

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A PLANTA ETNOMEDICINAL AMAZÔNICA *Bellucia grossularioides* (L) Trianna E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS.



Revista
Desafios

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

*Community of endophytic fungi associated with amazonian ethnomedicinal plant *Bellucia grossularioides* (L) Trianna and evaluation of its antimicrobial properties.*

*Comunidad de hongos endófitos asociados com planta etnomedicinal del Amazonas *Bellucia grossularioides* (L) Trianna y evaluación de sus propiedades antimicrobianas.*

Rafael Tagori de Melo Cutrim Martins^{*1}, Ana Kleiber Pessoa Borges^{1,2}, Amaraína Maia Armiato¹, Raphael Sanzio Pimenta^{1,2}

1 Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Palmas, Tocantins, Brasil.

2 Docente Curso de Medicina – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Palmas, Tocantins, Brasil.

*Correspondência: Centro de Ciências Matemáticas e Naturais, Instituto Federal do Tocantins, AE 310 SUL, Avenida LO 05, s/n Plano Diretor Sul, Palmas-TO CEP: 77.021-090. e-mail: rtagori@ifto.edu.br

112

Artigo recebido em 01/11/2016. Aprovado em 29/11/2016. Publicado em 29/12/2016.

RESUMO

Endófitos são úteis na agricultura e na indústria alimentícia e farmacêutica como fontes de metabólitos de interesse humano. Plantas medicinais brasileiras com histórico etnobotânico oferecem grandes oportunidades de descoberta de novos metabólitos bioativos de fungos endofíticos associados a essas plantas. Neste trabalho, foram obtidas 282 colônias de fungos endofíticos das partes aéreas de *B. grossularioides*. A frequência de colonização fúngica total dentre todos os fragmentos foi de 53,6%, sendo que do total de colônias crescidas, apenas 55,24% das obtidas de folhas e 51,66% das obtidas do caule apresentaram morfotipos distintos e foram isoladas. Foram identificados em folhas e em caules, respectivamente, 48 e 23 morfotipos diferentes. A atividade antimicrobiana dos extratos brutos aquosos obtidos dos fungos endofíticos isolados mostrou-se ineficaz quando confrontadas tanto com as cepas leveduriformes do gênero