BUSCA POR
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, Universidade
Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Alberdan Silva Santos.

Data de Aprovação: 30 de Junho de 2016.

Banca Examinadora

Dr. Alberdan Silva Santos

Instituto de Ciências Exatas e Naturais /ICEN/UFPA - Orientador

Dra. Luciana Pereira Xavier

Instituto de Ciências Biológicas /ICB/UFPA - Membro

Dr. Luis Adriano Santos do Nascimento

Instituto de Ciências Biológicas /ICB/UFPA - Membro

Dr. Agenor Valadares Santos

Instituto de Ciências Biológicas /ICB/UFPA - Membro

Dr. Lourivaldo da Silva Santos

Instituto de Ciências Exatas e Naturais /ICEN/UFPA - Membro

Dr. Hugo Leonardo Crisóstomo Salgado - Suplente

UFPA

Dr. Nelson Rosa Ferreira - Suplente

UFPA

Dr. Evonnildo Costa Gonçalves

Instituto de Ciências Biológicas /ICB/UFPA - Suplente

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Vânia e Paulo Silva, maiores incentivadores da minha formação acadêmica,
pelo amor e apoio.

Ao Thiago Silva pelo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Alberdan pela confiança, paciência, dedicação e orientação tanto para a minha formação quanto para vida. E por possibilitar o desenvolvimento dessa pesquisa nos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biologia Molecular (LabISisBio)

A Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia por possibilitar o desenvolvimento do curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa.

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi, em especial as pesquisadoras Dra. Ana Luiza Ilkiu-Borges, Dra. Márlia Ferreira e Dra. Alba Lins por facilitarem meu acesso ao laboratório de Anatomia Vegetal da Coordenação de Botânica da referida instituição.

Ao Prof. Dr. Diego Demarco da USP pelas análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão e por possibilitar o meu acesso na referida instituição.

Aos colegas de laboratório Marcia Souza, Silvana Araújo, Laíza Mendes, André Reis, Ivoneide Menezes e Ricardo Mello por contribuírem diretamente com a elaboração deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório com os quais eu convivi nesses quatro anos de Doutorado.

A minha família, namorado e amigos que me apoiaram durante esses quatro anos.

EPÍGRAFE

“Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar;
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer”

(Celina Borges)

RESUMO

Os fungos endofíticos são uma fonte promissora de metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas. Esses micro-organismos habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar nenhum dano ao hospedeiro e como fruto dessa interação podem produzir algumas das substâncias sintetizadas pelas plantas hospedeiras. Neste contexto o uso de fungos endofíticos como fonte de biomoléculas em substituição as de planta representa vantagens econômicas e ambientais. Espécies da família Amaryllidaceae produzem alcaloides e outros metabólitos com atividades biológicas. Entre estas espécies destacam-se *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. No entanto, não há dados sobre fungos endofíticos de espécies da família. Diante dos exposto o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis* em comparação com as plantas hospedeiras e estudar a interação entre endofíticos e a planta hospedeira. Como resultados foram isolados 94 fungos endofíticos das duas espécies de Amaryllidaceae investigadas, dos quais 49 foram identificados e pertencem aos gêneros *Coletotrichum*, *Acremonium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Constatou-se que do total das linhagens analisadas 56 apresentaram lipídios em seus extratos, 21 cumarinas, 29 antrônas e 2 apresentaram alcaloides. Foram selecionadas 12 linhagens de fungos endofíticos que apresentaram os melhores resultados na detecção de classes de metabólitos e os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em comparação com os extratos metanólicos das plantas hospedeiras. Constatou-se a correlação ente as classes de metabólitos detectados nos extratos dos fungos endofíticos e das plantas hospedeiras, indicando que estes micro-organismos são capazes de produzir algumas das mesmas substâncias que as plantas hospedeiras e a avaliação da atividade antimicrobiana destacou alguns extratos com atividade contra *Candida parapsilosis*. O extrato metanólico das folhas de *H. littoralis* e do fungo endofítico MIBA 0796 apresentaram os resultados mais relevantes com percentual de inibição acima de 60% contra a levedura. Com o estudo da interação entre fungos endofíticos de *C. americanum* e a planta hospedeira pode-se constatar que os micro-organismos ocorrem no interior das células vegetais e em condições favoráveis se desenvolveram e ocuparam também os espaços intercelulares. Esta localização dos endofíticos nos tecidos vegetais pode facilitar a troca de material genético entre o vegetal e os micro-organismos o que explicaria a correlação metabólica constatada nesta pesquisa.

Palavras-chave: *Crinum americanum* L., *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb., potencial biotecnológico, metabólitos, interação.

ABSTRACT

The endophytic fungi are a promising source of secondary metabolites with biotechnological applications. These microorganisms inhabit the interior of plant tissues without causing any damage to the host and as a result of this interaction can produce some of the substances synthesized by the host plant. In this context the use of endophytic fungi as a source of biomolecules in the replacement of plant represents economic and environmental advantages. Species in the Amaryllidaceae family produce alkaloids and other metabolites with biological activities. Among these species include *Crinum americanum* L. and *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. However, no data on endophytic fungi from species of the family were found. In the view of the above stated the aim of this work was to scrutinize the biotechnological potential of endophytes of *C. americanum* and *H. littoralis* as compared to host plants and to study the interactions between endophytes and host plant. As results 94 endophytic fungi were isolated from two species of the investigated Amaryllidaceae, of which 49 were identified and belonging to the *Coletotrichum* class, *Acremonium*, *Trichoderma* and *Fusarium*. It was noted that of the total strains tested 56 showed lipids in its extracts, 21 coumarins, 29 anthrones and 2 showed alkaloids. 12 strains of endophytic fungi were selected which presented the best results in the detection of classes of metabolites and the extracts were analyzed by Thin-layer chromatography and by Gas chromatography-mass spectrometry in comparison with the methanolic extracts of host plants. It was noted the correlation between the classes of metabolites detected in extracts of the endophytic fungi and host plants, indicating that these micro-organisms are able to produce some of the same substances that the host plants and the assessment of antimicrobial activity highlighted some extracts with activity against *Candida parapsilosis*. The methanolic extract of leaves of *H. littoralis* and endophytic fungus MIBA 0796 presented the most relevant outcomes with percentage of inhibition above 60% against yeast. With the study of the interaction between *C. americanum* endophytes and the host plant it can observe that microorganisms act within the plant cells and in favorable conditions develop and occupy intercellular spaces as well. This location of the Endophytes in plant tissues may facilitate the exchange of genetic material between plants and microorganisms explaining how metabolic correlation found in this research.

Keywords: *Crinum americanum* L, *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb., biotechnological potential, metabolites, interaction.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Espécies de Amaryllidaceae ornamentais | 20 |
| Figura 2 | <i>Crinum americanum</i> L. (A) e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jack.) (B) | 23 |
| Figura 3 | Análise em Cromatografia em Camada Delgada dos extratos metanólicos dos bulbos de <i>Crinum americanum</i> L. (BMC) e linhagens de fungos endofíticos MIBA 0478, 0433, 0436 e 0422 revelados com Vanilina sulfúrica (VAS) | 46 |
| Figura 4 | Análise em Cromatografia em Camada Delgada dos extratos metanólicos das folhas de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. (FMH) e das linhagens de fungos endofíticos MIBA 0793, 0775, 0773, 0792 e 0796 revelados com Vanilina sulfúrica (VAS) | 46 |
| Figura 5 | Análise em Cromatografia em Camada Delgada dos extratos metanólicos dos bulbos de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. (BMH) e das linhagens de fungos endofíticos MIBA 0805, 0808 e 0810 revelados com Vanilina sulfúrica (VAS) | 47 |
| Figura 6 | Análise em Cromatografia em Camada Delgada do extrato metanólico dos bulbos de <i>Crinum americanum</i> L. e do fungo endofítico MIBA 0433 utilizando os reveladores Cloreto Férrico (CF), ácido fosfomolibdico (PMA) e hidróxido de potássio (KOH) | 51 |
| Figura 7 | Análise em CCD do extrato metanólico dos bulbos de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e do fungo endofítico MIBA 0805 utilizando os reveladores cloreto férrico (CF), ácido fosfomolibdico (PMA) e hidróxido de potássio (KOH) | 51 |
| Figura 8 | Cromatograma do extrato metanólico das folhas de <i>Crinum americanum</i> L. | 55 |
| Figura 9 | Cromatogramas dos extratos metanólicos dos bulbos de <i>Crinum americanum</i> L. (BMC) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal | 56 |
| Figura 10 | Cromatogramas do extrato metanólico das folhas de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. (FMH) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal | 59 |
| Figura 11 | Cromatogramas do extrato metanólico dos bulbos de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. (BMH) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal | 61 |
| Figura 12 | Eletromicrografias de varredura das folhas de <i>Crinum americanum</i> L. | 85 |
| Figura 13 | Secções foliares de <i>Crinum americanum</i> L. | 86 |
| Figura 14 | Secções transversais de fragmentos foliares de <i>Crinum americanum</i> L. com 24h (A) e 48h (B) de permanência no meio de cultura | 88 |
| Figura 15 | Secções transversais de fragmentos foliares de <i>Crinum americanum</i> L. com 72h de permanência no meio de cultura | 89 |
| Figura 16 | Eletromicrografias de Transmissão das folhas de <i>Crinum americanum</i> L. fixadas (A-B) e dos inóculos com 24h (C-D) e 48h (E-F) de permanência no meio de cultura | 91 |
| Figura 17 | Eletromicrografias de Transmissão das folhas de <i>Crinum americanum</i> L. inoculadas em meio de cultura por 72h | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1 | Áreas de coleta de <i>Crinum americanum</i> L e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 32 |
| Tabela 2 | Linhagens de fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. selecionadas | 34 |
| Tabela 3 | Reveladores utilizados para a detecção de metabólitos nos extratos fúngicos e vegetais | 35 |
| Tabela 4 | Número de fungos endofíticos isolados de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 38 |
| Tabela 5 | Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados das folhas de <i>Crinum americanum</i> L. | 39 |
| Tabela 6 | Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos bulbos de <i>Crinum americanum</i> L. | 40 |
| Tabela 7 | Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados das folhas de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 42 |
| Tabela 8 | Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos bulbos de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 44 |
| Tabela 9 | Classes de metabólitos detectadas nos extratos metanólicos dos bulbos de <i>Crinum americanum</i> L. e de fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta | 48 |
| Tabela 10 | Classes de metabólitos detectadas nos extratos metanólicos das folhas de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e de fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta | 49 |
| Tabela 11 | Classes de metabólitos detectadas nos extratos metanólicos dos bulbos de <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e de fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta | 50 |
| Tabela 12 | Lista das substâncias identificadas nos extratos metanólicos das linhagens de fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e das espécies hospedeiras | 54 |
| Tabela 13 | Avaliação qualitativa da inibição de <i>Candida</i> pelos extratos metanólicos de fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e das espécies hospedeiras pela formação do halo de inibição (cm) | 63 |
| Tabela 14 | Avaliação da atividade relativa dos extratos metanólicos de fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e das espécies hospedeiras contra <i>Candida parapsilosis</i> | 64 |

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------|--|
| UFPA | Universidade Federal do Pará |
| MIBA | Coleção de Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia |
| LabISisBio | Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biologia Molecular |
| IOC | Instituto Oswaldo Cruz |
| BDA | Meio de cultura composto por Agra, batata e dextrose |
| SPY | Meio de cultura composto por sacarose, peptona e extrato de levedura |
| Agar-SPY | Meio de cultura composto por Agra, sacarose, peptona e extrato de levedura |
| Agar-GPY | Meio de cultura composto por Agra, glicose, peptona e extrato de levedura |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| mc | Média do controle (Fórmula da atividade relativa) |
| ma | Média da amostra (Fórmula da atividade relativa) |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CG/EM | Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas |
| Rf | Fator de retenção |
| VAS | Vanilina sulfúrica |
| PMA | Ácido fosfomolibdico |
| DGR | Reagente de Dragendorff |
| KOH | Hidróxido de potássio |
| CF | Cloreto férrico |
| RPM | Rotações por minuto |
| FNT | Formalina neutra tamponada |
| v | Volume |
| μL | Microlitro |
| mL | Mililitro |
| mg | Miligrama |
| h | Hora |
| °C | Grau Celsius |
| min. | Minuto |
| Da | Dalton |
| eV | Elétron-volt |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| OBJETIVO | 15 |
| HIPÓTESE | 15 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| Fungos endofíticos | 16 |
| Aplicações Biotecnológicas | 17 |
| A Família Amaryllidaceae | 19 |
| <i>Crinum americanum</i> L. | 21 |
| <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 22 |
| REFERÊNCIAS | 24 |
| 1 CAPÍTULO 1: DETECÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Crinum americanum</i> L. E <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. E DAS PLANTAS HOSPEDEIRAS | 28 |
| RESUMO | 28 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 29 |
| 1.2 OBJETIVOS | 31 |
| 1.3 MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 1.3.1 Áreas de coletas | 32 |
| 1.3.2 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 32 |
| 1.3.3 Obtenção de extratos a partir de cultivo semissólido dos fungos endofíticos | 33 |
| 1.3.4 Detecção de classes de metabólitos nos extratos fúngicos | 33 |
| 1.3.5 Seleção e cultivo submerso de fungos endofíticos para a obtenção de extratos | 34 |
| 1.3.6 Obtenção dos extratos das folhas e bulbos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 35 |
| 1.3.7 Análise comparativa dos extratos dos fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e das plantas hospedeiras | 35 |
| 1.3.7.1 Detecção de classes de metabólitos nos extratos fúngicos e vegetais | 35 |
| 1.3.7.2 Análise do perfil químico dos extratos fúngicos e vegetais por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) | 36 |
| 1.3.8 Atividade antimicrobiana | 36 |
| 1.3.8.1 Preparo dos inóculos | 36 |
| 1.3.8.2 Método do disco difusão em Agar | 37 |
| 1.3.8.3 Avaliação da atividade relativa | 37 |
| 1.4 RESULTADOS | 38 |
| 1.4.1 Isolamento e identificação de fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 38 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.4.2 | Detecção de classes de metabólitos nos extratos de fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 38 |
| 1.4.3 | Comparação dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e das respectivas espécies hospedeiras por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 45 |
| 1.4.4 | Comparação dos perfis químicos dos extratos dos fungos endofíticos de <i>Crinum americanum</i> L. e <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. e das respectivas espécies hospedeiras por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) | 52 |
| 1.4.4.1 | <i>Crinum americanum</i> L. | 52 |
| 1.4.4.2 | <i>Hymenocallis littoralis</i> (Jacq.) Salisb. | 58 |
| 1.4.5 | Avaliação da atividade antimicrobiana | 62 |
| 1.5 | DISCUSSÃO | 65 |
| 1.6 | CONCLUSÕES | 72 |
| | REFERÊNCIAS | 73 |
| 2 | CAPÍTULO 2: ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Crinum americanum</i> L. COM A PLANTA HOSPEDEIRA | 78 |
| | RESUMO | 78 |
| 2.1 | INTRODUÇÃO | 79 |
| 2.2 | OBJETIVOS | 81 |
| 2.3 | MATERIAL E MÉTODOS | 82 |
| 2.3.1 | Área de Coleta | 82 |
| 2.3.2 | Assepsia e preparo dos inóculos | 82 |
| 2.3.3 | Caracterização anatômica | 82 |
| 2.3.4 | Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 83 |
| 2.3.5 | Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) | 83 |
| 2.4 | RESULTADOS | 84 |
| 2.4.1 | Caracterização anatômica de <i>Crinum americanum</i> L. | 84 |
| 2.4.2 | Estudo da interação fungo-planta | 87 |
| 2.4.2.1 | Análises em Microscopia de Luz | 87 |
| 2.4.2.2 | Análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão | 90 |
| 2.5 | DISCUSSÃO | 93 |
| 2.6 | CONCLUSÕES | 95 |
| | REFERÊNCIAS | 96 |
| | CONCLUSÃO GERAL | 97 |

INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que a população de fungos endofíticos no nosso planeta possa chegar a um milhão e meio e deste total apenas uma mínima porcentagem é conhecida (NETO *et al.*, 2002). Pesquisas com estes micro-organismos são extremamente importantes, não só pelo vasto campo que ainda precisa ser explorado, como também pelo potencial biotecnológico que estes têm revelado. Os fungos endofíticos estabelecem relações simbióticas com seus hospedeiros, lhes proporcionando alguns benefícios, como a maior resistência à herbivoria, destacada atuação no controle de pragas e doenças e promoção do crescimento vegetal (LACAVA *et al.*, 2010).

Estes micro-organismos, assim como as espécies hospedeiras, são ativos produtores de metabólitos secundários que despertam o interesse em pesquisas voltadas para a indústria farmacêutica, pois podem apresentar notáveis atividades biológicas (CHAPLA *et al.*, 2013). Ainda assim a química de micro-organismos endofíticos tem sido pouco estudada se considerada a vasta diversidade fúngica estimada no mundo. Analisando o fato de que existam aproximadamente 300 mil espécies de plantas já catalogadas e muitas delas já estudadas com relação à microbiota endofítica, apresentem até cinco ou mais novas espécies de fungos, pode-se chegar ao número ainda subestimado de um milhão e meio de fungos existentes em nosso planeta, dos quais apenas 4,6% são conhecidos (NETO *et al.*, 2002).

A família Amaryllidaceae destaca-se nesse aspecto por produzir diversos metabólitos secundários entre eles alcaloides, fenóis, lecitinas, peptídeos (JIN, 2007). Somente com relação aos alcaloides, a classe mais estudada na família, aproximadamente 500 estruturas diferentes já foram obtidas, das quais grande parte apresentou atividade biológica significativa e alguns destes alcaloides já são usados em terapias clínicas (JIN, 2007). Esta ampla variedade de alcaloides apresentam diferentes atividades farmacológicas incluindo antitumoral, antiviral, inibição da acetilcolinesterase, imunoestimulante e antimalárica (JIN, 2003). Apesar de a família Amaryllidaceae ser pouco expressiva em número de espécies, contem vinte dos mais importantes alcaloides de famílias botânicas (JIN, 2005). Com isso, a família tornou-se alvo de inúmeras pesquisas sobre alcaloides, mas pouco se conhece sobre fungos endofíticos destas espécies e da influência que estes micro-organismos possam ter na produção de metabólitos.

O crescimento de fungos endofíticos no interior dos tecidos vegetais envolve uma contínua interação metabólica entre o endófito e o hospedeiro (SCHULZ *et al.*, 2002). De acordo com Neto *et al.* (2004) utilizando-se microscopia eletrônica pode-se determinar a

localização e a forma de colonização dos micro-organismos endofíticos em plantas hospedeiras. Nesse contexto a anatomia vegetal surge também para elucidar tais relações, pois fornecem informações sobre a estrutura interna do vegetal.

A ausência de estudos da microbiota endofítica de espécies de Amaryllidaceae e o potencial biotecnológico que estes micro-organismos endofíticos podem apresentar aliados a importância desta família na produção de metabólitos secundários motivaram o desenvolvimento deste trabalho.

OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de espécies de Amaryllidaceae em comparação com as plantas hospedeiras e estudar a interação entre estes micro-organismos e os vegetais que eles colonizam.

HIPÓTESE

As classes de metabólitos produzidos por fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (Amaryllidaceae) apresentam correlação com as classes de metabólitos produzidos pelas espécies hospedeiras.

REVISÃO DE LITERATURA

Fungos endofíticos

Os fungos são micro-organismos eucariotos, aclorofilados, produtores de esporos, com nutrição por absorção, capazes de se reproduzir sexuada e assexuadamente, cujas células estão envolvidas por parede celular rica em quitina, e também com galactose e manana e sua membrana celular é rica em ergosterol (ALEXOPOLUS, 1962). Podem ser uni (leveduras) ou pluricelulares (filamentosos), predominantemente aeróbios, podendo estar envolvidos em processos de fermentação, sendo em alguns casos capazes de sobreviver em anaerobiose (ALEXOPOLUS, 1962).

Fisicamente, um fungo pode interagir com seu hospedeiro de origem vegetal ocupando uma gama de locais. Quando vivem externamente ao hospedeiro, são denominados epifíticos e quando em seu interior, são denominados endofíticos (MAGALHÃES et al., 2007). Desta forma, os fungos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO E ARAÚJO, 2007).

A espécie hospedeira pode ser infectada pelos endófitos horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida (MELO; AZEVEDO, 1998; ALY et al., 2011). De acordo com Aly et al. (2011) o modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical a interação é predominante mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não-sistêmica) essa interação tende a ser antagonista. O fungo endofítico permanece no hospedeiro em estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado e quando em condições ambientais favoráveis, o mesmo pode tornar-se patogênico (ALY et al., 2010).

Para Schulz et al. (2002) a interação entre fungo endofítico e planta hospedeira é caracterizada por um delicado equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta. Se esse equilíbrio é perturbado pela diminuição da defesa da planta ou pelo aumento da virulência do fungo a doença se desenvolve. Schulz e Boyle (2005) propuseram que a colonização assintomática dos endofíticos é uma interação antagonista equilibrada entre planta hospedeira e fungo, e enquanto a virulência dos endofíticos e a de defesa da planta são equilibradas a interação permanece assintomática.

As interações mutualísticas entre endofíticos e a planta hospedeira são decifradas como um equilíbrio, sob, controle ambiental, fisiológico e genético, que resulta em benefícios para ambos os parceiros e como parasitismo é uma simbiose desequilibrada (SELIM et al., 2012). Moricca e Ragazzi (2008) indicaram que o tipo de interação entre endófito e a planta é controlada por genes de ambos os organismos e modulada pelo ambiente.

Aplicações biotecnológicas

Tem sido dada especial atenção ao estudo dos micro-organismos endofíticos como agentes no controle de inúmeras doenças de plantas, pragas, bem como promotores de crescimento vegetal e ainda o uso desses micro-organismos como fitorremediadores de áreas poluídas. Estes ainda são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente alimentícia e farmacêutica (LACAVA et al., 2010).

Os micro-organismos endofíticos representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20.000 substâncias descritas (OWNLEY et al., 2010), sendo que destas 51% apresentaram estruturas inéditas e 80% possuem alguma atividade biológica (YANG et al., 2012). A utilização de micro-organismos é uma interessante estratégia, pois esses micro-organismos habitam o interior das plantas sem causar nenhum aparente sintoma de doença (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al., 2000) o que indica que o crescimento nesse habitat envolve contínua interação metabólica entre o endófito e o hospedeiro (SCHULZ et al., 2002). Tan e Zou (2001) destacaram que fungos patogênicos e fungos isolados do solo produzem, relativamente, menos metabólitos secundários quando comparados com fungos endofíticos. O que ressalta ainda mais o potencial desses micro-organismos.

Os produtos naturais de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásica e citotóxica. Os metabólitos responsáveis por tais atividades podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos, entre outros (CHAPLA et al., 2013).

Diversos trabalhos demonstram o potencial de fungos endofíticos para a produção de moléculas bioativas. O composto fenólico tirosol obtido a partir do fungo endofítico *Diaporthe helianthi* apresentou ação contra as bactérias *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, patógenas humanas e contra o

fungo fitopatogênico *Xanthomonas asc. phaseoli* (SPECIEAN et al., 2012). Desale e Bodhankar (2013) investigaram os extratos de fungos endofíticos isolados de *Vitex negundo* L. espécie utilizada na medicina tradicional na Índia e na China. Os autores constataram que esses micro-organismos tem ação antimicrobiana significativa contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Tayung et al. (2012) estudaram 69 fungos endofíticos de *Ipomoea carnea* e constataram que 19 linhagens apresentaram atividade antimicrobiana inibindo pelo menos uma bactéria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella dysenteriae*) ou fungo patogênico (*Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton* sp.). O fungo endofítico *Arthrinium arundinis* isolado das raízes de *Smallanthus sonchifolius* apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e contra o fungo *Aspergillus fumigatus*, além de atividade antitumoral e antiparasítica (RAMOS; SAID, 2011).

Os fungos endofíticos são potencialmente úteis na indústria farmacêutica, pois podem ser utilizados com fontes de metabólitos primários e secundários, como o taxol, um poderoso anticancerígeno (STROBEL, 2003). O taxol é um diterpenóide largamente utilizado no tratamento de câncer de mama e útero, produzido pela planta *Taxus brevifolia* e pelo fungo endofítico *Taxomyces andreane* isolado da mesma (STIERLE et al., 1986). Devido à importância do taxol cresceram as buscas por novos endofíticos com a capacidade de produzir a substância e outros anticancerígenos (LACAVA et al., 2010).

O efeito negativo de fungos endofíticos sobre insetos herbívoros está associado à produção de toxinas pelo fungo (AZEVEDO et al, 2000). Estudos realizados com *Beauveria bassiana* (endofítico de milho) sugerem que o modo de ação na supressão do inseto-praga *Ostrinia nubilalis* está ligado à presença de metabólitos produzidos pelo endofítico inibindo a presença do inseto, que causa a não alimentação, ou ainda, sua inibição por antibiose (CEHRRY et al., 2004). Clay et al. (1985) compararam o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (lagarta conhecida como lagarta militar) em plantas de gramíneas infectadas e não infectadas por fungos endofíticos. Os autores constataram que as lagartas que se alimentavam das folhas infectadas ganhavam menos peso e tinham desenvolvimento significativamente mais longo do que as lagartas que se alimentavam das folhas livres de endofíticos, o que indica maior resistência contra herbivoria conferida pelos fungos endofíticos. Vega et al. (2008) listaram várias toxinas produzidas por fungos em ação comprovada contra insetos e que podem ser encontradas endofiticamente, citando como

exemplo *Beauveria* spp., que produz uma série de metabólitos incluindo bassianim, beauvericim, bassianilide, beauveriolide, bassiacridim, oosporeim e etenellim.

Os micro-organismos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência (ARAÚJO et al., 2010). Rubini et al. (2005) analisaram a diversidade genética de fungos endofíticos do cacau (*Theobroma cacao* L.) e constataram que a microbiota endofítica é composta por diversos gêneros dos quais alguns foram identificados com antagonistas do fungo *Miniliophthora perniciosa*, o agente causal da “vassoura-de-bruxa”. Os autores comprovaram que entre os gêneros inibidores, *Gliocladium catenulatum* apresentou os melhores resultados, reduzindo em 70% a incidência da doença em mudas de cacau.

A família Amaryllidaceae

A família Amaryllidaceae possui distribuição predominantemente temperada e tropical (JUDD et al., 2009) e inclui cerca de 85 gêneros e 1100 espécies (JIN, 2009; 2011). No Brasil ocorrem 14 gêneros e 100 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008). A família compreende ervas com bulbos, raramente com rizomas; com folhas alternas dísticas ou espiraladas concentradas na base da planta; inflorescência cimosa, geralmente umbeliforme e disposta no ápice ao longo de um escapo, frequentemente reduzida a uma única flor; flores vistosas, bissexuais, actinomorfas ou ligeiramente zigomorfas, diclamídeas e homoclamídeas, cálice trímero, corola trímera, estames geralmente 6, livres ou raramente unidos entre si, unidos ao perianto, anteras rimosas; nectários septais presentes; gineceu gamocarpelar; ovário ínfero, trilocular, placentação axial, lóculos pluriovulados; fruto cápsula, muito raramente baga (SOUZA; LORENZI, 2008).

As Amaryllidaceae destacam-se por apresentar espécies com potencial ornamental, devido suas flores grandes, vistosas e coloridas. Entre estas espécies destacam-se *Amaryllis belladonna* L., *Clivia miniata* Regel, *Crinum erubescens* L., *Crinum x powellii* Hort. Ex Barker, *Crinum americanum* L., *Eucharis grandiflora* Planch. & Linden, *Hippeastrum hybridum* Hort, *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Urb., *Hippeastrum reginae* (L.) Herb., *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb., *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb., *Narcissus x cyclamineus* DC., *Narcissus tazetta* L., *Scadoxus multiflorus* (Martyn) Raf., *Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb. e *Zephyranthes rosea* Lindl. (LORENZI; SOUZA, 2008) (Figura 1).

Figura 1. Espécies de Amaryllidaceae ornamentais



Legenda: **A.** *Amarylliss belladonna*; **B.** *Clivia miniata*; **C.** *Crinum erubescens*; **D.** *Crinum x powellii*; **E.** *Crinum americanum*; **F.** *Eucharis grandiflora*; **G.** *Hippeastrum hibridum*; **H.** *Hippeastrum puniceum*; **I.** *Hippeastrum reginae*; **J.** *Hymenocallis caribaea*; **K.** *Hymenocallis littoralis*; **L.** *Narcissus x cyclamineus*; **M.** *Narcissus tazetta*; **N.** *Scadoxus multiflorus*; **O.** *Zephyranthes candida*; **P.** *Zephyranthes rosea*.

Fontes: **A.** pmainlyamaryllidsgarden.com, **B.** www.portlandmonthllymag.com; **C.** marcellescrinums.com; **D.** www.mojsklepogrodniczy.pl; **E.** onca-kuahary.blogspot.com; **F e G.** www.jardineiro.net; **H.** www.brasilplants.com; **I e P.** www.flickr.com; **J.** www.onlineplantguide.com; **K.** www.henriettesherbal.com; **L.** www.alpinegardensociety.net; **M.** www.pacificbulbsociety.org; **N.** www.plantzafrica.com; **O.** gwen4gardens.blogspot.com.

Com relação aos aspectos medicinais, Lorenzi e Matos (2008) mencionaram que o suco dos bulbos de *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Urb., conhecida como açucena, açucena-laranja, amarílis e cebola-berrante, tem propriedade emética, catártica, purgativa, excitante, antiasmática e peitoral e citaram ainda, que a seiva e a as folhas da espécie são utilizadas na República Dominicana para dor de ouvido. De acordo com os mesmos autores, análises fitoquímicas revelaram a presença do alcaloide hipagina nos seus tecidos e licorina e vittarina nos bulbos.

A Família tem destacado potencial biotecnológico e farmacológico devido à variedade de compostos ativos que produzem. Alcaloides, fenóis, lecitinas, pepitídios, etc, já foram isolados e caracterizados a partir de espécies de Amaryllidaceae (JIN, 2007). Aproximadamente 500 alcalóides diferentes já foram isolados e a maioria apresenta atividade biológica significativa, sendo alguns deles aprovados para terapias clínicas (JIN, 2005). Esta ampla variedade de alcaloides apresentam diferentes atividades farmacológicas incluindo antitumoral, antiviral, inibição da acetilcolinesterase, imunoestimulante e antimalárica (Jin, 2003). Apesar de ser uma família pouco expressiva em número de espécies, contem vinte dos mais importantes alcaloides de famílias botânicas (JIN, 2005).

***Crinum americanum* L.**

Espécies do gênero *Crinum* tem importância comercial, econômica e medicinal (TRAM et al., 2002). Várias espécies possuem atividades biológicas e são relatados importantes usos medicinais. Já foram isoladas mais de 170 diferentes compostos, a maioria dos quais são alcalóides, cuja maioria dos efeitos observados foram como analgésicos, anticolinérgicos, antitumoral e antiviral (FENNELL; STADEN, 2001). O gênero é considerado o verdadeiro representante da família Amaryllidaceae, pois exhibe todas as principais características químicas da família (GHOSAL et al., 1985).

Crinum americanum L. (Figura 2) é um macrófita que possui dominância em muitos locais, o que explica a sua comprovada ação alelopática (RIBEIRO et al., 2009 e RIBEIRO; LIMA, 2011). Tram et al. (2002) em revisão sobre o gênero *Crinum*, destacaram alguns registros da produção de alcaloides, ácidos graxos e flavonoides pela espécie. Ali et al. (1986) isolaram a partir dos bulbos de *C. americanum* os alcaloides oxocrinina, crinina, flexina, o-acetilcrinina, licorina, hippadina, pratorinina, pratorimina, pratosina, ungeremina e trisphaeridina.

***Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.**

O gênero *Hymenocallis* apresenta aproximadamente 60 espécies, ocorre desde as regiões sudeste e central dos EUA, ilhas do Caribe, México e Américas Central e do Sul (GARCÍA-MENDOZA, 2010). É composto por plantas com bulbos subterrâneos dos quais emergem folhas em roseta e o escapo floral. Em algumas espécies a folhagem é persistente e em outras é estacional. Nestas últimas a folhagem se perde durante o período de seca Raymundez (et al. 2005). *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (Figura 2) é uma erva perene bulbosa. Pode variar de 60 a 70 cm, com bulbos de 7 a 10 cm de diâmetro. As flores são grandes, brancas, perfumadas, e sésseis. Os tépalas são adnatas ligadas a taça estaminal. Cada tubo de flor é de 14 a 17 cm.

O lírio aranha, como é conhecida, é uma espécie tropical conhecida desde a antiguidade por possuir propriedades antitumorais. A primeira investigação química desta planta foi realizada por Goter (1920 apud IDSO et al., 2000). Pettiti et al. (1986) constataram que a espécie contém propriedades antivirais e antineoplásticas, além disso isolaram a pancratissina partir dos bulbos de *H. littoralis* (originalmente identificada como *Pancreatium littorale*). De acordo com Sundarasekar et al. (2013) os extratos obtidos a partir dos bulbos, raízes e anteras da espécie *H. littoralis* apresentam atividade antioxidante e que esta atividade está relacionada a presença de compostos fenólicos e flavonóides nesses extratos.

Abdullah et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de 19 espécies floríferas da Malásia, entre elas *H. littoralis*. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que os extratos das folhas e flores da espécie apresentaram ação contra *Bacillus subtilis* e dos bulbos contra *B. subtilis* e *Escherichia coli*.

Figura 2: *Crinum americanum* L. (A) e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (B)



REFEÊNCIAS

- ABDULLAH, E.; RAUS, A.A.; JAMAL, P. Extraction and evaluation of antibacterial activity from selected flowering plants. **American Medical Journal**, v.3, n.1, p.27-32, 2010.
- ALEXOPOULOS, C.J. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1962.
- ALI, A.A.; EL SAYBD, H.M.; ABDALLAH, O.M.; STEGLJCH, W. Oxocrinine and other alkaloids from *Crinum americanum*. **Phytochemistry**, v.25, n.10, p.2399-2401, 1986.
- ALY, A.H.; DEBBAD, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Divers**, v.41, n.1, p.1-16, 2010.
- ALY, A.H.; DEBBAD, A.J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, p.1829-1845, 2011.
- ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and application of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Pres, 2007, p.189-207.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERINI, JR.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review of insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.40-65, 2000.
- CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.421-437, 2013.
- CEHRRY, A.J.; BENITO, A.; DJEQUI, D.; LOMER, C. Suppression of the stem-borer *Sesamia calamistis* (Lepodoptera, Noctuidea) in maize following seed dressing, topical application and steam injection with African isolates of *Beauveria bassiana*. **International Journal of Pest Management**, v.50, p.67-73, 2004.
- CLAY, K.; HARDY, T.N.; JR, A.M.H. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. **Oecologia**, v.66, p.1-5, 1985.
- DESALE, M. G.; BODHANKAR, M. G. (2013) Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From *Vitex negundo* Linn. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, n.12, p.389-395, 2013.
- FENNELL, C.W.; VAN STADEN, J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.15-26, 2001.
- GARCÍA-MENDOZA, A.J. Especie nueva de *Hymenocallis* (Amaryllidaceae) de Oaxaca y Puebla, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v.81, p.625-628, 2010.

GHOSAL, S.; SAINI, K.S.; RAZDAN, S. *Crinum* alkaloids: their chemistry and biology. **Pytochemistry**, v.24, n.10, p.2141-2156, 1985.

IDSO, S.B.; KIMBALL, B.A.; PETTIT III, G.R.; GARNER, L.C.; PETTIT, G.R.; BACKHAUS, R.A. Effects of atmospheric CO₂ enrichment on the growth and development of *Hymenocallis littoralis* (Amaryllidaceae) and the concentrations of several antineoplastic and antiviral constituents of its bulbs. **American Journal of Botany**, v.87, n.6, p.769–773, 2000.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.20, p.606-614, 2003.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.22, p.111-126, 2005.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.24, p.886-905, 2007.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.26, p.363-381, 2009.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.28, p.1126-1142, 2011.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHU, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

LACAVA, P.T.; SEBASTIANES, F.L.S.; AZEVEDO, J.L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: ESPOSITO, E; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2010, p.533-570.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MAGALHÃES, W.C.S.; MISSAGIA, R.V.; COSTA, F.A.F.; COSTA, M.C.M. Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish. **Cerne**, v.14, n.3, p.267-273, 2007.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, v.98, n.4, p.380–386, 2008.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos. **Biociência**, v.29, p.62-76, 2002.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Blacpma**, v.3, n.4, p.69-72, 2004.

OWNLEY, B.H.; GWINN, K.D.; VEGA, F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v.55, n.1, p.113-128, 2010.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANREWS, J.H.; HIRANO, S.S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991.

PETTIT, G.R., GADDAMIDI, V.; HERALD, D.L.; SINGH, S.B.; CRAGG, G.M.; SCHMIDT, J.M.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAGAWA, Y. Antineoplastic agents 120. *Pancratium littorale*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.995-1002, 1986.

RAMOS, H.P.; SAID, S. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v.2, p.443-449, 2011.

RAYMÚNDEZ, M.B.; ESCALA, M.; ENRECH, N.X. Morfoanatomía foliar como herramienta para lá delimitación de especies dell género *Hymenocallis* Salisb. (Amaryllidaceae) presentes em Venezuela. **Acta Botánica Venezuelica**, v.28, n.2, p.301-320, 2005.

RIBEIRO, J.P.N.; LIMA, M.I.S. Potencial alelopático de *Crinum americanum* L. sob diferentes condições de extração. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.465-472, 2011.

RIBEIRO, J.P.N.; MATSUMOTO, R.S.; TAKAO, L.K.; VOLTARELLI, V.M.; LIMA, M.I.S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, n.1, p.183-188, 2009.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, n.6, p.661-686, 2005.

SELIM, K.A.; EL-BEIH, A.A.; ABDEL-RAHMAN T.M.; EL-DIWANY, A.I. Biology of Endophytic Fungi. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v.2, n.1, p.31-82, 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias das Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

- SPECIAN, V.; SARRAGIOTTO, M.H.; PAMPHILE, J.A.; CLEMENTE, E. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricate*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.1174-1182, 2012.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungi of pacific yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, n.6, p.535-544, 2003.
- SUNDARASEKAR, J.; SAHGAL, G.; MUBBARAKH, S.A.; SUBRAMANIAM, S. Potential antioxidant activities of methanolic extracts of spider lily (*Hymenocallis littoralis*). **AJCS**, v.7, n.5, p.625-631, 2013.
- TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p.448-459, 2001.
- TAYUNG, K.; SARKAR, M.; BARUAH, P. Endophytic Fungi Occurring in *Ipomoea carnea* Tissues and their Antimicrobial Potentials. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, n.5, p.653-660, 2012.
- TRAM, N.T.N.; TITORENKOVA, T.V.; BANKOVA, V.S.; HANDJIEVA, N.V.; POPOV, S.S. *Crinum* L. Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v.73, p.183-208, 2002.
- VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M. C.; PAIVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F.; REHNER, S.A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v.47, p.72-82, 2008.
- YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. (2012) The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Product Reports**, v.29, p.622-641, 2012.

CAPÍTULO 1: DETECÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Crinum americanum* L. E *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. E DAS PLANTAS HOSPEDEIRAS

RESUMO

A família Amaryllidaceae tem destacado potencial biotecnológico e farmacológico devido à variedade de compostos ativos que produzem. Já foram isolados vários alcaloides de espécies dos gêneros *Crinum* e *Hymenocallis*, alguns dos quais possuem efeitos farmacológicos. Fungos endofíticos são fontes promissoras de biomoléculas com importantes atividades biológicas. Alguns desses micro-organismos são capazes de produzir as mesmas substâncias que a planta hospedeira e existem algumas vantagens na utilização de produtos naturais bioativos provenientes de fungos endofíticos em substituição aos produzidos por plantas. Com o intuito de contribuir para o conhecimento do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de Amaryllidaceae este trabalho teve como objetivo detectar a presença de classes de metabólitos e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das plantas hospedeiras. Foram isolados fungos endofíticos das folhas e bulbos das duas espécies de Amaryllidaceae selecionadas. As linhagens foram cultivadas para a obtenção de extratos. Os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada utilizando-se reveladores para a detecção de lipídios, cumarinas, antronas, antraquinonas e alcaloides. Foram selecionadas 12 linhagens de fungos endofíticos que apresentaram os melhores resultados na detecção e os extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em comparação com os extratos metanólicos das plantas hospedeiras. Foi avaliada também a atividade antimicrobiana destes extratos. Entre os extratos dos fungos endofíticos avaliados 49 já foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Coletotrichum*, *Acremonium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Constatou-se que 56 linhagens analisadas apresentaram em seus extratos lipídeos, 21 cumarinas, 29 antronas e 2 apresentaram alcaloides. Os métodos cromatográficos utilizados permitiram a constatação de que fungos endofíticos são capazes de produzir algumas das mesmas classes de metabólitos que as plantas hospedeiras. A avaliação da atividade antimicrobiana destacou alguns extratos com atividade contra *Candida parapsilosis*. O extrato metanólico das folhas de *H. littoralis* e do fungo endofítico MIBA 0796 apresentaram os resultados mais relevantes com percentual de inibição acima de 60% contra a levedura. Este estudo comprovou que tanto os fungos endofíticos quanto as espécies hospedeiras investigadas apresentam potencial para a produção de classes de metabólitos secundários e pode-se constatar a correlação metabólica entre classes detectadas nos extratos fúngicos e vegetais.

Palavras-chave: metabólitos secundários, correlação metabólica, atividade antimicrobiana.

1.1 INTRODUÇÃO

A família Amaryllidaceae é composta por cerca de 85 gêneros e aproximadamente 1100 espécies e está entre 20 famílias de plantas medicinais mais usadas (JIN, 2009). A Família tem destacado potencial biotecnológico e farmacológico devido à variedade de compostos ativos que produzem. Aproximadamente 500 alcalóides diferentes já foram isolados e a maioria apresenta atividade biológica significativa, sendo alguns deles aprovados para terapias clínicas (JIN, 2005). Os alcaloides da família Amaryllidaceae são membros do grande grupo dos alcaloides isoquinolínicos e já foram isolados a partir de quase todos os gêneros da família. Estes alcaloides têm sido relatados como fonte potencial de atividade inibidora da acetilcolinesterase utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer (MUKHERJEE et al., 2007).

As espécies *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. foram selecionadas para este estudo. Espécies do gênero *Crinum* tem importância comercial, econômica e medicinal (TRAM et al., 2002). Várias espécies possuem atividades biológicas e são relatados importantes usos medicinais. *Crinum americanum* é um macrófita que possui dominância em muitos locais, o que explica a sua comprovada ação alelopática (RIBEIRO et al., 2009; RIBEIRO; LIMA, 2011). Tram et al. (2002) em revisão sobre o gênero *Crinum*, destacaram alguns registros da produção de alcaloides, ácidos graxos e flavonoides pela espécie.

Mais de 19 alcaloides já foram isolados de *H. littoralis*, entre eles licorina, littoralina, hippeastrina, licorenina, tazetina, pretazettina, macronina, homolicorina, vittatina e haemantamina (JI et al., 2014). Estes compostos possuem vários efeitos farmacológicos, tais como antivirais, antiparasitários, anticancerígenos, antibacterianos, antioxidantes, e cicatrização de feridas (SUBRAMANIAM et al., 2014).

De acordo com Azevedo e Araújo (2007) os fungos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Estes micro-organismos podem fornecer proteção a planta hospedeira contra predadores (AZEVEDO et al., 2000), aumentar a resistência dos vegetais contra estresses bióticos e abióticos, produzir hormônios de crescimento (AZEVEDO, 2014).

Além dos benefícios que podem fornecer as plantas os fungos endofíticos podem produzir metabólitos secundários agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, lignanas, ácidos fenólicos e

outros (CHAPLA et al., 2013). Estudos mostram que estes micro-organismos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários, conhecidos anteriormente apenas em plantas (TAWARE et al., 2014; CHITHRA et al., 2014; PARTHASARATHY; SATHIYABAMA, 2014; KUMAR et al., 2013; SHWETA et al., 2013; CUI et al., 2012; ZHANG et al., 2011; YIN; SUN, 2011). Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol®, um importante fármaco anticancerígeno, isolado inicialmente da planta *Taxus brevifolia* e também produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado da mesma planta (CHAPLA et al., 2013).

Tendo em vista o potencial de espécies de Amaryllidaceae na produção de metabólitos secundários com aplicações biotecnológicas e a escassez de estudos sobre a microbiota endofítica da família, este trabalho teve como objetivo detectar a presença de classes de metabólitos nos extratos de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. Desta forma foi feito um estudo comparativo das linhagens mais promissoras na detecção destas classes de metabólitos investigando-se o perfil químico e a atividade antimicrobiana tanto dos extratos das linhagens endofíticas quanto dos extratos das plantas hospedeiras.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GERAL

Detectar a presença de classes de metabólitos e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das plantas hospedeiras.

1.2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar fungos endofíticos de folhas e bulbos de *C. americanum* e *H. littoralis*;
- ✓ Realizar a identificação clássica em nível de gênero dos fungos endofíticos isolados;
- ✓ Obter extratos metanólicos a partir dos cultivos dos fungos endofíticos;
- ✓ Obter extratos metanólicos a partir das folhas e bulbos de *C. americanum* e *H. littoralis*;
- ✓ Detectar diferentes classes de metabólitos nos extratos fúngicos e vegetais por meio de Cromatografia em Camada Delgada e utilização de reveladores;
- ✓ Comparar os perfis químicos dos extratos de fungos endofíticos e das respectivas plantas hospedeiras por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Áreas de coletas

Foram realizadas duas coletas de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (Tabela 1), sendo uma em área de terra firme e outra em área alagável. Para a coleta de *Crinum americanum* L. feita na Universidade Federal do Pará em área de terra firme foi confeccionada uma exsicata que está depositada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental com o número de registro 193664.

Tabela 1: Áreas de coleta de *Crinum americanum* L e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

| ESPÉCIE | ÁREA DE COLETA | CARACTERIZAÇÃO | PARTE DA PLANTA |
|---------------------|--------------------|----------------|-----------------|
| | | DA ÁREA | ANALISADA |
| <i>Hymenocallis</i> | UFPA | Terra firme | Folhas |
| <i>littoralis</i> | UFPA | Alagável | Folhas e bulbos |
| <i>Crinum</i> | UFPA | Terra firme | Folhas e bulbos |
| <i>americanum</i> | Ilha de Caratateua | Alagável | Folhas |

1.3.2 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

Foram utilizadas as folhas e os bulbos de *Crinum americanum* L. e de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. para o isolamento de fungos endofíticos sendo o experimento realizado em triplicata. De cada folha foram retirados fragmentos das regiões proximal, mediana e distal e dos bulbos foram retiradas amostras das gemas, catafilos e prato.

As amostras vegetais foram lavadas com água corrente e detergente neutro para a retirada dos resíduos e contaminantes externos. Foram retirados pequenos fragmentos dos bulbos e das folhas e estes passaram pelo processo de assepsia. Tal processo consistiu na imersão das amostras em álcool 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2% durante 2 minutos, álcool 70% durante 30 segundos e lavagem em água destilada estéril da qual se retirou 20 µL para o controle da assepsia (PEREIRA et al., 1993). Estes fragmentos foram inoculados em meio Agar-Sabouraud acrescido de clorafenicol (1µL/mL) e incubados a 28°C durante 7 dias. Após o período de incubação os micro-organismos foram isolados através de

repiques sucessivos em placas de Petri contendo meio BDA (batata 20%, glicose 2%, Agar 2%) e posteriormente preservados e depositados na Coleção de Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia (MIBA) pertencente aos Laboratórios de Investigação Sistemática em Biotecnologia e Biologia Molecular (LabISisBio) da Universidade Federal do Pará (UFPA)

Os fungos isolados foram identificados por meio de observações de características como a forma e coloração e de visualização das culturas em lâmina temporânea corada com lactofenol azul-algodão em microscópio de luz. As identificações dos gêneros foram obtidas através da comparação das estruturas vegetativas e reprodutivas. Os resultados foram comparados com a específica.

1.3.3 Obtenção de extratos a partir de cultivo semissólido dos fungos endofíticos

Neste estudo foram utilizadas 94 linhagens de fungos endofítico isolados a partir das folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. Cada uma das linhagens de fungos foi cultivada em meio Agar-SPY (sacarose 2%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, Agar 2%) por 15 dias. Em seguida o material foi transferido para frascos de Erlenmeyer e foi adicionado 120 mL da mistura de metanol, ácido acético e água na proporção 8:1:1 (v:v:v). O material foi filtrado e posteriormente concentrado em Turbovap® LV Concentration Evaporator Workstation.

1.3.4 Detecção de classes de metabólitos nos extratos fúngicos

A detecção de classes de metabólitos nos extratos obtidos a partir das linhagens de fungos endofíticos isolados de *C. amricanum* e *H. littoralis* foi realizada por meio de técnicas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Utilizou-se cromatoplasacas tendo como fase móvel metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v). Foram utilizados reveladores para a detecção de lipídios, alcaloides, antranas, antraquinonas e cumarinas (WAGNER; BLADT, 1995) (Tabela 3) e aferidos os fatores de retenção (Rf) para cada banda revelada conforme a equação abaixo.

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pela amostra}}{\text{Distância percorrida pela fase móvel}}$$

1.3.5 Seleção e cultivo submerso de fungos endofíticos para a obtenção de extratos

Com base nos resultados obtidos a partir da detecção de metabólitos nos extratos dos fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. foram selecionadas as 12 linhagens que apresentaram os melhores resultados (Tabela 2).

Tabela 2: Linhagens de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. selecionadas

| ESPÉCIE | ÓRGÃO DE ORIGEM | LINHAGENS |
|--------------------------------|-----------------|-----------|
| <i>Crinum americanum</i> | Bulbos | MIBA 0422 |
| | | MIBA 0433 |
| | | MIBA 0436 |
| | | MIBA 0478 |
| <i>Hymenocallis littoralis</i> | Folhas | MIBA 0772 |
| | | MIBA 0775 |
| | | MIBA 0792 |
| | | MIBA 0793 |
| | | MIBA 0796 |
| | Bulbos | MIBA 0805 |
| | | MIBA 0808 |
| | | MIBA 0810 |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia.

As linhagens selecionadas foram cultivadas em meio BDA (batata 20%, glicose 2%, agar 2%) por 7 dias. Em seguida fragmentos do micélio com 0,4 mm de diâmetro foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 120 mL de meio SPY (sacarose 2%, peptona 0,5% e extrato de levedura 0,5%) para crescimento da biomassa, onde permaneceu por 3 dias a 120 rpm e 28°C. Em seguida o cultivo foi filtrado e ao micélio foram adicionados 120 mL de meio SPY (sacarose 1%, peptona 0,2% e extrato de levedura 0,2%) e permaneceram nas mesmas condições de agitação e temperatura por 15 dias. O material foi então filtrado e concentrado em Turbovap® LV Concentration Evaporator Workstation.

1.3.6 Obtenção dos extratos das folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

Após a coleta as folhas e bulbos de *C. americanum* e *H. littoralis* foram lavados, secos e cortados em pequenos pedaços. Permaneceram 72h em estufa a 50° C, para a retirada de água dos tecidos vegetais. O material foi triturado e foram realizadas duas extrações com metanol (30 min. cada). O material foi filtrado e concentrado em Turbovap® LV Concentration Evaporator Workstation.

1.3.7 Análise comparativa dos extratos dos fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das plantas hospedeiras

1.3.7.1 Detecção de classes de metabólitos nos extratos fúngicos e vegetais

A detecção de classes de metabólitos nos extratos obtidos a partir das linhagens de fungos endofíticos e das plantas hospedeiras, como descrito nos itens anteriores, foi realizada por meio de técnicas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Utilizou-se cromatoplasas tendo como fase móvel clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v). Os reveladores utilizados para a detecção de metabólitos (WAGNER; BLADT, 1995) estão listados na Tabela 3.

Tabela 3: Reveladores utilizados para a detecção de metabólitos nos extratos fúngicos e vegetais

| Reveladores | Classe de metabólito | Coloração |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Vanilina sulfúrica (VAS) | - | - |
| Ácido fosfomolibdico (PMA) | Lipídios | Verde |
| Reagente de Dragendorff (DGR) | Alcaloides | Alaranjado |
| Hidróxido de potássio (KOH) | Cumarinas | Azul fluorescente em 365 nm |
| | Antronas | Amarelo fluorescente em 365 nm |
| | Antraquinonas | Vermelho em luz visível |
| Cloreto férrico (CF) | Compostos fenólicos | Marrom |

1.3.7.2 Análise do perfil químico dos extratos fúngicos e vegetais por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Para a obtenção do perfil cromatográfico dos extratos fúngicos e vegetais por CG/EM foram utilizados aproximadamente 10 mg de cada amostra. Às amostras foram adicionados 100 µL do derivatizante BSTFA (KOPKA, 2006) e mantidas sob agitação a 35° e 400 RPM por 5 minutos, em seguida adicionou-se 50 µL de piridina. Foi adicionado diclorometano a cada amostra até completar 500 µL. O material foi centrifugado por 3 min. a 10.000 RPM e em seguida, o sobrenadante transferido para tubos vial para análise. As amostras foram analisadas em um Cromatógrafo Gasoso (CG) *ThermoScientific* Trace 1300 acoplado a um Espectrômetro de Massas (EM) *ThermoScientific* MS-ISQ Single Quadrupolo com auto-amostrador AI 1310, equipado com coluna capilar de sílica fundida RTX-65TG (15m x 0,25mm-ID x 0,1µm de fase estacionária). O gás Hélio foi usado como carreador a um fluxo de 1mL / min. A injeção de amostra foi de 1,0 µL no modo *Splitless*, o injetor operou a 220 °C e a rampa de temperatura do forno iniciou com 40 °C até 300 °C (10 °C/min.), mantendo-se nesta temperatura por 5 min. O MS-ISQ operou com interface a 275 °C, fonte de ionização a 200 °C, com faixa de massa de 40 a 800 Da e varredura de 0,5 *scan/s*. A ionização eletrônica foi de 70 eV e a tensão de aceleração (filamento) foi ligada após 3 minutos do início da análise. As identificações das substâncias foram realizadas através da comparação dos espectros de massas das amostras com os das bibliotecas comerciais NIST 2011-WILEI 2009.

1.3.8 Atividade antimicrobiana

1.3.8.1 Preparo dos inóculos

Para a investigação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas cedidas pela Coleção de Cultura de Fungos Filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Realizaram-se os testes com quatro leveduras: *Candida parapsilosis* (IOC 2882), *Candida tropicalis* (IOC 3610), *Candida albicans* (IOC 3770) e *Candida guilliermondii* (IOC 2889). As leveduras foram cultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose, incubados a 27°C por 5 dias. Após crescimento dos micro-organismos foram preparados os inóculos. De cada cultura de levedura foi retirada uma amostra e transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,9%. A solução foi ajustada para uma concentração de 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônias para cada 1 mL de solução (UFC/mL).

1.3.8.2 Método do disco difusão em Agar

Para avaliar a sensibilidade dos microrganismos aos extratos metanólicos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e dos fungos endofíticos utilizou-se extratos na concentração de 20 mg/mL. Por meio do método qualitativo de difusão em Agar (BAUER et al., 1966) foram aplicados 20 µL de cada amostra sobre discos de papel de filtro qualitativo de 5 mm de diâmetro dispostos sobre placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Agar-GPY (glicose 2%, peptona 0,25%, extrato de levedura 0,25% e Agar 2%). Em seguida foi inoculado 20 µL da suspensão de micro-organismos na concentração de 1×10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) das espécies de *Candida* selecionadas. Na mesma placa foi disposto o controle positivo contendo 20 µL de nitrato de miconazol (50mg/mL) e o controle negativo contendo 20 µL de metanol, o solvente de dissolução das amostras. As placas foram incubadas à 28°C por 72h e a atividade foi considerada positiva a partir da observação de um halo formado em volta do disco de papel. Este halo foi mensurado e comparado ao controle positivo.

1.3.8.3 Avaliação da atividade relativa

A atividade relativa dos extratos que apresentaram resultados positivos no método qualitativo foi avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (HERRERA, 2001). Foram aplicadas alíquotas de 100 µL de cada extrato investigado na concentração de 20 mg/mL em placas de Petri contendo meio de cultura Agar-GPY. Os extratos foram espalhados com o auxílio da alça de Drigalsky até secagem e em seguida as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 12 horas para evaporação do solvente. Alíquotas de 100µL da suspensão de *Candida parapsilosis* foram semeadas tanto nas placas que já continham os extratos quanto em placas sem extratos, para comparação e controle de crescimento das leveduras. As placas contendo extrato e a solução de micro-organismos e as placas contendo apenas esta solução foram incubadas a 28°C por 72h. Os testes foram realizados em duplicata e a partir da leitura de crescimento dos micro-organismos (UFC/72 horas) foi calculada a atividade relativa de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Relativa (\%)} = \left(\frac{mc - ma}{mc} \right) \times 100$$

mc = média do controle

ma = média da amostra

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

Com isolamento de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. obteve-se 94 linhagens de fungos filamentosos, dos quais 49 já foram identificados em nível de gênero (Tabela 4). Entre as linhagens já identificadas isoladas das folhas de *C. americanum* observou-se a ocorrência do gênero *Colletotrichum* e nos bulbos foram identificadas linhagens pertencentes aos gêneros *Colettotrichum*, *Acremonium* e *Trichoderma*. Com relação aos fungos isolados de *H. littoralis* tanto nas folhas quanto nos bulbos encontraram-se fungos do gênero *Colletotrichum* e entre as linhagens isoladas das folhas coletadas em área de terra firme ocorrem também fungos do gênero *Fusarium*.

Tabela 4: Número de fungos endofíticos isolados de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

| Espécie | Área | Órgão | Gênero | | | | | Total |
|--------------------------------|----------|--------|-----------------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------|-------|
| | | | <i>Colletotrichum</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Acremonium</i> | <i>Trichoderma</i> | Não id. | |
| <i>Crinum americanum</i> | T. firme | Folhas | 3 | - | - | - | 2 | 5 |
| | | Bulbos | 1 | - | 10 | 5 | 18 | 34 |
| | Alagável | Folhas | 5 | - | - | - | 3 | 8 |
| <i>Hymenocallis littoralis</i> | T. firme | Folhas | 8 | 7 | - | - | 6 | 21 |
| | Alagável | Folhas | 9 | - | - | - | 8 | 17 |
| | | Bulbos | 1 | - | - | - | 8 | 9 |

1.4.2 Detecção de classes de metabólitos nos extratos de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

Foram analisados extratos de 94 linhagens de fungos endofíticos isolados de *C. americanum* e *H. littoralis* distribuídas conforme a tabela 4. Com o estudo em Cromatografia em Camada Delgada e utilização de reveladores para a detecção de metabólitos constatou-se que 69 linhagens apresentam em seu extrato pelo menos uma das classes de metabólitos investigadas (Tabelas 5-8). Observou-se que 56 linhagens de fungos endofíticos apresentam

em seu extrato lipídios, 21 apresentam cumarinas, 29 apresentam antronas e 2 apresentam alcaloides.

Tabela 5: Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados das folhas de *Crinum americanum* L.

| Área de coleta | Código MIBA | Gênero | Classes de metabólitos (Rf) | | | |
|-------------------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|----------|------------|
| | | | Lipídios | Cumarinas | Antronas | Alcaloides |
| UFPA (Terra firme) | 0541 | <i>Colletotrichum</i> | 0,89 | - | - | - |
| | 0551 | <i>Colletotrichum</i> | 0,89 | - | - | - |
| Ilha de Caratateua (Alagável) | 0556 | <i>Colletotrichum</i> | 0,88 | - | - | - |
| | 0573 | Não identificado | 0,89 | - | - | - |
| | | | 0,58 | | 0,33 | |
| | 0574 | Não identificado | 0,73 | 0,63 | 0,55 | 0 |
| | | | 0,93 | 0,93 | 0,75 | |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Tabela 6: Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos bulbos de *Crinum americanum* L.

| Área de coleta | Código MIBA | Gênero | Classes de metabólitos (Rf) | | | |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|----------|------------|
| | | | Lipídios | Cumarinas | Antronas | Alcaloides |
| UFPA (Terra firme) | 0416 | <i>Acremonium</i> | 0,95 | - | 0,68 | - |
| | 0417 | Não identificado | 0,95 | - | - | - |
| | 0419 | <i>Acremonium</i> | 0,95 | - | - | - |
| | 0420 | Não identificado | 0,98 | - | - | - |
| | 0422 | <i>Acremonium</i> | 0,98 | - | 0,65 | - |
| | 0425 | Não identificado | 0,95 | - | - | - |
| | 0426 | <i>Colletotrichum</i> | 0,95 | - | - | - |
| | 0429 | <i>Trichoderma</i> | 0,95 | - | - | - |
| | 0433 | Não identificado | 0,95 | - | 0,85 | - |
| | 0434 | Não identificado | 0,95 | - | - | - |
| | 0435 | Não identificado | 0,98 | - | - | - |
| | 0436 | <i>Acremonium</i> | 0,95 | - | 0,68 | - |
| | 0437 | Não identificado | 0,95 | - | - | - |
| | 0442 | Não identificado | - | 0,50 | - | - |
| | 0451 | Não identificado | 0,95 | - | - | - |
| | 0453 | <i>Acremonium</i> | 0,93 | - | - | - |
| | 0454 | <i>Acremonium</i> | 0,93 | - | - | - |
| | 0455 | <i>Acremonium</i> | 0,95 | - | - | - |
| | 0456 | <i>Trichoderma</i> | 0,93 | - | - | - |
| | 0458 | Não identificado | - | - | 0,70 | - |
| | 0460 | Não identificado | 0,93 | - | - | - |
| | 0461 | <i>Acremonium</i> | - | - | 0,68 | - |
| | 0464 | Não identificado | 0,93 | - | - | - |
| | 0466 | Não identificado | 0,93 | - | - | - |
| | 0469 | <i>Trichoderma</i> | 0,93 | - | - | - |
| | 0472 | <i>Trichoderma</i> | 0,93 | - | - | - |
| | 0473 | Não identificado | 0,95 | - | - | - |
| | 0474 | Não identificado | 0,93 | - | - | - |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Continuação Tabela 6: Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos bulbos de *Crinum americanum* L.

| Área de coleta | Código MIBA | Gênero | Classes de metabólitos (Rf) | | | |
|-----------------------|-------------|--------------------|-----------------------------|--------------|----------|------------|
| | | | Lipídios | Cumarinas | Antronas | Alcaloides |
| UFPA (Terra firme) | 0477 | Não identificado | 0,90 | - | 0,87 | - |
| | 0478 | Não identificado | 0,90 | 0,53 0,83 | 0,68 | - |
| | 0479 | <i>Trichoderma</i> | 0,90 | - | - | - |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Tabela 7: Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

| Área de coleta | Código MIBA | Gênero | Classes de metabólitos (Rf) | | | |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|--------------|----------|------------|
| | | | Lipídios | Cumarinas | Antronas | Alcaloides |
| UFPA (Terra firme) | 0588 | <i>Colletotrichum</i> | - | - | 0,80 | - |
| | 0590 | Não identificado | - | 0,83 | - | - |
| | 0591 | Não identificado | - | 0,78 | - | - |
| | 0593 | <i>Colletotrichum</i> | - | 0,79 | - | - |
| | 0595 | <i>Fusarium</i> | - | - | 0,78 | - |
| | 0597 | Não identificado | - | - | 0,79 | - |
| | 0600 | Não identificado | - | 0,79 | 0,74 | - |
| | 0602 | Não identificado | - | - | 0,74 | - |
| | 0603 | <i>Colletotrichum</i> | - | - | 0,73 | - |
| | 0607 | <i>Fusarium</i> | 0,73 | - | 0,73 | - |
| UFPA (Alagável) | 0771 | <i>Colletotrichum</i> | 0,93 | - | 0,73 | - |
| | 0772 | <i>Colletotrichum</i> | 0,90 | 0,85 | 0,65 | - |
| | 0773 | <i>Colletotrichum</i> | 0,85 | 0,85 | - | - |
| | 0775 | <i>Colletotrichum</i> | 0,85 | 0,58 0,85 | 0,68 | - |
| | 0777 | Não identificado | 0,93 | 0,85 | - | - |
| | 0788 | <i>Colletotrichum</i> | 0,58 0,95 0,58 | 0,50 | - | - |
| | 0790 | Não identificado | 0,75 0,95 0,60 | - | - | - |
| | 0791 | Não identificado | 0,75 0,95 0,60 | - | 0,85 | - |
| | 0792 | Não identificado | 0,75 0,95 | 0,48 | 0,85 | - |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Continuação Tabela 7: Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

| Área de coleta | Código MIBA | Gênero | Classes de metabólitos (Rf) | | | |
|----------------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|----------|------------|
| | | | Lipídios | Cumarinas | Antronas | Alcaloides |
| UFPA (Alagável) | 0793 | <i>Colletotrichum</i> | 0,63 | 0,35 | 0,63 | |
| | | | 0,83 | 0,53 | 0,83 | - |
| | | | 0,95 | 0,88 | 0,95 | |
| | 0795 | Não identificado | 0,58 | | 0,43 | - |
| | | | 0,95 | - | | |
| | 0796 | Não identificado | 0,93 | 0,58 | 0,95 | - |
| | | | 0,60 | | | |
| | 0797 | Não identificado | 0,75 | | | |
| | | | 0,85 | 0,48 | - | - |
| | | | 0,95 | | | |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Tabela 8: Classes de metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

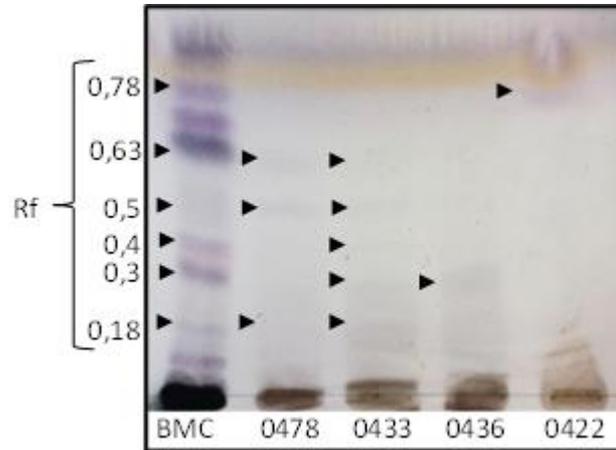
| Área de coleta | Código MIBA | Gênero | Classes de metabólitos (Rf) | | | |
|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|----------|------------|
| | | | Lipídios | Cumarinas | Antronas | Alcaloides |
| UFPA (Alagável) | 0799 | <i>Colletotrichum</i> | 0,63 | 0,35 | 0,80 | 0,90 |
| | | | 0,75 | | | |
| | | | 0,93 | | | |
| | 0801 | Não identificado | 0,55 | 0,55 | - | - |
| | | | 0,95 | | | |
| | 0803 | Não identificado | 0,58 | - | - | - |
| | | | 0,85 | | | |
| | | | 0,95 | | | |
| | 0804 | Não identificado | 0,58 | - | - | - |
| | | | 0,75 | | | |
| | 0805 | Não identificado | 0,95 | 0,58 | 0,95 | - |
| | | | 0,58 | | | |
| | | | 0,75 | | | |
| | 0806 | Não identificado | 0,93 | - | - | - |
| | | | 0,75 | | | |
| 0,58 | | | | | | |
| 0808 | Não identificado | 0,73 | 0,78 | 0,93 | - | |
| | | 0,93 | | | | |
| 0809 | Não identificado | 0,93 | - | 0,95 | - | |
| | | 0,58 | | | | |
| 0810 | Não identificado | 0,75 | 0,40 | - | - | |
| | | 0,93 | | | | |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição metanol e butanol na proporção 8:2 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

1.4.3 Comparação dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das respectivas espécies hospedeiras por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

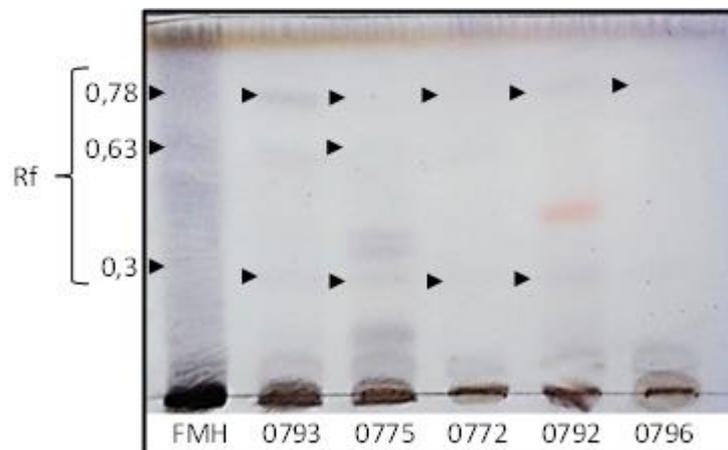
Foram selecionadas 12 linhagens de fungos endofíticos, sendo 4 isolados a partir dos bulbos de *Crinum americanum* L. e as outras 8 provenientes das folhas e bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. O material proveniente dos cultivos em meio SPY depois de ser filtrado e concentrado deu origem ao extrato bruto. Esses extratos fúngicos foram analisados em comparação com os extratos metanólicos dos mesmos órgãos das espécies hospedeiras (Figuras 3-5) de onde cada linhagem foi isolada. Os extratos foram inicialmente avaliados por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com a utilização do reagente Vanilina Sulfúrica (VAS) para evidenciar as diferentes bandas resultantes do fracionamento dos extratos. Foram levadas em consideração apenas as bandas dos extratos fúngicos que apresentaram Rf correspondente e coloração semelhante no extrato vegetal. Da mesma forma foram aferidos os Rf's das bandas dos extratos metanólicos de *C. americanum* (Figura 3) e *H. littoralis* (Figuras 4 e 5) que apresentaram correspondentes em algum dos extratos fúngicos.

Figura 3: Análise em Cromatografia em Camada Delgada dos extratos metanólicos dos bulbos de *Crinum americanum* L. (BMC) e linhagens de fungos endofíticos MIBA 0478, 0433, 0436 e 0422 revelados com Vanilina sulfúrica (VAS)



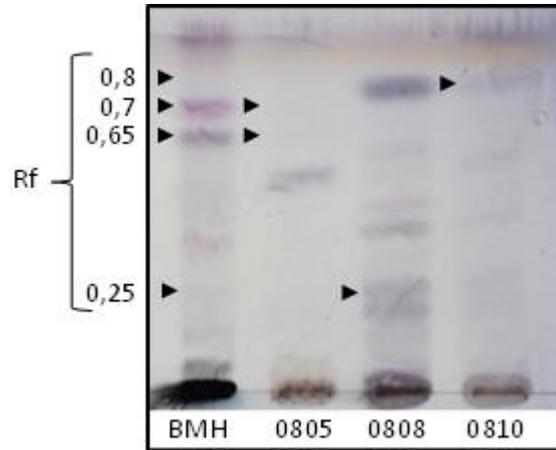
Legenda: Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v).

Figura 4: Análise em Cromatografia em Camada Delgada dos extratos metanólicos das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (FMH) e das linhagens de fungos endofíticos MIBA 0793, 0775, 0773, 0792 e 0796 revelados com Vanilina sulfúrica (VAS)



Legenda: Rf (fator de retenção) para o sistema eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v).

Figura 5: Análise em Cromatografia em Camada Delgada dos extratos metanólicos dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (BMH) e das linhagens de fungos endofíticos MIBA 0805, 0808 e 0810 revelados com Vanilina sulfúrica (VAS)



Legenda: Rf (fator de retenção) para o sistema eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v).

Com base nos resultados obtidos em CCD revelados com VAS constatou-se que todos os extratos fúngicos apresentavam pelo menos uma fração com Rf e coloração semelhante às frações presentes nos extratos dos bulbos das espécies hospedeiras. Não foram selecionadas linhagens de fungos endofíticos isoladas das folhas de *Crinum americanum* L., por não apresentarem resultados significativos nas análises de detecção das classes de metabólitos. Apesar de não haver linhagens para comparação o extrato metanólico das folhas foi analisado e apresentou resultados positivos para todas as classes de metabólitos investigadas com exceção das antraquinonas (Tabela 9).

Nos extratos metanólicos dos bulbos de *C. americanum* detectou-se a presença de lipídios, antronas, cumarinas e compostos fenólicos (Tabela 9). Com relação às classes de metabólitos detectadas tanto para os extratos dos bulbos quanto para as linhagens endofíticas constatou-se a ocorrência de lipídios e cumarinas (Figura 6). Além dessas duas classes a linhagem MIBA 0436 apresentou resultado positivo para alcaloide (Tabela 9).

Tabela 9: Classes de metabólitos detectadas nos extratos metanólicos dos bulbos de *Crinum americanum* L. e de fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta

| Classe de metabólito | Extrato metanólico das folhas | Extrato metanólico dos bulbos | MIBA 0422 | MIBA 0433 | MIBA 0436 | MIBA 0478 |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Lipídios | 0,18 | 0,43 | | | | |
| | 0,48 | 0,63 | 0,85 | 0,78 | - | 0,33 |
| | 0,68 | 0,75 | 0,90 | 0,85 | | |
| | 0,78 | 0,85 | | | | |
| Antronas | 0,10 | | | | | |
| | 0,23 | 0,88 | - | - | - | - |
| | 0,88 | | | | | |
| Cumarinas | 0,60 | 0,93 | 0,93 | 0,35 | 0,83 | 0,85 |
| Antraquinonas | - | - | - | - | - | - |
| Alcaloides | 0,13 | | | | | |
| | 0,45 | | | | | |
| | 0,60 | - | - | - | 0,75 | - |
| | 0,75 | | | | | |
| Compostos fenólicos | 0,15 | | | | | |
| | 0,33 | 0,30 | | | | |
| | 0,45 | 0,70 | | | | |
| | 0,58 | 0,48 | - | - | - | - |
| | 0,68 | 0,78 | | | | |
| | 0,83 | 0,85 | | | | |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Ao se comparar as classes de metabólitos presentes nos extratos dos fungos endofíticos das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. com o extrato metanólico da planta houve correlação entre as classes detectadas, onde os lipídios, antronas, cumarinas, alcaloides e compostos fenólicos encontrados no extrato vegetal ocorrem também nos extratos fúngicos (Tabela 10).

Tabela 10: Classes de metabólitos detectadas nos extratos metanólicos das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e de fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta

| Classe de metabólito | Extrato metanólico das folhas | MIBA 0772 | MIBA 0775 | MIBA 0792 | MIBA 0793 | MIBA 0796 |
|----------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Lipídios | 0,63 | | | | | |
| | 0,68 | 0,75 | 0,30 | 0,30 | 0,65 | 0,35 |
| | 0,75 | 0,83 | | | 0,90 | 0,90 |
| | 0,83 | | | | | |
| Antronas | 0,13 | | | | | |
| | 0,63 | 0,85 | 0,90 | 0,88 | 0,43 | 0,45 |
| | 0,68 | | | | | |
| | 0,75 | | | | | |
| Cumarinas | 0,23 | - | - | 0,83 | 0,38 | - |
| Antraquinonas | - | - | - | - | - | - |
| Alcaloides | 0,50 | 0,60 | - | 0,88 | - | - |
| | 0,58 | | | | | |
| Compostos fenólicos | 0,25 | - | 0,83 | 0,60 | - | - |
| | 0,75 | | | 0,78 | | |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

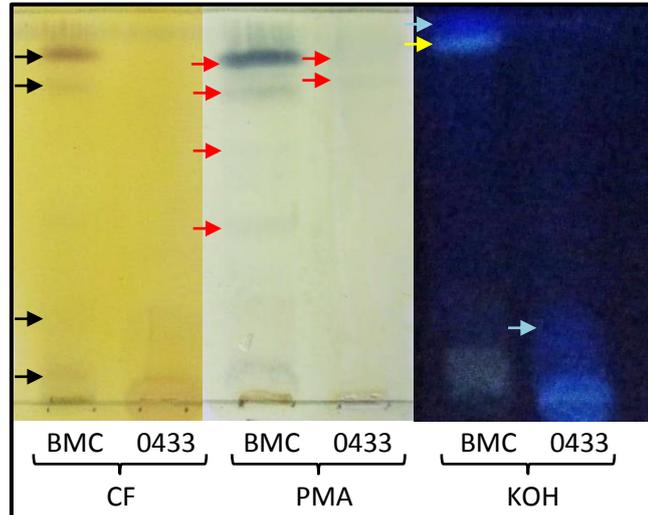
Nos extratos metanólicos dos bulbos da mesma espécie contactou-se a presença de lipídios, cumarinas e compostos fenólicos (Tabela 11; Figura 7). Com relação os extratos dos fungos isolados do mesmo órgão apenas os lipídios são comuns aos extratos fúngicos e vegetais. Todas as linhagens isoladas dos bulbos apresentaram resultados positivos para alcaloides e o extrato do fungo MIBA 0805 apresentou ainda uma antrona (Tabela 11).

Tabela 11: Classes de metabólitos detectadas nos extratos metanólicos dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e de fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta

| Classe de metabólito | Extrato metanólico dos bulbos | MIBA 0805 | MIBA 0808 | MIBA 0810 |
|----------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Lipídios | 0,38 | | 0,23 | 0,33 |
| | 0,75 | | 0,28 | 0,60 |
| | 0,80 | 0,80 | 0,45 | 0,78 |
| | 0,90 | | 0,50 | 0,85 |
| | | | 0,78 | 0,93 |
| Antronas | - | 0,73 | | - |
| Cumarinas | 0,30 | | | |
| | 0,88 | - | - | - |
| Antracnonas | - | - | - | - |
| Alcaloides | - | 0,90 | 0,85 | 0,88 |
| Compostos fenólicos | 0,73 | | | |
| | 0,78 | - | - | - |
| | 0,83 | | | |

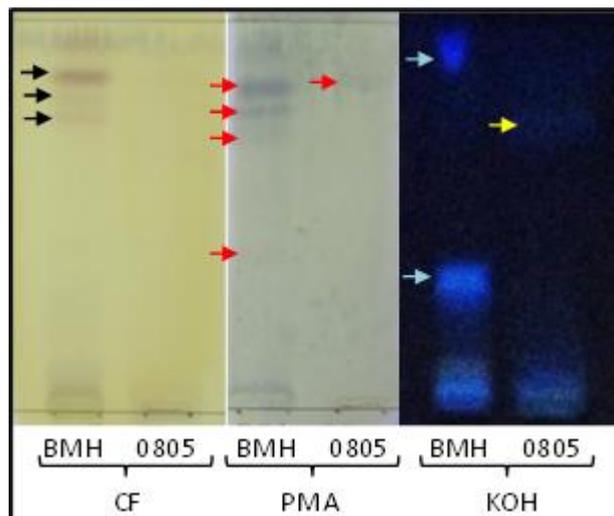
Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; Rf (fator de retenção) para o sistema de eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v); - = ausência da classe de metabólito.

Figura 6: Análise em Cromatografia em Camada Delgada do extrato metanólico dos bulbos de *Crinum americanum* L. e do fungo endofítico MIBA 0433 utilizando os reveladores Cloreto Férrico (CF), ácido fosfomolíbldico (PMA) e hidróxido de potássio (KOH)



Legenda: seta preta = compostos fenólicos; seta vermelha = lipídios; seta azul = cumarina; seta amarela = antrona; sistema de eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v).

Figura 7: Análise em CCD do extrato metanólico dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e do fungo endofítico MIBA 0805 utilizando os reveladores cloreto férrico (CF), ácido fosfomolíbldico (PMA) e hidróxido de potássio (KOH)



Legenda: seta preta = compostos fenólicos; seta vermelha = lipídios; seta azul = cumarinas; seta amarela = antrona; sistema de eluição clorofórmio e metanol na proporção 9:1 (v:v).

1.4.4 Comparação dos perfis químicos dos extratos dos fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das respectivas espécies hospedeiras por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

Os extratos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das linhagens de fungos endofíticos foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) e desta forma foram obtidos perfis cromatográficos dos extratos. A comparação dos extratos das espécies vegetais com os extratos das linhagens endofíticas foi realizada pela observação de picos e identificação de substâncias (Tabela 12) que ocorreram tanto nos extratos fúngicos quanto vegetais, considerando o mesmo órgão da planta (folhas ou bulbos) de onde as linhagens endofíticas foram isoladas. Estão listadas também outras substâncias que ocorreram somente nos extratos vegetais ou somente nos extrato fúngicos (Tabela 12).

1.4.4.1 *Crinum americanum* L.

O perfil do extrato metanólico das folhas de *Crinum americanum* L. (Figura 8) evidenciou a presença de ácido graxo esteárico (ácido octadecanóico) e os carboidratos α -D-glicopiranosídeo e sacarose. Foram encontradas também duas substâncias pertencentes à classe dos alcaloides denominadas de alcaloide 1 (Imino-6 (4-metilfenil)-3-oxo-2,5-difenil-1,2,3,4,5-pentahidroimidazol[1,5- α]pirazina-8-carboxiamida) e alcaloide 2 (2-Metoxi-3,5,6-trimetil-4-fenilpiridina).

O perfil do extrato metanólico dos bulbos de *C. americanum* (Figura 9) apresentou picos correspondentes a substâncias como os ácidos graxos palmítico (ácido hexadecanóico), esteárico (ácido octadecanóico) e alfa-linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico); os carboidratos α -D-glicopiranosídeo e sacarose e o flavonóide quercetina. Foi encontrada também uma substância pertencente à classe dos alcaloides denominada neste estudo de alcaloide 5 (metil 6-[4-(5-etil)-2,4,6-trióxido-1,3-diazin-5-il]-2metilbutan-2-il]oxi-3,4,5-tris(trimetilsiloxi)oxano-2-carboxilato).

Três substâncias identificadas nos extratos dos bulbos de *C. americanum* ocorrem também nos extratos dos fungos endofíticos isolados do mesmo órgão da planta (Figura 9), os ácidos palmítico e esteárico ocorrem em todos os extratos fúngicos e o ácido alfa-linolênico foi encontrado nas linhagens MIBA 0422, 0433 e 0436.

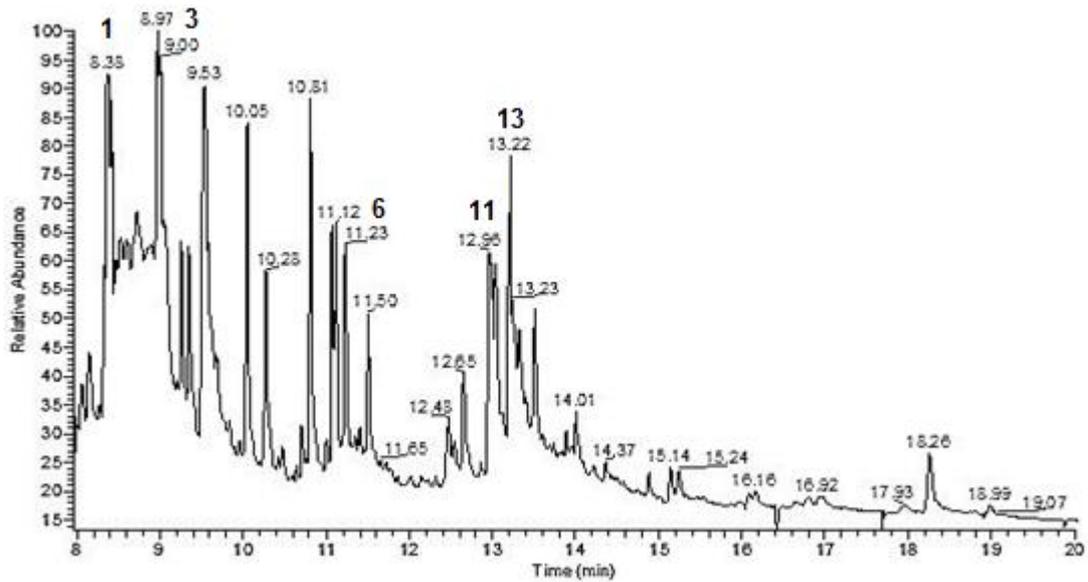
Além das substâncias que ocorreram tanto nos extratos dos fungos endofíticos quanto no extrato metanólico dos bulbos de *C. americanum*, o esteroide Pregnano-3,11,20,21-tetrol,ciclo20,21-(butilboronat0),(3 α ,5 β ,11 β ,20R) denominado neste estudo de esteroide 1 e o terpeno isocarpina B foram detectadas no extrato metanólico de MIBA 0478 (Figura 9). O resíduo da porfirina (3,8,12,17-tetraetil-1,21-dihidro-19-metoxi-2,7,13,18-tetrametil-1,22H-bilin), a quercetina e o alceno Hanhett foram encontradas nos extratos das linhagens MIBA 0422, 0436 e 0436.

Tabela 12: Lista das substâncias identificadas nos extratos metanólicos das linhagens de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das espécies hospedeiras

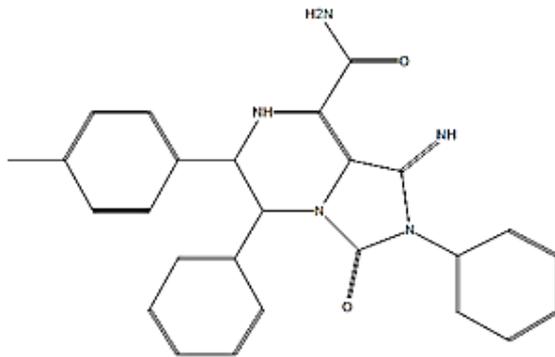
| Substância | Tempo de Retenção (Minutos) | <i>Crinum americanum</i> | | | | | | <i>Hymenocallis littoralis</i> | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|--------------------------|--------|---------------|------|------|------|--------------------------------|--------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | Folhas | Bulbos | Fungos (MIBA) | | | | Folhas | Bulbos | Fungos (MIBA) | | | | | | | |
| | | | | 0422 | 0433 | 0436 | 0478 | | | 0772 | 0775 | 0792 | 0793 | 0796 | 0805 | 0808 | 0810 |
| Alcaloide 1 [1] | 8,38 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ácido mirístico (ácido tetradecanóico) [2] | 8,76* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | - | + |
| α -D-glicopiranosídeo [3] | 9,00* | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Esteróide 1 [4] | 9,36* | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Ácido palmítico (ácido hexadecanóico) [5] | 10,06* | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Ácido esteárico (ácido octadecanóico) [6] | 11,25* | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Sorbitol [7] | 11,50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Esteróide 2 [8] | 12,70* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| Resíduo da porfirina [9] | 12,93* | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + |
| Isocarpina B [10] | 12,96 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| Alcaloide 2 [11] | 12,96 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Alcaloide 3 [12] | 13,03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Sacarose [13] | 13,22* | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Quercetina [14] | 13,33* | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Hahnfett [15] | 14,00* | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| Alcaloide 4 [16] | 14,46 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Ácido 9,12,15-ocatadecatrienóico (ácido alfalinolênico) [17] | 16,79 | - | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - | + | + |
| Alcaloide 5 [18] | 19,00 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Legenda: * = Os tempos de retenção das substâncias apresentaram variações de alguns segundos para amostras diferentes; MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia.

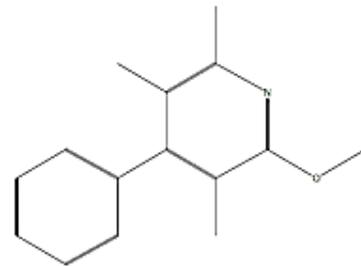
Figura 8: Cromatograma do extrato metanólico das folhas de *Crinum americanum* L.



Alcaloide 1

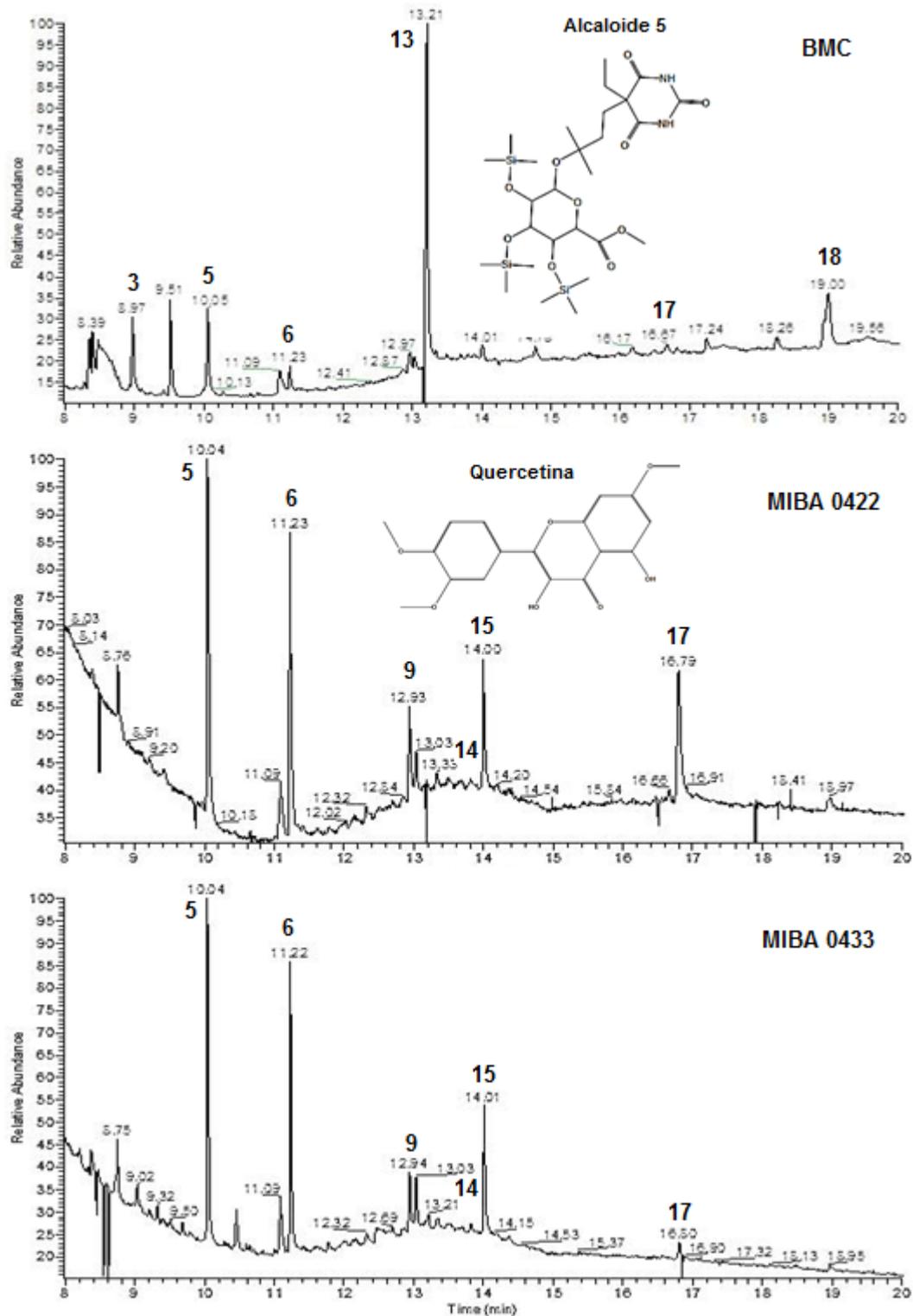


Alcaloide 2



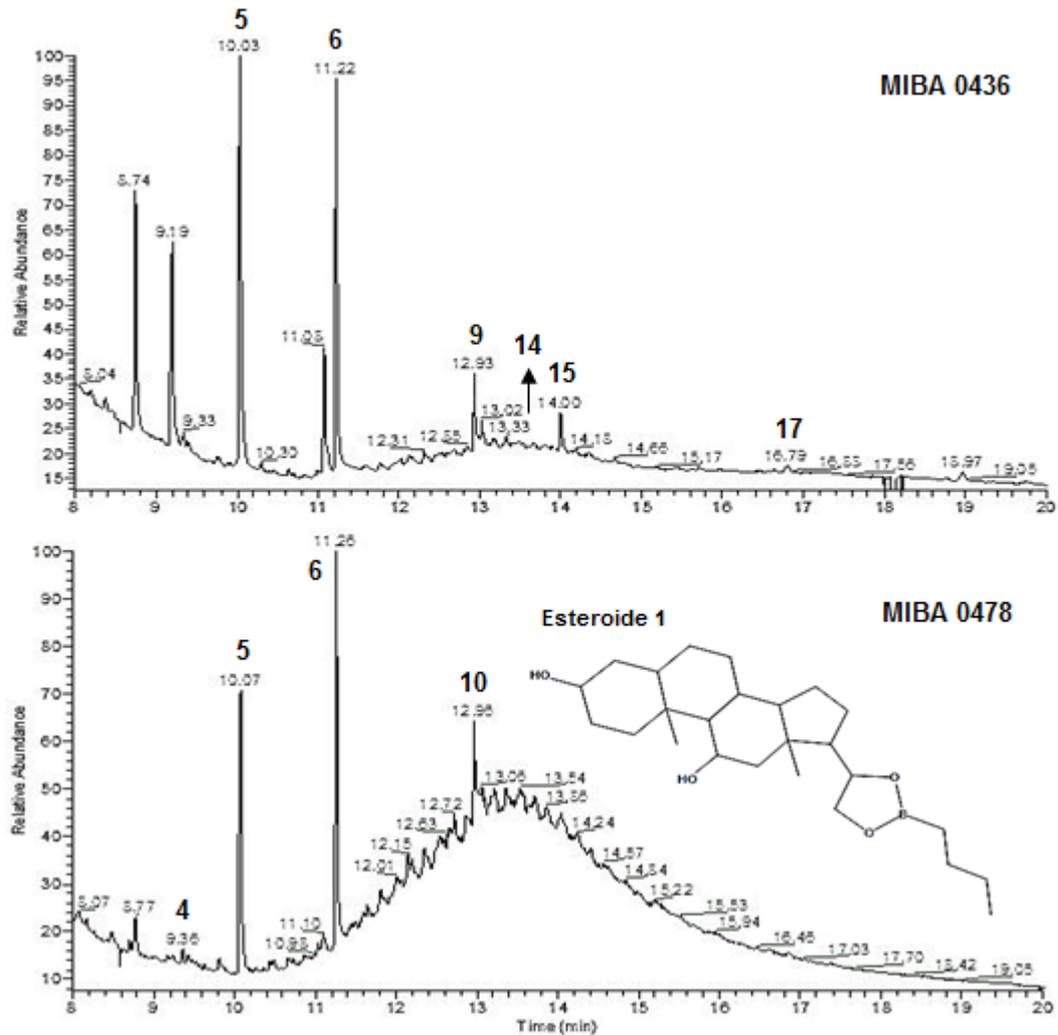
Legenda: 1 = Alcaloide 1 (Imino-6 (4-metilfenil)-3-oxo-2,5-difenil-1,2,3,4,5-pentahidroimidazol[1,5- α]pirazina-8-carboxiamida); 3 = α -D-glicopiranosídeo; 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 11 = alcaloide 2 (2-Metoxi-3,5,6-trimetil-4-fenilpiridina).

Figura 9: Cromatogramas dos extratos metanólicos dos bulbos de *Crinum americanum* L. (BMC) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal



Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; 3 = α -D-glicopiranosídeo; 5 = ácido palmítico (ácido hexadecanóico); 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 9 = resíduo da porfirina (3,8,12,17-tetraetil-1,21-dihidro-19-metoxi-2,7,13,18-tetrametil-1,22H-bilin); 13 = sacarose; 14 = quercetina; 15 = Hahnfett; 17 = ácido alfa linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico); 18 = alcaloide 5 (metil 6-[4-(5-etil)-2,4,6-trióxido-1,3-diazin-5-il]-2metilbutan-2-il]oxi-3,4,5- tris(timetilsiloxi)oxano-2-carboxilato).

Continuação Figura 9: Cromatogramas dos extratos metanólicos dos bulbos de *Crinum americanum* L. (BMC) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal



Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; 4 = esteroide 1 (Pregnano-3,11,20,21-tetrol,ciclo20,21-(butilboronat0),(3 α ,5 β ,11 β ,20R); 5 = ácido palmítico (ácido hexadecanóico); 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 9 = resíduo da porfirina (3,8,12,17-tetraetil-1,21-dihidro-19-metoxi-2,7,13,18-tetrametil-1,22H-bilin); 10 = Isocarpina B; 14 = quercetina; 15 = Hahnfett; 17 = ácido alfa linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico).

1.4.4.1 *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb.

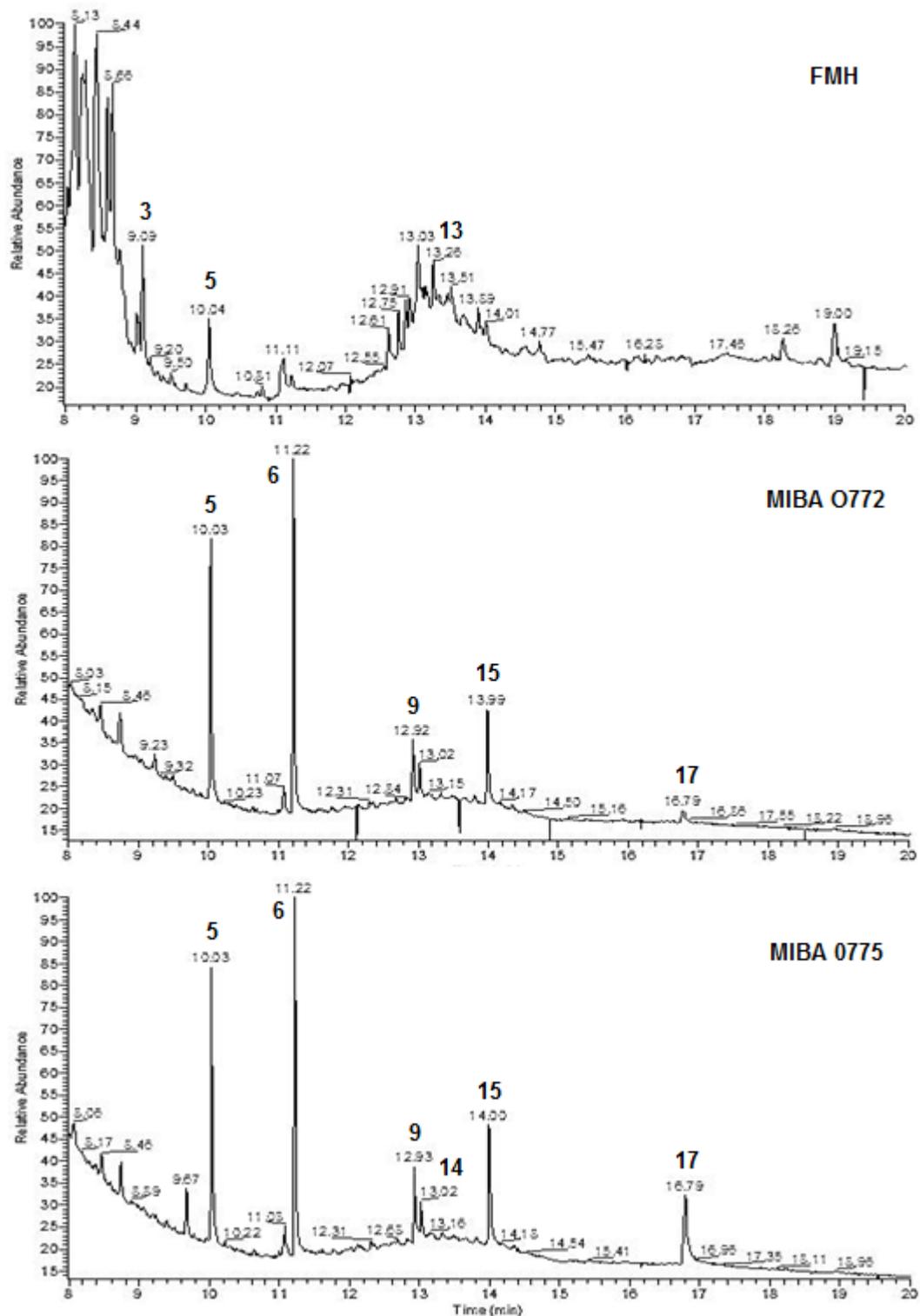
O perfil do extrato metanólico das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (Figura 10) evidenciou picos correspondentes a substâncias como o ácido palmítico, α -D-glicopiranosídeo e sacarose (Tabela 12). O ácido palmítico foi também encontrado nos extratos dos fungos endofíticos, sendo observado nos extratos de todas as linhagens isoladas a partir das folhas de *H. littoralis*. Outras substâncias foram identificadas apenas nos extratos fúngicos como os ácidos mirístico, esteárico e alfa-linolênico, o sorbitol, o resíduo da porfirina, quercetina e Hahnfett.

O perfil do extrato metanólico dos bulbos de *H. littoralis* (Figura 11) evidenciou picos correspondentes a substâncias como os ácidos mirístico, palmítico, esteárico e alfa linolênico, α -D-glicopiranosídeo, sacarose, a substância 14- α -H-Pregna pertencente à classe dos esteroides e foi denominada nesse estudo de esteroide 2, a quercetina, a isocarpina B e Hahnfett.

Sete substâncias listadas nos extratos dos bulbos de *H. littoralis* ocorreram também em extratos dos fungos endofíticos isolados da mesma região da planta (Figura 11). Estas substâncias são os ácidos palmítico e esteárico que ocorreram nos extratos das três linhagens isoladas dos bulbos de *H. littoralis*, o ácido mirístico (MIBA 0805 e 0810) e ácido alfa-linolênico (MIBA 0808 e 0810), o esteroide 2 (MIBA 0805 e 0810), a isocarpina B (MIBA 0805 e 0808) e o Hahnfett (MIBA 0805 e 0810).

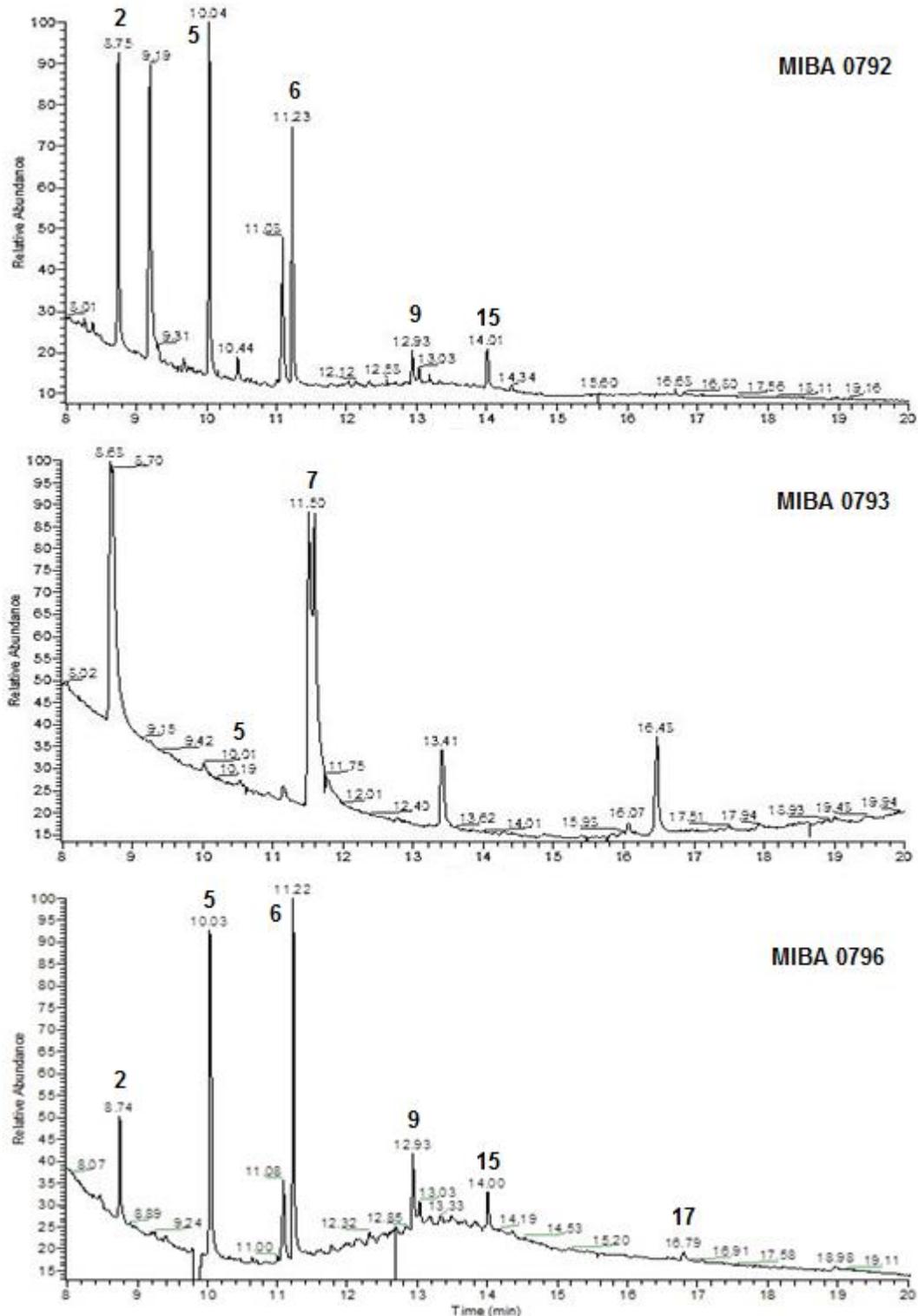
Algumas substâncias ocorreram apenas nos extratos dos fungos endofíticos dos bulbos de *H. littoralis* (Figura 11), como o alcaloide 3 (cis-4a-Etil-1-(2-hidroxietil)-6,6-(propileno disulfonil)-1,2,3,4,4a,5,6,11c-octahidropirido[3,2-c]carbazolo) presente no extrato de MIBA 0810 e o alcaloide 4 (6,7,12,12B,13,14-Hexahidrobenz(F)indolo(2,3-A)quinolizidina) presente no extrato de MIBA 0808. Além das substâncias citadas, foram detectados nos extratos fúngicos o esteroide 1 (MIBA 0805 e 0810) e do resíduo da porfirina (MIBA 0810).

Figura 10: Cromatogramas do extrato metanólico das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (FMH) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal



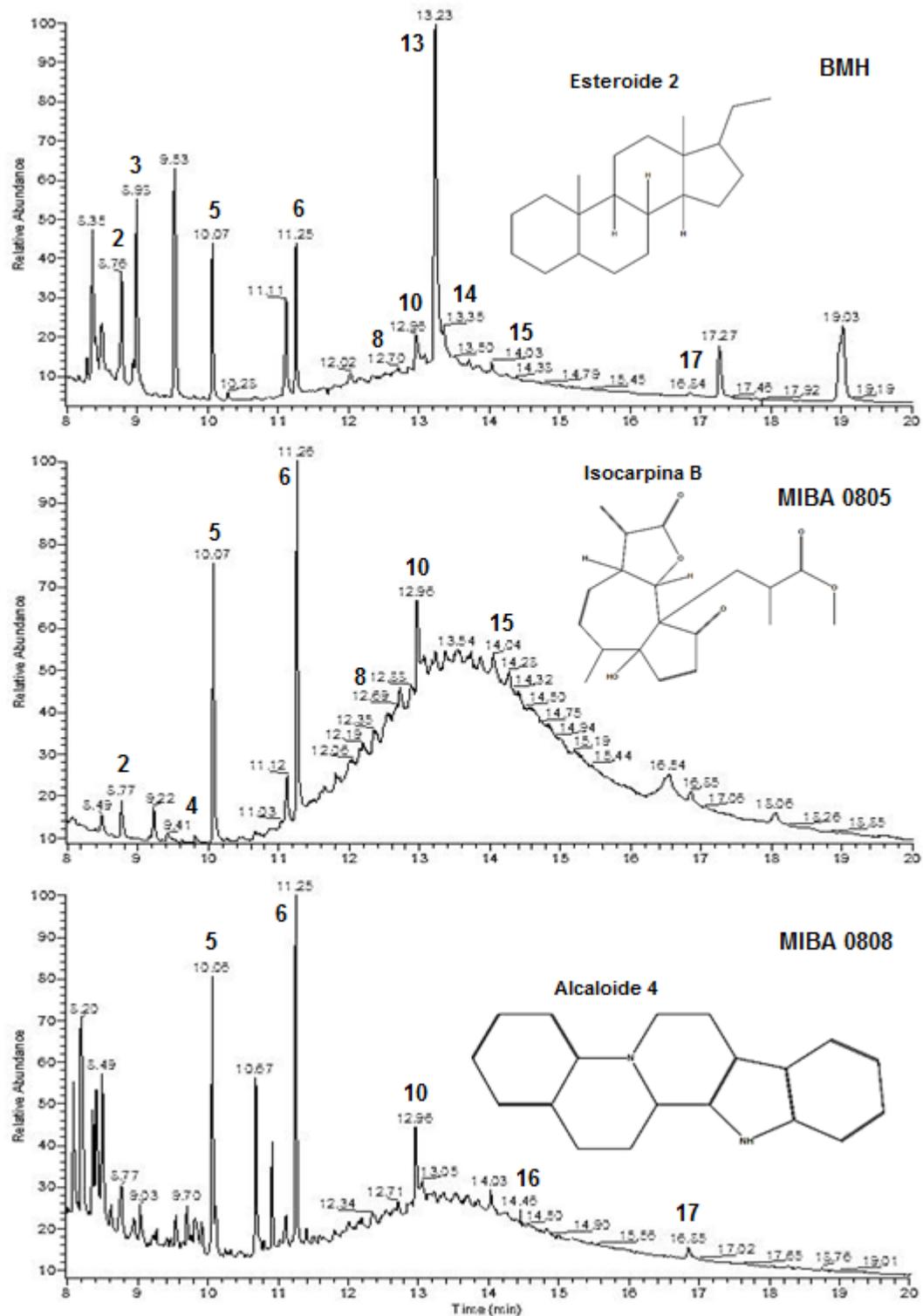
Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; 3 = α -D-glicopiranosídeo; 5 = ácido palmítico (ácido hexadecanóico); 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 9 = resíduo da porfirina (3,8,12,17-tetraetil-1,21-dihidro-19-metoxi-2,7,13,18-tetrametil-1,22H-bilin); 13 = sacarose; 14 = quercetina; 15 = Hahnfett; 17 = ácido alfa linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico).

Continuação Figura 10: Cromatogramas do extrato metanólico das folhas de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (FMH) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal



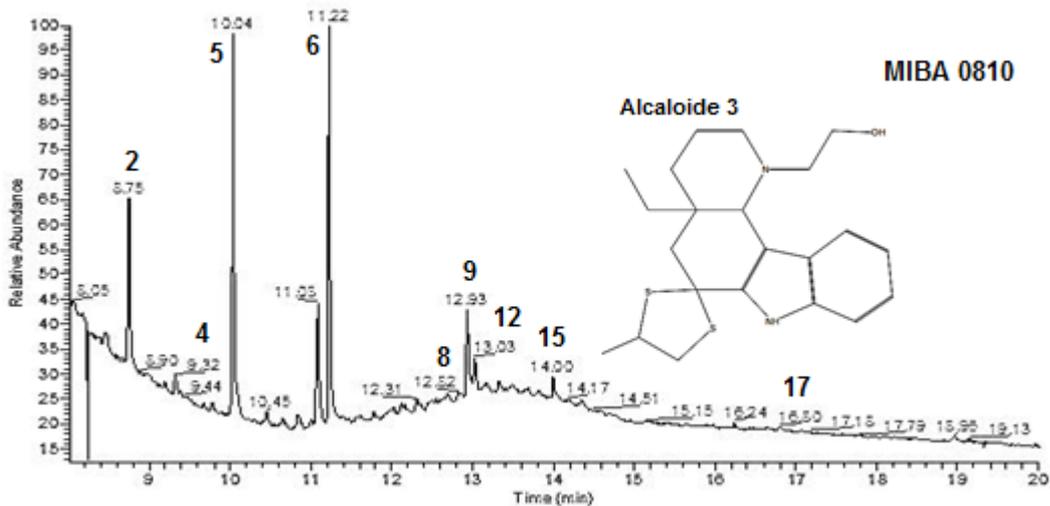
Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; 2 = ácido mirístico (ácido tetradecanóico); 5 = ácido palmítico (ácido hexadecanóico); 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 7 = sorbitol; 9 = resíduo da porfirina (3,8,12,17-tetraetil-1,21-dihidro-19-metoxi-2,7,13,18-tetrametil-1,22H-bilin); 15 = Hahnftet; 17 = ácido alfa linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico).

Figura 11: Cromatogramas do extrato metanólico dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (BMH) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal



Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; 2 = ácido mirístico (ácido tetradecanóico); 3 = α -D-glicopiranosídeo; 4 = esteroide 1 (Pregnano-3,11,20,21-tetrol,ciclo20,21-(butilboronato),(3 α ,5 β ,11 β ,20R)); 5 = ácido palmítico (ácido hexadecanóico); 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 8 = esteroide 2 (14- α -H-pregna); 10 = Isocarpina B; 13 = sacarose; 14 = quercetina; 15 = Hahnfett; 17 = ácido alfa linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico).

Continuação Figura 11: Cromatogramas do extrato metanólico dos bulbos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. (BMH) e das linhagens de fungos endofíticos isoladas do mesmo órgão vegetal



Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; 2 = ácido mirístico (ácido tetradecanóico); 4 = esteroide 1 (Pregnano-3,11,20,21-tetrol,ciclo20,21-(butilboronat0),(3 α ,5 β ,11 β ,20R); 5 = ácido palmítico (ácido hexadecanóico); 6 = ácido esteárico (ácido octadecanóico); 8 = esteroide 2 (14- α -H-pregna); ; 9 = resíduo da porfirina (3,8,12,17-tetraetil-1,21-dihidro-19-metoxi-2,7,13,18-tetrametil-1,22H-bilin); 12 = alcaloide 3 (cis-4a-Etil-1-(2-hidroxi-2-til)-6,6-(propileno disulfonil)-1,2,3,4,4a,5,6,11c-octahidropirido[3,2-c]carbazolo); 15 = Hahnfett; 17 = ácido alfa linolênico (ácido 9,12,15-octadecatrienoico).

1.4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana das folhas e bulbos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das linhagens endofíticas selecionadas para esse estudo. Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade contra *Candida tropicalis*. Houve a formação de halo de inibição dos extratos metanólicos das folhas e bulbos de *H. littoralis* e das folhas de *C. americanum* frente à espécie *Candida parapsilosis*. As linhagens MIBA 0478, 0792, 0793 e 0796 também apresentaram atividade contra *C. parapsilosis*. Os demais resultados indicaram atividade fungistática contra *Candida albicans* e *Candida guilliermondii* (Tabela 13).

Tabela 13: Avaliação qualitativa da inibição de *Candida* pelos extratos metanólicos de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das espécies hospedeiras pela formação do halo de inibição (cm)

| Amostras | <i>C. albicans</i> | <i>C. guilliermondii</i> | <i>C. parapsilosis</i> | <i>C. tropicalis</i> |
|--|-----------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|
| <i>C. americanum</i> Extrato metanólico das folhas | *0,1 ^{±0,01} | *0,5 ^{±0,01} | 0,2 ^{±0,00} | - |
| <i>C. americanum</i> Extrato metanólico dos bulbos | *0,1 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,00} | *0,1 ^{±0,01} | - |
| MIBA 0422 | *0,2 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,01} | - |
| MIBA 0433 | *0,3 ^{±0,00} | *0,4 ^{±0,00} | - | - |
| MIBA 0436 | *0,3 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,01} | - | - |
| MIBA 0478 | *0,3 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,00} | 0,1 ^{±0,00} | - |
| <i>H. littoralis</i> Extrato metanólico das folhas | *0,1 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,00} | 0,5 ^{±0,00} | - |
| MIBA 0772 | *0,1 ^{±0,00} | - | - | - |
| MIBA 0775 | *0,2 ^{±0,00} | - | - | - |
| MIBA 0792 | *0,2 ^{±0,05} | *0,2 ^{±0,00} | 0,1 ^{±0,01} | - |
| MIBA 0793 | *0,3 ^{±0,05} | *0,2 ^{±0,01} | 0,1 ^{±0,00} | - |
| MIBA 0796 | *0,3 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,01} | 0,4 ^{±0,00} | - |
| <i>H. littoralis</i> Extrato metanólico dos bulbos | *0,1 ^{±0,00} | *0,2 ^{±0,00} | 0,2 ^{±0,00} | - |
| MIBA 0805 | *0,1 ^{±0,00} | *0,2 ^{±0,00} | - | - |
| MIBA 0808 | *0,3 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,00} | - | - |
| MIBA 0810 | *0,2 ^{±0,00} | *0,3 ^{±0,00} | *0,4 ^{±0,00} | - |
| Controle (+) | 0,5 ^{±0,00} | 0,5 ^{±0,01} | 0,4 ^{±0,00} | 0,2 ^{±0,01} |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia; * = Atividade fungistática; Controle (+) = nitrato de miconazol.

Para os extratos vegetais e fúngicos que apresentaram atividade contra *Candida parapsilosis* foi avaliada a atividade relativa pelo método de contagem de Unidade Formadora de Colônias (Tabela 14). Com destaque para o extrato metanólico das folhas de *H. littoralis* e do fungo endofítico MIBA 0796 isolado da mesma espécie que apresentaram percentual de inibição de 74,2% e 63,7%, respectivamente. Para os demais extratos o percentual foi de 33,0% a 55,5%.

Tabela 14: Avaliação da atividade relativa dos extratos metanólicos de fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e das espécies hospedeiras contra *Candida parapsilosis*

| Amostras | Atividade Relativa |
|--|--------------------|
| <i>H. littoralis</i> - Extrato metanólico das folhas | 74,2% $\pm 0,21$ |
| MIBA 0796 | 63,7% $\pm 0,21$ |
| <i>H. littoralis</i> - Extrato metanólico dos bulbos | 55,5% $\pm 0,71$ |
| <i>C. americanum</i> - Extrato metanólico das folhas | 45,0% $\pm 0,21$ |
| MIBA 0792 | 41,7% $\pm 0,10$ |
| MIBA 0793 | 39,9% $\pm 0,12$ |
| MIBA 0478 | 33,0% $\pm 0,00$ |

Legenda: MIBA = Micro-organismos de Interesse Biotecnológico da Amazônia

1.5 DISCUSSÃO

Entre as linhagens de fungos endofíticos isoladas de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. identificadas por meio da taxonomia clássica, encontrou-se os gêneros *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Estudos indicam que fungos endofíticos pertencentes a estes gêneros apresentam potencial biotecnológico por produzirem alguns metabólitos secundários com importantes aplicações. O endofítico *Colletotrichum* sp. isolado da espécie *Artemisia annua* produziu esteroides com atividade antimicrobiana (LU et al., 2000). Dados da literatura indicam que a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* já foi isolada de diferentes fontes vegetais e produziu substâncias como piperina (CHITHRA et al., 2014), phillyrin (ZHANG et al., 2012) e o taxol (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008).

Sobre espécies do gênero *Acremonium* Wicklow et al. (2005) isolaram *A. zae* do milho (*Zea mays*) e constataram que este fungo produziu alcaloides com atividade antifúngica. Strobel et al. (1997) em estudo sobre *Acremonium* sp. isolado de *Taxus baccata* encontraram peptídeos com atividade antimicrobiana e anticancerígena. Vinale et al. (2014) ressaltaram as vantagens que espécies do gênero *Trichoderma* fornecem as plantas hospedeiras. Os autores citaram que estes micro-organismos atuam no controle de fitopatógenos devido à produção de compostos tóxicos, na indução das defesas da planta e promoção do crescimento vegetal. *Trichoderma* sp. isolado de *Huperzia serrata* produziu huperzine A, um inibidor da acetilcolinesterase, isolado inicialmente a partir da planta hospedeira (DONGET et al., 2014).

Entre os gêneros identificados neste estudo *Fusarium* é o que apresenta maior número de espécies estudadas resultando em uma gama de substâncias isoladas com variadas atividades biológicas (MUSAVI; BALAKRISHNAM, 2014; CUI et al., 2012; KUMAR et al., 2013; ELAVARASI et al., 2012; DENG et al., 2009; KUSARI et al., 2009; SHWETA et al., 2010; ZHANG et al., 2000; KOUR et al., 2008; NADEEM et al., 2012). *Fusarium oxysporum* isolado *Rhizospora annamalayana* (ELAVARASI et al., 2012) e *Fusarium solani* isolado *Taxus chinensis* (DENG et al., 2009) produziram o taxol. Esta substância conhecida como paclitaxel é um importante fármaco anticancerígeno produzido por *Taxus brevifolia*. Em 1993 Stierle et al. descobriram que a substância era também produzida pelo fungo *Taxomyces andreanae* isolado da mesma planta. Esta descoberta motivou a busca por outras fontes de taxol e por outros endofíticos capazes de sintetizar as mesmas substâncias que as plantas hospedeiras. Neste contexto *Fusarium oxysporum* isolado de *Ginkgo biloba* (CUI et al., 2012)

e *Catharanthus roseus* (KUMAR et al., 2013) apresentou a capacidade de produzir algumas das mesmas substâncias sintetizadas pelas hospedeiras.

Das 94 linhagens de fungos endofíticos isoladas de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. que tiveram os extratos avaliados para a detecção de lipídios, cumarinas, antronas e alcaloides, 69 linhagens produziram pelo menos uma das classes investigadas. Isso representa um percentual expressivo de 73,4% de fungos endofíticos como promissoras fontes de metabólitos de interesse biotecnológico.

Com os resultados obtidos com a detecção de classes de metabólitos nos extratos dos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis* foram selecionadas as 12 linhagens que apresentaram os melhores resultados com o intuito de comparar os perfis químicos desses extratos fúngicos com os extratos das plantas hospedeiras. Os extratos foram inicialmente analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Esta técnica possibilitou a visualização das bandas correspondentes a substâncias ou grupos de substâncias presentes em cada extrato quando utilizou-se o revelador vanilina sulfúrica (VAS). Desta forma foram definidas as frações comuns aos extratos fúngicos e vegetais para a aferição do Rf (fator de retenção) de cada uma delas. A ocorrência de bandas com mesma coloração e Rf confirmou que todos os extratos fúngicos produziram pelo menos uma substância ou grupo de substâncias em comum com as plantas hospedeiras.

Com a utilização de diferentes reveladores para a detecção de classes de metabólitos constatou-se que tanto os extratos vegetais quanto fúngicos investigados apresentaram potencial para a produção de metabólitos com aplicações biotecnológicas. Nos extratos metanólicos das folhas de *C. americanum* foram encontrados alcaloides, compostos fenólicos, antronas, cumarinas e lipídios. Nos extratos metanólicos dos bulbos ocorrem as mesmas classes de metabólitos, exceto alcaloides. Apesar de o gênero *Crinum* ser bastante estudado por apresentam uma variedade de espécies que produzem os principais alcaloides descritos para a família Amaryllidaceae, há poucos estudos químicos de *C. americanum*. Entre as classes detectadas neste estudo, somente os alcaloides já foram descritos para a espécie. Ali et al. (1986) isolaram oxocrinina, crimina, flexina, *O*-acetilcrinina, licorina, hippadina, pratorinina, pratorimina, pratosina, urgeremina e trisfaeridina a partir dos bulbos de *C. americanum*. Fennell e Van Staden (2001) em revisão sobre o gênero citaram outros compostos encontradas em bulbos e sementes do espécies do gênero, entre eles compostos fenólicos e cumarinas e Sum et al. (2008) isolaram dois novos composto fenólicos dos bulbos de *Crinum asiaticum* L.

Nos extratos metanólicos das folhas de *H. littoralis* foram encontrados alcaloides, compostos fenólicos, antranas, cumarinas e lipídios. Já nos extratos metanólicos dos bulbos ocorreram as mesmas classes de metabólitos exceto alcaloides e antranas. Dentre as classes detectadas os alcaloides são os que mais se destacam. Vários alcaloides já foram isolados da espécie, entre eles a licorina, littoralina, hippeastrina, licorenina, tazetina, pretazetina, macronina, homolicorina, vittatina e haemantamina (JI et al., 2014) e esses metabólitos possuem vários efeitos farmacológicos, tais como antivirais, antiparasitários, anticancerígenos, antibacterianos, antioxidantes, e cicatrização de feridas (SUBRAMANIAM et al., 2014).

Por meio da detecção de classes de metabólitos pode-se estabelecer uma comparação entre as classes de substâncias produzidas pelos fungos endofíticos e as plantas hospedeiras. Desta foram constatou-se que ambos são capazes de produzir algumas das mesmas classes de substâncias, evidenciando uma correlação entre as classes de metabólitos produzidos por fungos endofíticos e as espécies hospedeiras. Para os bulbos de *Crinum americanum* L. as semelhanças ocorreram na presença de lipídios e cumarinas no extrato vegetal e dos endofíticos. Para *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. os alcaloides, compostos fenólicos, antranas, cumarinas e lipídios produzidos pelas folhas foram também detectados nos extratos dos fungos endofíticos isolados do mesmo órgão vegetal. As linhagens isoladas a partir dos bulbos da mesma espécie têm em comum com a planta hospedeira os lipídios detectados nos extratos.

De maneira geral foram detectadas nos extratos das linhagens endofíticas em correlação ou não com as classes presentes nos extratos das plantas de origem, todas as classes de metabólitos investigadas, exceto as antraquinonas. Os alcaloides, compostos fenólicos, antranas, cumarinas, terpenos e lipídios detectados nos extratos dos fungos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis* representam os primeiros registros do potencial biotecnológico destes micro-organismos para as duas espécies de Amaryllidaceae.

Por meio das análises em Cromatografia em Camada Delgada foram detectados alcaloides nos extratos de algumas linhagens de fungos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis*, havendo correlação entre os resultados obtidos para os extratos de fungos isolados das folhas de *H. littoralis* e o extrato metanólico do mesmo órgão vegetal. As investigações em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas permitiram a identificação de 5 alcaloides nos extratos investigados neste estudo, dos quais 2 ocorreram nos extratos de fungos endofíticos. Os alcaloides representam um grupo de substâncias obtidas a partir de fungos endofíticos amplamente estudadas e com aplicações diversas. Destacam-se nesse

contexto os alcaloides com atividade anticâncer como a camptotecina (SHWETA et al., 2010), a viblastina e a vincristina (KUMAR et al., 2013). Alguns alcaloides obtidos a partir de fungos endofíticos foram inicialmente isolados das plantas hospedeiras, como a vincamina (SHWETA et al., 2010), huperzina A (ZHANG et al., 2011), a piperina (CHITHRA et al., 2015), a peimisina e a imperialina-3 β -D-glicosídeo (PAN et al., 2015).

Além de ocorrerem nos extratos nos extratos vegetais investigados os compostos fenólicos foram detectados em extratos de fungos endofíticos de *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. evidenciando também uma correlação entre classes de metabolitos produzidas por endofíticos e as plantas hospedeiras. Li et al. (2015) também constaram esta correlação entre metabólitos produzidos por endofíticos e plantas hospedeiras ao obterem o peonol a partir de *Chaetomium* sp., um fungo endofítico isolado da planta medicinal *Paeonia suffruticosa*. Esta substância que pertence à classe dos compostos fenólicos e apresenta diversas atividades farmacológicas, é normalmente obtida a partir da planta hospedeira. Yu et al. (2010) destacaram que os compostos fenólicos isolados a partir de fungos endofíticos tem mostrado notável atividade antimicrobiana o que pode indicar um bom potencial na descoberta de novos antibióticos.

Com as análises em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas foi detectada a presença do flavonoide quercetina nos extratos dos endofíticos MIBA 0433, 0436, 0478, 0775 e no extrato metanólicos dos bulbos de *H. littoralis*. Os flavonoides pertencem à classe de compostos fenólicos o que confirmou em alguns extratos os resultados obtidos em Cromatografia em Camada Delgada. Behling et al. (2004) ressaltaram que a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) é o principal flavonóide presente na dieta humana e listaram estudos que vem destacando nas ultimas décadas o potencial antioxidante, anticarcinogênico e os efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático dos flavonoides de uma foram geral e da quercetina. Os flavonoides são uma classe de substâncias amplamente distribuídas entre fungos endofíticos representando uma boa fonte de potenciais substâncias anticâncerígenas (WANG et al. 2011). Segundo os autores as principais substâncias com atividade anticâncer pertencem à classe das xantonas e cromonas.

Não foram utilizados reveladores para a detecção de terpenos nos extratos investigados, mas foi identificado nos extratos metanólicos dos fungos MIBA 0478, 0805 e 0808 e dos bulbos de *H. littoralis* a substância denominada de Isocarpina B pertencente à classe dos terpenos. Terpenos com atividade anticâncer têm sido isolados de uma variedade de endofíticos de diferentes plantas (WANG et al., 2011). O exemplo mais comum é o do

anticancerígeno taxol. Esta substância é um diterpeno largamente utilizado no tratamento de câncer de mama e útero (STIERLE et al., 1993).

A detecção de antronas e cumarinas reafirmou a correlação entre as substâncias produzidas por fungos endofíticos e as plantas hospedeiras, uma vez que as classes de metabólitos ocorreram tanto nos extratos dos fungos isolados das folhas de *H. littoralis* quanto na planta hospedeira. Além de ter sido verificada a presença de cumarinas nos extratos dos fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e da planta hospedeira. As cumarinas (1,2-nenzopirona) são os representantes mais simples das lactonas (KUSTER; ROCHA, 2007). Romero et al. (2008) isolaram lactonas do endofítico *Xylaria* sp. com potencial atividade contra *Plasmodium falciparum*, que podem ser usadas como drogas anti-maláricas. Huang et al. (2008) relataram a atividade antimicrobiana de lactonas obtidas a partir do endofítico *Phomopsis*. As antronas e antracononas pertencem à classe das quinonas (FALKENBERG, 2007). As antraquinonas são formadas a partir de antronas livres. Não foi detectada a presença de antraquinonas nos extratos investigados. No entanto a detecção de antronas nos extratos de algumas das linhagens endofíticas pode indicar que estes micro-organismos sejam capazes de sintetizar também as antraquinonas, possivelmente em outras condições como na interação com as plantas hospedeiras e com outros micro-organismos que dividem o mesmo habitat.

Foi detectada por meio de Cromatografia em Camada Delgada a presença de lipídios em todos os extratos investigados, exceto no extrato do fungo MIBA 0436, indicando mais uma vez a correlação entre classes de metabólitos produzidas por fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. e as plantas hospedeiras. A ocorrência desta classe de metabólitos nos extratos investigados foi confirmada pela detecção de substâncias como os ácidos graxos mirístico, palmítico, esteárico e alfa-linolênico, além de dois esteroides por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Os esteroides podem ligar-se a cadeias carbônicas e formar um grande número de moléculas estruturais (RAVEN et al., 2007), podendo ocorrer como glicosídeos esteroidais com ação sobre o músculo cardíaco, compondo assim o grupo dos heterosídeos cardioativos (RATES; BRIDI, 2007). Os esteroides podem também fazer parte da estrutura das saponinas que são glicosídeos de esteroides ou triterpenos (SCHENKEL et al., 2007). Yu et al. (2010) mencionaram que muitos esteroides obtidos a partir de fungos endofíticos apresentam atividade antimicrobiana moderada.

As análises em Cromatografia Gasosa dos extratos dos fungos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis* e dos extratos das plantas hospedeiras, confirmaram os resultados obtidos anteriormente de que os fungos endofíticos podem produzir algumas das mesmas

substâncias que as plantas hospedeiras. Foram identificadas em todos os extratos vegetais analisados substâncias pertencentes às classes dos carboidratos e dos ácidos graxos. Para os fungos endofíticos apenas em algumas linhagens verificou-se a presença de carboidratos. Isso reflete a composição do meio de cultura utilizado, cuja quantidade de carboidratos foi reduzida após o período de adaptação. O objetivo dessa redução foi induzir a produção de metabólitos e evitar que carboidratos fossem encontrados em grandes quantidades nos cromatogramas.

Este estudo comprovou que fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. tem capacidade de produzir algumas substâncias sintetizadas pelas plantas hospedeiras, destacando o potencial biotecnológico de ambos e confirmando a correlação metabólica entre estes. De acordo Kumar et al. (2013) fungos endofíticos estão simbioticamente associados às plantas e podem sintetizar os mesmo produtos naturais e bioativos que a planta hospedeira, sugerindo a possibilidade de um intercâmbio genético entre ambos. Tudo isso ocorre sem que o fungo cause danos ao hospedeiro o que indica que estes micro-organismos endofíticos, como fruto da sua interação com a planta hospedeira, adquiriram com o passar do tempo a capacidade de sintetizar estas substâncias.

Kumar et al. (2013) destacaram algumas vantagens na utilização de produtos naturais bioativos provenientes de fungos endofíticos em substituição aos produzidos por plantas. Para as indústrias farmacêuticas representaria interesse imediato, pois estas poderiam livrar-se das barreiras geográficas e políticas associadas ao transporte de plantas, bem como das condições ambientais que podem alterar a qualidade e a produção das substâncias de interesse. A fermentação microbiana também apresenta vantagens sobre a utilização de partes das plantas para a produção de medicamentos e substâncias bioativas. Entre elas destaca-se a facilidade de cultivo em biorreatores e a possibilidade de obter derivados dos medicamentos por meio de alterações no cultivo. Além disso, os procedimentos de extração de metabólitos das culturas microbianas utiliza menos solvente, de modo a purificar a droga. Kumar et al. (2013) também mencionaram os efeitos ambientais, uma vez que se as drogas passarem a ser obtidas a partir de fungos endofíticos, a exigência de qualquer parte da planta será reduzida, poupando-as da extinção na maior parte dos habitats.

Com relação à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos dos fungos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis* e das plantas hospedeiras alguns extratos apresentaram atividade contra *C. parapsilosis* e quando avaliada a atividade relativa o extrato metanólico das folhas de *H. littoralis* e do fungo endofítico MIBA 0796 apresentaram os

resultados de maior destaque com percentual de inibição acima de 60%. Foi verificado que a maioria dos demais extratos apresentou potencial fungistático contra *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* e *Candida parapsilosis*. Sundarasekar et al. (2012) constataram atividade contra *Candida albicans* de extratos metanólicos de folhas, flores, bulbos e raízes de *H. littoralis*, no entanto não há estudos sobre atividade antimicrobiana de *C. americanum* e de fungos endofíticos isolados das duas espécies.

1.6 CONCLUSÕES

- ✓ Fungos endofíticos isolados de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. apresentam potencial biotecnológico uma vez que foram detectados nos extratos destes micro-organismos representantes das classes dos alcaloides, compostos fenólicos, terpenos, ácidos graxos e esteroides.
- ✓ A detecção de classes de metabólitos nos extratos dos fungos endofíticos isolados de *C. americanum* e *H. littoralis* e nos extratos metanólicos das respectivas plantas hospedeiras indicou que tanto endofíticos quanto hospedeiros são capazes de produzir as mesmas classes de metabólitos confirmando a correlação metabólica entre ambos,
- ✓ Nove extratos investigados apresentaram atividade contra *Candida parapsilosis*, sendo que o extrato metanólico das folhas de *H. littoralis* e do fungo endofítico MIBA 0796 apresentaram os resultados mais relevantes com percentual de inibição acima de 60%.
- ✓ Este estudo apresentou os primeiros registros do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *C. americanum* e *H. littoralis* para a produção de moléculas biotivas. Outros estudos devem ser desenvolvidos com o intuito de isolar algumas das substâncias apresentadas neste capítulo e realizar novas análises de atividades biológicas.

REFERÊNCIAS

- ALI, A.A.; EL SAYBD, H.M.; ABDALLAH, O.M.; STEGLJCH, W. Oxocrinine and other alkaloids from *Crinum americanum*. **Phytochemistry**, v.25, n.10, p.2399-2401, 1986.
- AZEVEDO, J.A. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: **KHARWAR, R.N.; UPADHYAY, R.; DUBEY, N.; RAGHUWANSHI, R. Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. Springer India, 2014.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and application of endophytic fungi isolatede from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. **Fungi: multifacetated microbes**. Boca Raton: CRC Pres, 2007, p.189-207.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERINI, JR.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic micro-organisms: a review of insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p.40-65, 2000.
- BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoide Quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3, p.421-437, 2013.
- CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E.K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v.21, n.4, p.534-540, 2014.
- CUI, Y.; YI, D.; BAI, X.; SUN, B.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from *Ginkgo biloba*. **Fitoterapia**, v.83, p.913-920, 2012.
- DENG, B.W.; LIU, K.H.; CHEN, W.Q.; DING, X.W.; XIE, X.C. *Fusarium solani* Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.139-143, 2009.
- DONG, L.H.; FAN, S.W.; LING, K.Z.; HUANG, B.B.; WEI, Z.J. Identification of huperzine A-producing endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.3, p.1011-1017, 2014.
- ELAVARASI, A.; RATHNA, G.S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S1081-S1085, 2012.

FENNELL, C.W.; VAN STADEN, J. *Crinum* species in traditional and modern medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.15–26, 2001.

HERRERA, A.G. Psychrotrophic microorganisms. In: SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A. L. R. **Food Microbiology Protocols**. New Jersey: Humana Press Inc, 2001.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; METZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UERGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 657-683.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*: a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycol Balc**, v.5, p.1-4, 2008.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. (2008) Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v.69, n.7, p.1604-1608, 2008.

JI, Y.B.; CHEN, N.; ZHU, H.W.; LING, N.; LI, W.L.; SONG, D.X.; GAO, S.Y.; ZHANG, W.C.; MA, N.N. Alkaloids from Beach Spider Lily (*Hymenocallis littoralis*) Induce Apoptosis of HepG-2 Cells by the Fas-signaling Pathway. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.15, n.21, p.9319-9325, 2014.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.22, p.111-126, 2005.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* Alkaloids. **Natural Product Reports**, v.26, p.363-381, 2009.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC-MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n.1, p. 312-322, 2006.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P.H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.K.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.7, p.1115-1121, 2008.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOCHANAN, P.R.; AHMAD, A. Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **Plos One**, v.8, n.9, p.1-10, 2013.

KUSARI, S.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v.72, n.1, p.2-7, 2009.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumrinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; METZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UERGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p.537-556.

- LI, P.; YANG, G.; QIU, Y.; LIN, L.; DONG, F. Paeonol produced by *Chaetomium* sp., an endophytic fungus isolated from *Paeonia suffruticosa*. **Phytochemistry Letters**, v.13, p.334-342, 2015.
- 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, n.1, p.67-73, 2000.
- MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v.14, n.4, p.289-300, 2007.
- MUSAVI, S.F.; BALAKRISHNAN, R.M. A Study on the Antimicrobial Potentials of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. **Journal of Medical and Bioengineering**, v.3, n.3, p.162-166, 2014.
- NADEEM, M.; MAUJI, R.; PRAVEJ, A.; AHMAD, M.M.; MOHAMMED, A.; QURAINY, F.A.; KHAN, S.; ABDIN, M.Z. *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.10, p.2493-2499, 2012.
- PAN, B. F.; SU, X.; HU, B.; YANG, N.; CHEN, Q.; WU, W. *Fusarium redolens* 6WBY3, an endophytic fungus isolated from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, produces peimisine and imperialine-3 β -d-glucoside. **Fitoterapia**, v.103, p.213-221, 2015.
- PARTHASARATHY, R.; SATHIYABAMA, M. Gymnemagenin-producing Endophytic Fungus Isolated from a Medicinal Plant *Gymnema sylvestris* R.Br. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.6, p.3141-3152, 2014.
- PRERRIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993.
- RATES, S.M.K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; METZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UERGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 685-710.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7^a. ed. Coord. Trad. Kraus, J.E. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.
- ROMERO, C.J.; ORTEGA-BARRÍA, E.; ARNOLD, E.; CUBILLA-RIOS, L. Activity against *Plasmodium falciparum* of Lactones Isolated from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.10-11, p.1-4, 2008.
- RIBEIRO, J.P.N.; LIMA, M.I.S. Potencial alelopático de *Crinum americanum* L. sob diferentes condições de extração. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.465-472, 2011.
- RIBEIRO, J.P.N.; MATSUMOTO, R.S.; TAKAO, L.K.; VOLTARELLI, V.M.; LIMA, M.I.S. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos de *Crinum americanum* L. **Revista Brasileira de Botânica**, v.32, n.1, p.183-188, 2009.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; METZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UERGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SHWETA, S.; GURUMURTHY, B.R.; RAVIKANTH, G.; RAMANAN, U.S.; SHIVANNA, M.B. Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecin. **Phytomedicine**, v.20, n.3-4, p.337-342, 2013.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B.T.; PRITI, V.; KUMAR, P.M.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; SHAANKER, R.U. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. Ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10 hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v.71, p.117-122, 2010.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v.260, p.214-6, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, n.6, p.535-544, 2003.

STROBEL, G.A.; TORZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. - a leucinoastatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). **Plant Science**, v.128, n.1, p.97-108, 1997.

SUBRAMANIAM, S.; SUNDARASEKAR, J.; SAHGAL, G.; MURUGAIYAH, V. Comparative Analysis of Lycorine in Wild Plant and Callus Culture Samples of *Hymenocallis littoralis* by HPLC-UV Method. **The Scientific World Journal**, Article ID 408306, p.1-6, 2014.

SUN, Q.; ZHANG, W.D.; SHEN, Y.H.; ZHANG, C.; LI, H.L. A new phenolic compound from *Crinum asiaticum* L. **Chinese Chemical Letters**, v.19, p.447-449, 2008.

SUNDARASEKAR, J.; SAHGAL, G.; MUBBARAKH, S.A.; SUBRAMANIAM, S. Potential antioxidant activities of methanolic extracts of spider lily (*Hymenocallis littoralis*). **AJCS**, v.7, n.5, p.625-631, 2013.

TAWARE, R.; ABNAVE, P.; PATIL, D.; RAJAMOCHANANAN, P.R.; RAJA, R.; SOUNDARARAJAN, G.; KUNDU, G.C.; AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of Trichothecinol-A produced by endophytic fungus *Trichothecium* sp. and its antifungal, anticancer and antimetastatic activities. **Sustainable Chemical Processes**, v.2, p.8, p.1-9, 2014.

TRAM, N.T.N.; TITORENKOVA, T.V.; BANKOVA, V.S.; HANDJIEVA, N.V.; POPOV, S.S. *Crinum* L. Amaryllidaceae. **Fitoterapia**, v.73, p.183-208, 2002.

VINALE, L.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; WOO, S.L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.;

MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma* Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. **The Open Mycology Journal**, v.8, p.127-139, 2014.

WANG, L.W.; ZHANG, Y.L.; LIN, F.C.; HU, Y.Z.; ZHANG, C.L. Natural Products with Antitumor Activity from Endophytic Fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p.1056-1074, 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. New York: Springer, 1995.

WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v.109, n.5, p.610-618, 2005.

YIN, H.; SUN, Y.H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, v.18, p.802-805, 2011.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, P. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v.165, p.437-449, 2010.

ZHANG, L.; GUO, B.; LI, H.; ZENG, S.; SHAO, H.; GU, S.; WEI, R. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v.31, n.11, p.805-807, 2000.

ZHANG, Q.; WEI, X.; WANG, J. Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspensa*. **Fitoterapia**, v.83, n.8, p.1500-1505, 2012.

ZHANG, Z.B.; ZENG, Q.G.; YAN, R.M.; WANG, Y.; ZOU, Z.R.; ZHU, D. Endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* LF70 from *Huperzia serrata* produces Huperzine A. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, n.3, p.479-486, 2011.

CAPÍTULO 2: ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Crinum americanum* L. COM A PLANTA HOSPEDEIRA

RESUMO

A interação entre fungo endofítico e planta hospedeira é caracterizada por um delicado equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta. Se esse equilíbrio é perturbado pela diminuição da defesa da planta ou pelo aumento da virulência do fungo a doença se desenvolve. Estudos da relação entre a planta e o hospedeiro são necessários para entender como esses micro-organismos vivem no interior desses vegetais sem causar danos a planta e ainda lhes proporcionado alguns benefícios. Neste sentido a anatomia vegetal e as técnicas de Microscopia Eletrônica podem auxiliar a elucidar pontos que ainda permanecem obscuros no entendimento dessa interação. Com o objetivo de estudar as interações que ocorrem entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras, este trabalho uniu as técnicas de assepsia e preparação de inóculos comumente usadas no isolamento de fungos endofíticos às análises anatômicas e em Microscopia Eletrônica. Inicialmente fragmentos foliares de *Crinum americanum* L. foram analisados por meio de técnicas convencionais em anatomia vegetal e Microscopia Eletrônica de Varredura para a caracterização estrutural. Posteriormente os fragmentos foliares foram inoculados em meio Saboraud por 24h, 48h e 72h para favorecer o crescimento dos fungos endofíticos. Após os períodos de incubação estes fragmentos foram então analisados também por meio de técnicas em anatomia vegetal e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Com as análises anatômicas pode-se constatar que a superfície foliar é glabra, a folha é anfiestomática ocorrendo estômatos do tipo anomocítico. Em secção transversal a epiderme apresenta-se unisseriada com cutícula delgada. Abaixo da epiderme adaxial ocorre uma camada de células tabulares arranjadas continuamente com espaços intercelulares observados em secções longitudinais. O restante do mesofilo é composto por células parenquimáticas isodiamétricas com feixes colaterais intercalados por aerênquima. Com as observações em microscopia de luz dos fragmentos foliares que foram inoculados em meio de cultura constatou-se a presença de células fúngicas nos fragmentos foliares dos inóculos de 48h e 72h, havendo um aumento na quantidade destas células nos inóculos de 72h. Com as análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão observou-se a presença de células fúngicas nos inóculos de 24h e a formação de corpos de frutificação denominados picnídios nos inóculos de 72h. Os resultados obtidos com este estudo indicaram que os fungos endofíticos de *C. americanum* ocorreram no interior das células vegetais e em condições favoráveis se desenvolveram e ocuparam também os espaços intercelulares, reforçando assim as teorias de que os fungos endofíticos estabelecem uma interação antagônica equilibrada com as plantas hospedeiras.

Palavras-chave: anatomia vegetal, Microscopia Eletrônica de Transmissão, células fúngicas, corpos de frutificação.

2.1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). De acordo com Aly et al. (2011) o modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical a interação é predominante mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não-sistêmica) essa interação tende a ser antagonista. O fungo endofítico permanece no hospedeiro em estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado e quando em condições ambientais favoráveis, o mesmo pode tornar-se patogênico (Aly et al., 2010).

Para Schulz et al. (2002) a interação entre fungo endofítico e planta hospedeira é caracterizada por um delicado equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta. Se esse equilíbrio é perturbado pela diminuição da defesa da planta ou pelo aumento da virulência do fungo a doença se desenvolve. Schulz e Boyle (2005) propuseram que a colonização assintomática dos endófitos é uma interação antagônica equilibrada entre planta hospedeira e endófito, e enquanto a virulência dos endofíticos e a de defesa da planta são equilibradas a interação permanece assintomática.

Apesar de existirem algumas teorias sobre a interação entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras ainda existem alguns aspectos a serem desvendados. Por isso além dos estudos que permeiam a identificação de fungos endofíticos e as potencialidades dos metabólitos por eles produzidos são necessários estudos da interação desses micro-organismos com as plantas hospedeiras. Neste sentido a anatomia vegetal, área da botânica que estuda a estrutura interna dos organismos vegetais, pode auxiliar na compreensão de vários fenômenos relacionados ao corpo vegetal (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELO-GUERREIRO, 2006). De acordo com Neto et al. (2004) utilizando-se microscopia eletrônica pode-se determinar a localização e a forma de colonização dos micro-organismos endofíticos em plantas hospedeiras.

Com o intuito de contribuir para o conhecimento das interações que ocorrem entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras, este trabalho uniu as técnicas de assepsia e preparação de inóculos comumente usadas no isolamento de fungos endofíticos as análises anatômicas e em Microscopia Eletrônica. Esta união de diferentes técnicas tem como objetivo favorecer o crescimento de micro-organismos naturalmente ocorrentes nos tecidos vegetais

para posterior observação por meio da anatomia vegetal com auxílio de Microscopia de luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 GERAL

Estudar a interação que os fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. estabelecem com a planta hospedeira

2.2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar anatomicamente as folhas de *C. americanum* por meio de técnicas em anatomia vegetal e Microscopia Eletrônica de Varredura;
- ✓ Obter culturas de fungos endofíticos com os tempos de incubação de 24, 48 e 72h a partir dos fragmentos foliares de *C. americanum*;
- ✓ Analisar os fragmentos foliares de *C. americanaum* previamente inoculados em meio de cultura em comparação com a planta fixada por meio de técnicas em anatomia vegetal e Microscopia Eletrônica de Transmissão;

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Área de Coleta

A espécie *Crinum americanum* L. foi coletada no Campus da Universidade Federal do Pará (UFPA). Foi confeccionada uma exsicata que está depositada no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental com o número de registro 193664. Para o estudo da interação entre os fungos endofíticos e a espécie hospedeira, fragmentos foliares de *C. americanum* passaram pelo processo de assepsia utilizado no isolamento de fungos endofíticos e em seguida foram inoculados em meio de cultura para favorecer o crescimento dos micro-organismos.

2.3.2 Assepsia e preparo dos inóculos

As folhas de *C. americanum* foram inicialmente lavadas com água corrente e detergente neutro para a retirada dos resíduos e contaminantes externos. Foram retirados pequenos fragmentos foliares e estes passaram pelo processo de assepsia. Tal processo consistiu na imersão das amostras em álcool 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio a 2% durante 2 minutos, álcool 70% durante 30 segundos e lavagem em água destilada estéril da qual se retirou 20 µL para o controle da assepsia (PEREIRA et al., 1993). Estes fragmentos foram inoculados em meio Agar-Sabouraud acrescido de clorafenicol (1µL/mL) e incubados a 28°C por 24h, 48h e 72h.

2.3.3 Caracterização anatômica

As análises anatômicas das folhas de *C. americanum* foram realizadas no Museu Paraense Emílio Goeldi. As secções foliares recém-coletadas e os fragmentos que permaneceram incubados em meio de cultura por 24h, 48h e 72h foram fixadas em formalina neutra tamponada - FNT (LILLIE, 1965) por 48 horas; mantidos sob vácuo para retirada do ar contido nos espaços intercelulares e, posteriormente, estocadas em álcool etílico 70%. As amostras foram desidratadas em série butílica (álcool butílico terciário) (JOHANSEN, 1940) e incluídas em Paraplast. Cortes seriados transversais e longitudinais foram corados com Safranina e Azul de Astra (GERLACH, 1969) e as lâminas montadas em resina sintética.

Os aspectos relevantes foram registrados por meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio Zeiss e microscópio modelo Axiolab com câmara digital Cannon acoplada; as escalas foram efetuadas pela projeção da lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para as ilustrações.

2.3.4 Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) foram realizadas no Museu Paraense Emílio Goeldi. Para estas observações pedaços das folhas de *C. americanum* com aproximadamente 0,5 cm² foram fixadas em FNT por 48 horas, mantidas sob vácuo para retirada do ar contido nos espaços intercelulares e, posteriormente, estocados em etanol 70%. O material foi seccionado com o auxílio de lâmina de barbear e desidratados em série etanólica crescente. Subsequentemente, as secções foram secas pelo método do ponto crítico, montados em suportes metálicos e metalizadas com ouro. As observações, mensurações e captura das imagens foram realizadas em microscópio Leo modelo 1450VP MPEG, a 20 kv.

2.3.5 Análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão foram realizadas na Universidade de São Paulo (USP), no campus de São Paulo (SP).

As secções foliares de *C. americanum* recém-coletadas e os fragmentos que permaneceram incubados em meio de cultura por 24h, 48h e 72h foram e fixados em paraformaldeído 2% e glutaraldeído 50% (KARNOVSK, 1965) por 24h. Em seguida o material foi lavado em tampão fosfato de sódio 0,1M e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%. Após lavagem no mesmo tampão foi desidratado em série cetônica. Seguiu-se a pré-infiltração e infiltração e confecção de blocos com resina epóxi segundo Machado & Rodrigues (2004). Foram feitas secções semi-finas e contrastadas com Azul de metileno 1% em seguida as secções ultrafinas foram contrastadas com citrato de chumbo e acetato de uranila para a observação das amostras ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

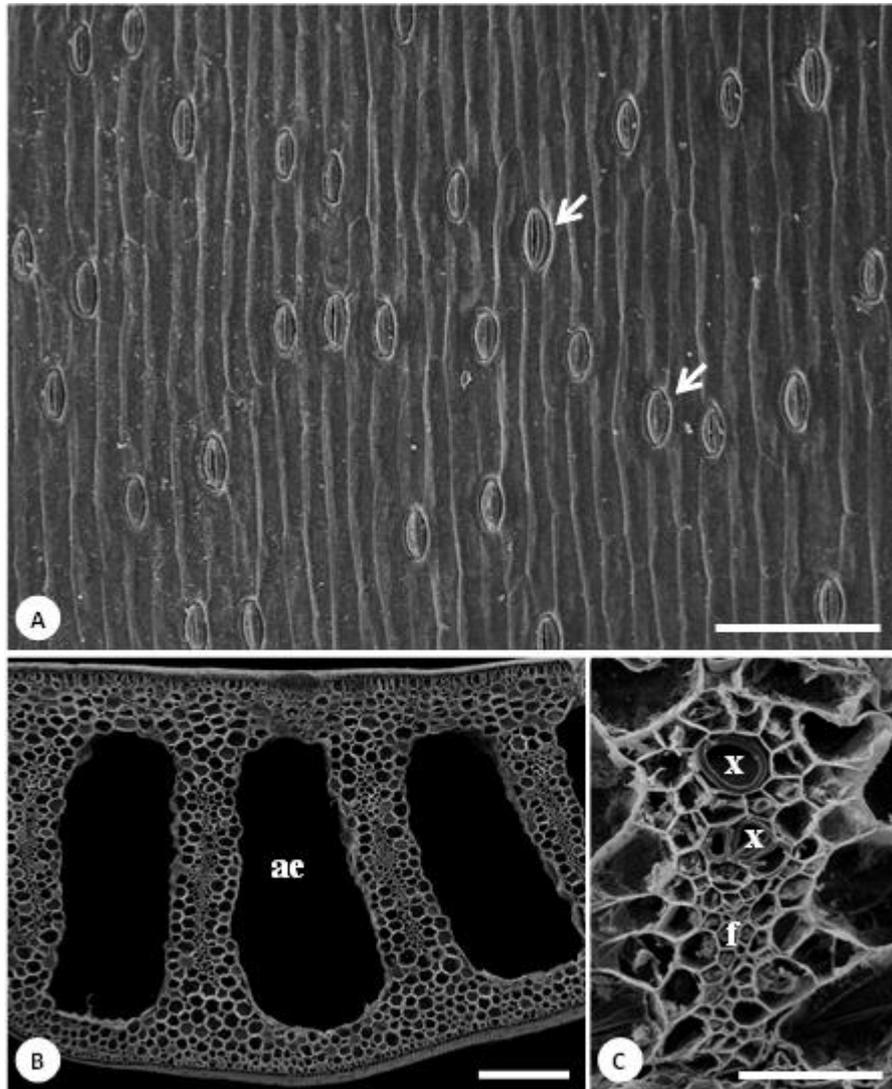
2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterização anatômica das folhas de *Crinum americanum* L.

A superfície foliar de *C. americanum* é glabra composta por células de paredes retilíneas (Figuras 12 A). A folha é anfiestomática ocorrendo estômatos do tipo anomocítico, cujas células subsidiárias são indistinguíveis em formato e tamanho das demais células epidérmicas (Figuras 12 A e B).

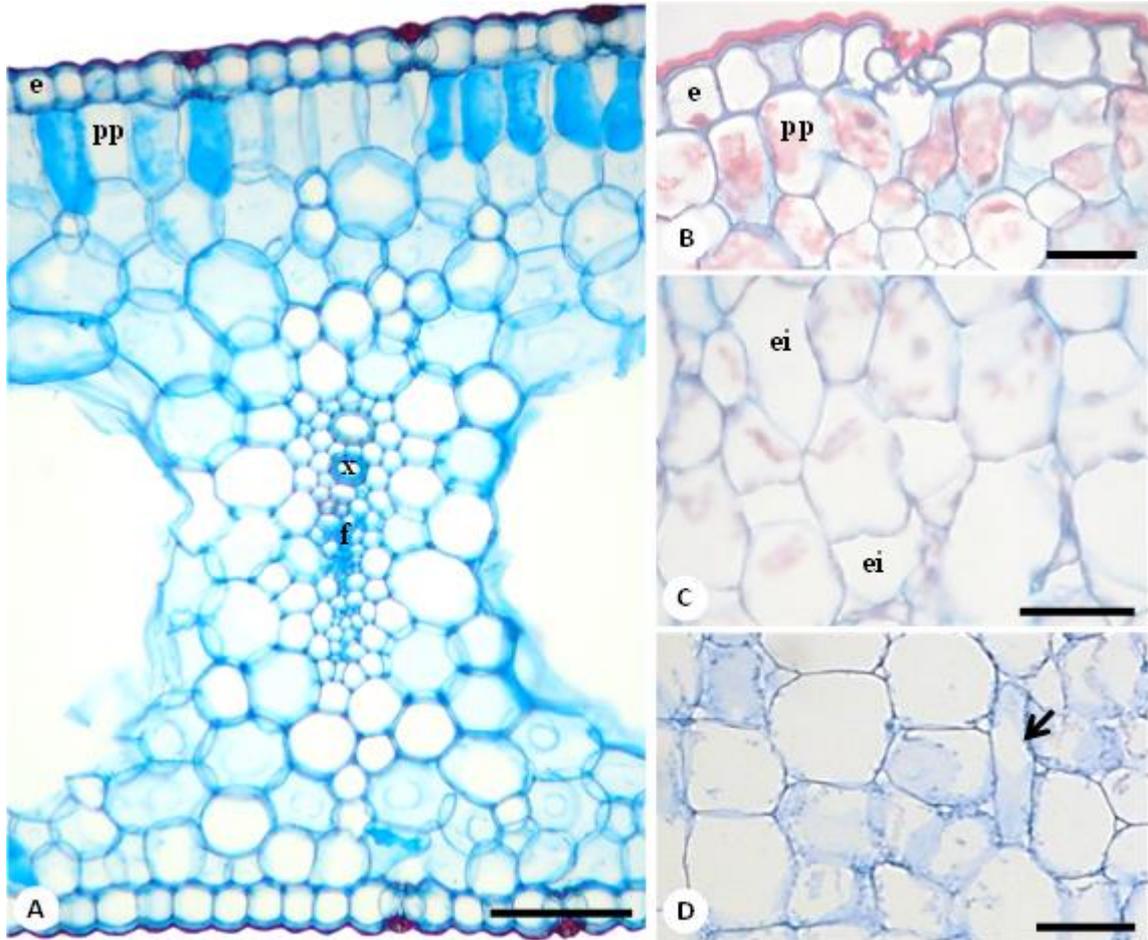
Em secção transversal a epiderme apresenta-se unisseriada com cutícula delgada e os estômatos encontram-se no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figuras 13 A e B). Abaixo da epiderme adaxial ocorre uma camada de parênquima clorofiliano em paliçada formado por células tabulares arranjadas continuamente com espaços intercelulares observados em secções longitudinais (Figuras 13 B e C). O restante do mesofilo é composto por células parenquimáticas isodiamétricas (Figuras 12 B, 13 A e D). Neste tecido ocorrem os feixes vasculares intercalados por aerênquima, além de idioblastos contendo cristais do tipo ráfide e estruturas semelhantes a laticíferos observadas em secções longitudinais (Figura 13 D). Os feixes vasculares são do tipo colateral (Figura 12 C e 13 A). As secções transversais evidenciaram aerênquimas por toda e extensão das folhas. Estes ocorrem intercalando os feixes vasculares (Figuras 12 B e 13 A).

Figura 12: Eletromicrografias de varredura das folhas de *Crinum americanum* L.



Legenda: A– Superfície foliar evidenciando células epidérmicas; B e C – secções transversais; C – vista geral do mesofilo e D - detalhe do feixe vascular do tipo colateral. Setas = estômatos; ae = aerênquima; x = xilema; f = floema. Barras: A = 150 μm ; B = 500 μm ; C = 50 μm .

Figura 13: Secções foliares de *Crinum americanum* L.



Legenda: A-B – secções transversais; C-D – secções longitudinais. A- vista geral do mesofilo; B- detalhe da epiderme e camada de parênquima em paliçada; C- Detalhe do parênquima em paliçada evidenciando espaços intercelulares; D- detalhe das células isodiamétricas do mesofilo evidenciando célula semelhante a laticífero (seta). e = epiderme; pp = parênquima em paliçada; x = xilema; f = floema; ei = espaços intercelulares; Barras: A = 50 μ m; B-D = 20 μ m.

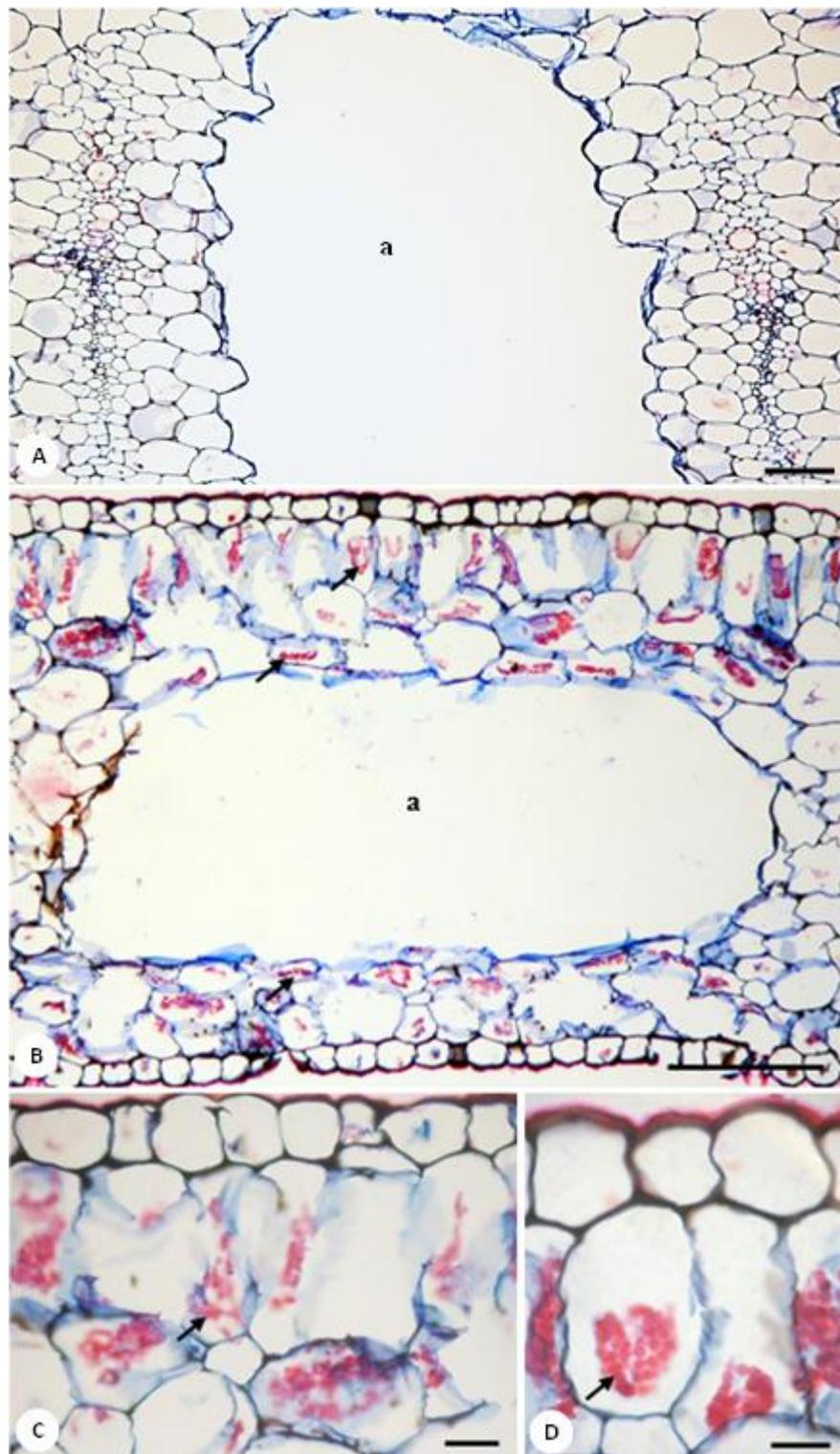
2.4.2 Estudo da interação fungo-planta

2.4.2.1 Análises Microscopia de Luz

Nas secções transversais dos fragmentos foliares de *Crinum americanum* L. que permaneceram 24h no meio de cultura, não foram observadas hifas fúngicas (Figura 14 A). Nas amostras que permaneceram 48h no meio de cultura verificou-se a presença de células fúngicas com conformação esférica semelhantes a esporos, densamente coradas de vermelho pela safranina, no interior das células parenquimáticas do mesofilo foliar (Figuras 14 B-D).

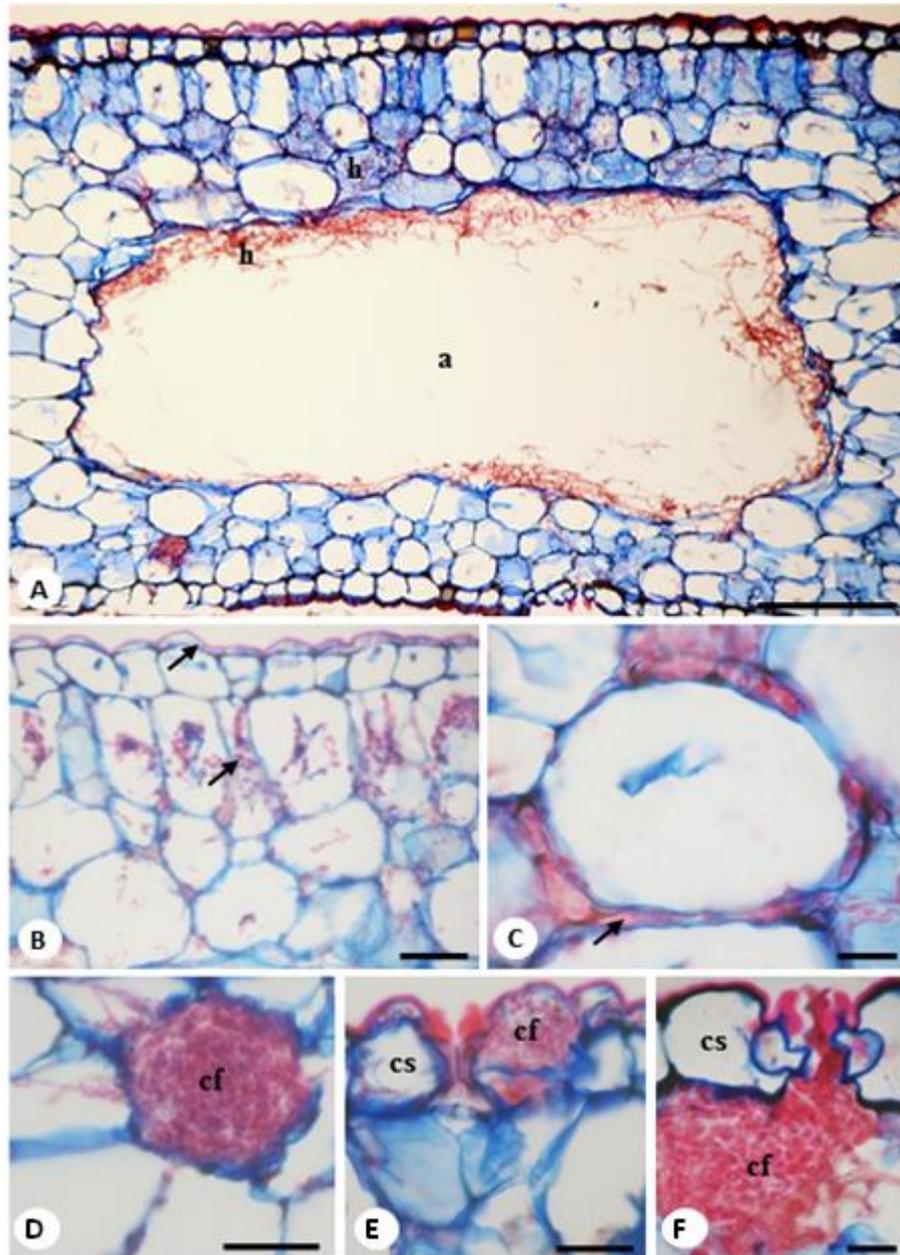
Nas secções foliares que permaneceram 72h no meio de cultura constatou-se grande quantidade de hifas ocupando tanto os espaços intra quanto intercelular (Figuras 15 A-F). Com destaque para os grandes aerênquimas presentes nas folhas, onde se observou um emaranhado de hifas (Figuras 15 A). Algumas células vegetais foram preenchidas por células fúngicas, a partir das quais se ramificam em hifas (Figuras 15 D). Muitas dessas não comportaram o aumento do volume interno e tiveram suas paredes rompidas. Algumas células fúngicas ocorrem nas células da epiderme foliar, por vezes abrindo espaço entre estas células e a camada de cutícula que as reveste (Figuras 15 E). Células fúngicas ocorrem também nas câmaras sub-estomáticas onde pode-se visualizar hifas emergindo através dos poros estomáticos (Figura 15 F).

Figura 14: Secções transversais de fragmentos foliares de *Crinum americanum* L.com 24h (A) e 48h (B) de permanência no meio de cultura



Legenda: A e B. Vista geral, evidenciando aerênquima (a); B. Células do mesofilo e epiderme, evidenciando células fúngicas (seta) no interior de células vegetais; C e D. Detalhes do mesofilo, evidenciando células fúngicas esféricas (seta). Barras: A = 150µm; B = 50µm; C = 20µm, D = 10 µm.

Figura 15: Secções transversais de fragmentos foliares de *Crinum americanum* L. com 72h de permanência no meio de cultura



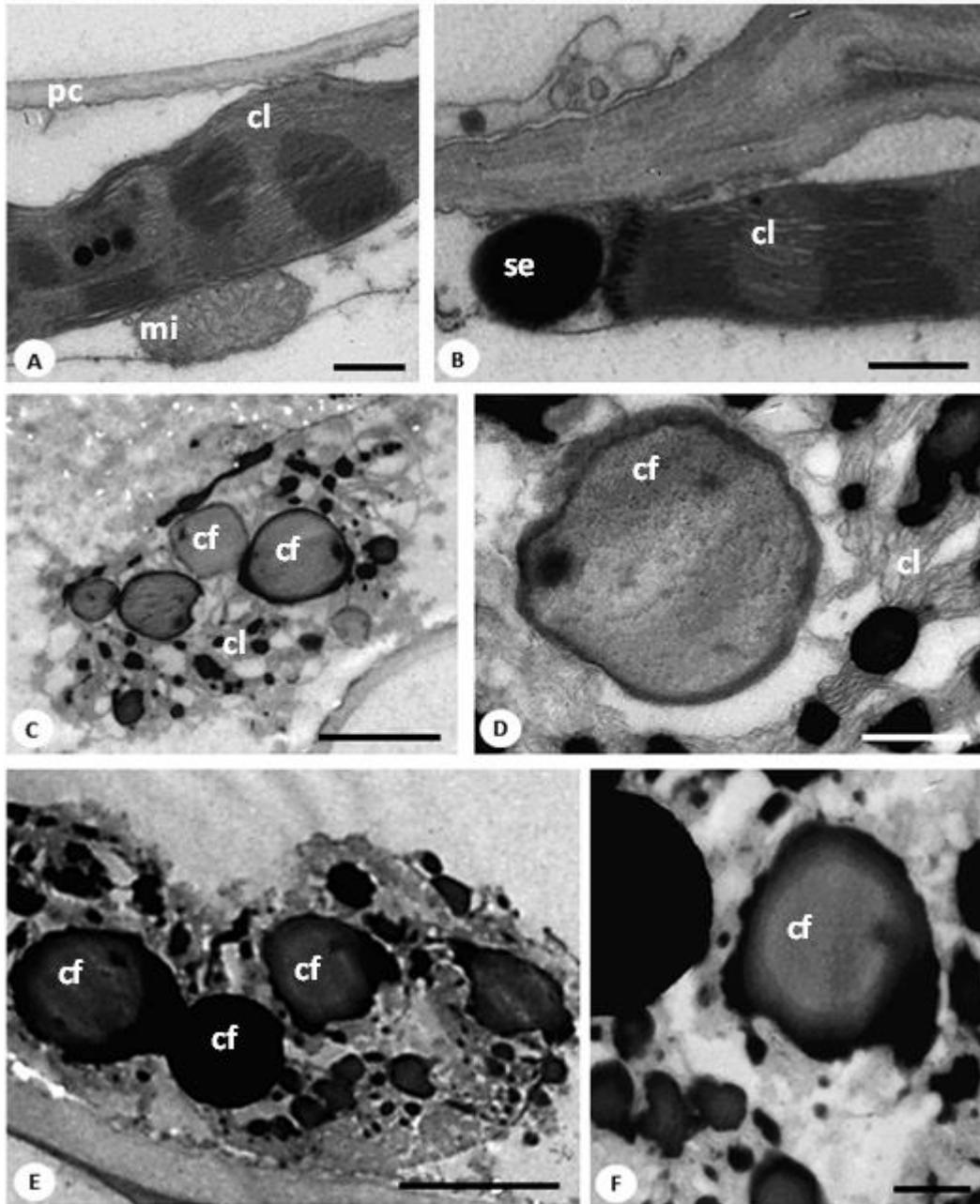
Legenda: A. Vista geral evidenciando hifas nos espaços intra e extracelulares, com destaque para a distribuição de hifas no aerênquima; B. Células do mesofilo e epiderme, evidenciando células fúngicas no interior das células vegetais e entre a epiderme e a cutícula (setas); C. Detalhe do mesofilo evidenciando células fúngicas entre as células vegetais (seta) D. Detalhe de célula do mesofilo preenchida por células fúngicas; E e F. Detalhes da epiderme, evidenciando células fúngicas entre a epiderme e a cutícula (E) e na câmara subestomática com ramificação emergindo através do estômato (F). h – hifas; a – aerênquima; cf – células fúngicas; cs – células subsidiárias dos estômatos. Barras: A = 50 μ m; B, D = 20 μ m; C, E, F = 10 μ m.

2.4.2.2 Análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão dos fragmentos foliares de *Crinum americanum* L. não inoculados no meio de cultura evidenciaram cloroplastos, mitocôndrias e parede celular intactas (Figura 16 A e B). A figura 16 B mostra um cloroplasto produzindo uma substância eletrodensa que podem ser compostos fenólicos. Nas secções dos fragmentos foliares que permaneceram 24h no meio de cultura observou-se resquícios de cloroplastos entre gotículas de substâncias eletrodensas e algumas células fúngicas (16 C e D). Nos fragmentos que permaneceram 48h no meio de cultura observou-se estruturas semelhantes e um aumento na deposição de substâncias eletrodensas em volta das células fúngicas (Figuras 16 F e G).

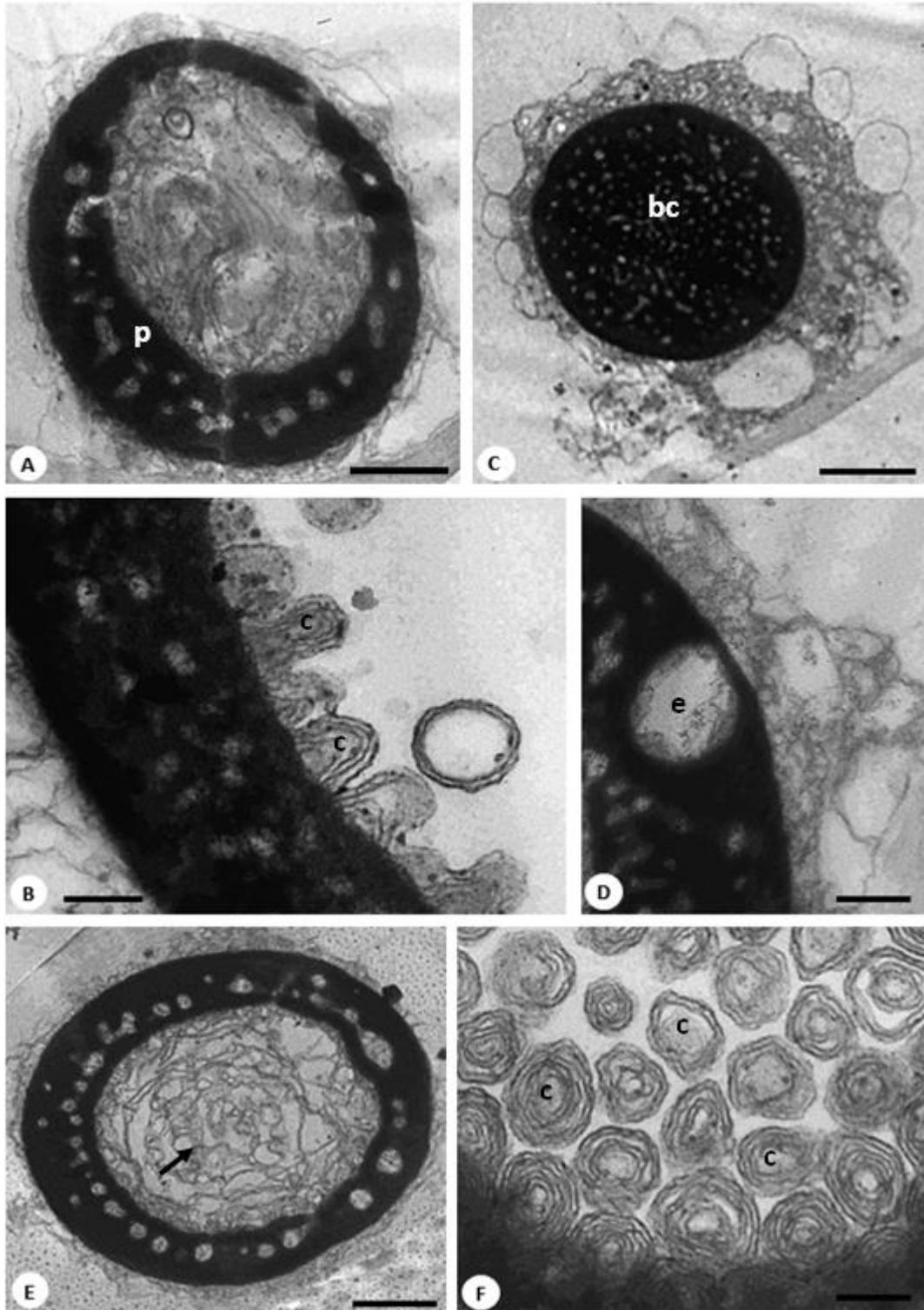
Nos fragmentos que permaneceram 72h incubados detectou-se a formação de corpos de frutificação piriformes denominados picnídios (Figuras 17 A-F). Em secção longitudinal observou-se a conformação piriforme do picnídio com a superfície formada por uma matriz eletrodensa possivelmente composta por melanina, o himênio e um emaranhado de membranas no interior da estrutura (Figura 17A). Na figura 17 B já pode-se observar a formação de conidióforos. Em secção transversal na base do picnídio formado por melanina envolta por uma matriz proteica fibrilar (Figura 17 C). Não foi constatada a presença de opérculo apenas um estreitamento da camada externa do picnídio por onde após o rompimento os conídios devem ser liberados (Figura 17 D). Em secção transversal a picnídio assume conformação circular onde podem ser observados um emaranhado de membranas (Figura 17 E) e a posterior formação de conídios (Figura 17 F).

Figura 16. Eletromicrografias de Transmissão das folhas de *Crinum americanum* L. fixadas (A-B) e dos inóculos com 24h (C-D) e 48h (E-F) de permanência no meio de cultura



Legenda: A e B - Notar a presença de mitocôndrias (mi), cloroplastos (cl) e da parede celular (pc) intactas e a produção de uma substância eletrodensa (se) pelos cloroplastos em B. C e D - resquícios de cloroplastos entre gotículas de substâncias eletrodensas e algumas células fúngicas (cf); E e F - Notar maior deposição de substâncias eletrodensas em volta das células fúngicas. Barras: A, B, D, F = 0,5 μ m; C, E = 2 μ m.

Figura 17: Eletromicrografias de Transmissão das folhas de *Crinum americanum* L. inoculadas em meio de cultura por 72h



Legenda: Secções longitudinais (A-B) e transversais (C-F) do picnídio (p). A e E – Conidióforos em formação (seta); B e F – Conidióforos formados (c); C – Base do picnídio (bc); D – detalhe do himênio (h) com estreitamento (e). Barras: A, E = 1 μm ; B, F = 0,2 μm ; C = 2 μm ; D = 0,5 μm .

DISCUSSÃO

Algumas características anatômicas observadas neste estudo nas folhas de *Crinum americanum* L., são comuns a outras espécies da família. Folhas anfiestomáticas com estômatos anomocíticos foram também observadas por Alves-Araújo et al. (2012) em espécies dos gêneros *Griffinia*, *Habranthus*, *Hippeastrum* e em *Zephyranthes candida* e *Hymenocallis littoralis*. As características acima citadas já foram relatadas para espécies da família Amaryllidaceae (SHAH; GOPAL, 1970) bem como para outras monocotiledôneas (METCALFE, 1960). A presença de uma camada de células de parênquima clorofiliano paliçádico logo abaixo da epiderme foi observada em *Habranthus itaobinus* e *Zephyranthes cândida* (ALVES-ARAÚJO et al., 2012).

Foram observados aerênquimas na região interfascicular de *C. americanum*. A mesma característica ocorreu também em *Griffinia*, *Habranthus*, *Hippeastrum* e *Hymenocallis littoralis* (ALVES-ARAÚJO et al., 2012). No entanto em *C. americanum* os aerênquimas ocupam grande parte do mesofilo. Feixes colaterais semelhantes aos identificados em *C. americanum* foram mencionados para *Griffinia*, *Habranthus*, *Hippeastrum* e *Zephyranthes candida* e *Hymenocallis littoralis* (ALVES-ARAÚJO et al., 2012). Este aspecto é comum para a família Amaryllidaceae (METCALFE, 1960).

A estrutura dos tecidos foliares de *C. americanum* nas amostras que permaneceram por no mínimo 24h em meio de cultura não apresentou sinais de degradação ou outro tipo de alteração em comparação com o material não inoculado. Isso indica a metodologia utilizada se mostrou eficiente para investigações do crescimento da microbiota endofítica em nível anatômico.

Observou-se que as células fúngicas começaram a aparecer no interior das células do mesofilo de *C. americanum* nas amostras inoculadas por 48h e somente com 72h essas células aparentemente aumentaram em tamanho e quantidade, ocupando os demais espaços no interior da planta. Esse dado indicou que os fungos endofíticos de *C. americanum* habitam o interior dos tecidos foliares ocupando os espaços intracelulares e em condições favoráveis esses micro-organismos se desenvolvem e passam a ocupar também os espaços intercelulares. Para a espécie investigada os micro-organismos ocuparam também os aerênquimas, lacunas no mesofilo e câmaras subestomáticas e com este crescimento houve o rompimento das paredes de células vegetais.

O fato dos fungos ocuparem o espaço intracelular vegetal é mais um indicativo de que esses micro-organismos vivem em intensa interação metabólica com as plantas

hospedeiras e que esta localização poderia possibilitar um intercâmbio genético entre a planta e os fungos endofíticos.

Com as análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) constatou-se que as células fúngicas começam a se desenvolver dentro das células vegetais já nas amostras que permaneceram 24h no meio de cultura. E diferentemente do que se observou no primeiro experimento realizado com Microscopia de Luz, não se observou em MET hifas fúngicas. Estas análises possibilitaram o acompanhamento do desenvolvimento de corpos de frutificação denominados picnídios e a formação de conídios no interior desses.

As amostras que não foram inoculadas em meio de cultura evidenciaram parede celular e organelas intactas, corroborando estudos que indicam os fungos realizam uma ocupação assintomática nos tecidos vegetais. Foi verificado nas mesmas amostras cloroplastos produzindo uma substância eletrodensa que possivelmente sejam compostos fenólicos. E no material que permaneceu 24h incubado essa substância vai sendo depositada ao redor de células fúngicas. Esta informação merece destaque, pois indica que os fungos se utilizam de compostos produzidos pelas plantas para formar suas próprias estruturas.

Com este estudo foi possível validar uma metodologia para análise dessa interação que une técnicas comumente usadas no isolamento de micro-organismos endofíticos e técnicas em anatomia vegetal. Além possibilitar algumas importantes e inéditas descobertas sobre a interação entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras. Descobertas essas que reforçam os estudos sobre a colonização assintomática dos endófitos, que de acordo com Schulz e Boyle (2005) configura-se em uma interação antagônica equilibrada entre planta hospedeira e endófito. Segundo os mesmos autores enquanto a virulência dos endofíticos e a de defesa da planta são equilibradas a interação permanece assintomática.

2.6 CONCLUSÕES

✓ A união das técnicas de isolamento de fungos endofíticos e de anatomia vegetal mostrou-se eficiente para estudos da interação entre endofítico e hospedeiro uma vez que os inóculos vegetais mostraram-se intactos por até 72h em meio de cultura utilizado para fungos endofíticos;

✓ Os resultados obtidos com este estudo mostraram que os fungos endofíticos habitam o interior das células vegetais e em condições favoráveis se desenvolveram e ocuparam também os espaços intercelulares.

✓ Estes resultados reforçam teorias sobre a interação entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras, segundo as quais essa interação é caracterizada por um delicado equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta e que a colonização assintomática dos endófitos é uma interação antagônica equilibrada entre planta hospedeira e endófito.

REFERÊNCIAS

- ALVES-ARAÚJO, A.; PESSOA, E.; ALVES, M. Caracterização Morfoanatômica de espécies de Amaryllidaceae s.s. E Alliaceae s.s. do Nordeste Brasileiro. **Revista Caatinga, Mossoró**, v.25, n.4, p.68-81, 2012.
- ALY, A.H.; DEBBAD, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Divers**, v.41, n.1, p.1-16, 2010.
- ALY, A.H.; DEBBAD, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, p.1829-1845, 2011.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and application of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. **Fungi: multifacetated microbes**. Boca Raton: CRC Pres, 2007, p.189-207.
- GERLACH, D. **Botanische Mikrotechnik, Eine Einführung**. Stuttgart: Georg Thieme, 1969.
- JOHANSEN, D.A. **Plant Microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill, 1940.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- MACHADO, S.R.; RODRIGUES, T.M. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.1, p.135-147, 2004.
- METCALFE, C.R. **Anatomy of the Monocotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1960.
- NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Blacpma**, v.3, n.4, p.69-72, 2004.
- PRERRIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p.362-364, 1993.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9, p.996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, n.6, p.661-686, 2005.
- SHAH, G. L.; GOPAL, B. V. Structure and development of stomata on the vegetative and floral organs of some Amaryllidaceae. **Annals of Botany**, v.34, n.3. p.737-749, 1970.

CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da microbiota endofítica de espécies de Amaryllidaceae e possibilitou a constatação de que tanto os fungos endofíticos de *Crinum americanum* L. e *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. quanto as espécies hospedeiras apresentam potencial biotecnológico para a produção de classes de metabólitos secundários. A correlação metabólica observada com as classes de metabólitos detectadas em ambos os extratos indicou que tanto os micro-organismos quanto as espécies hospedeiras são capazes de produzir algumas das mesmas classes de metabólitos e a investigação em microscopia de luz e eletrônica da colonização dos endofíticos nos tecidos vegetais indicou que os fungos endofíticos de *C. americanum* L. ocorreram no interior das células vegetais e em condições favoráveis se desenvolveram e ocuparam também os espaços intercelulares.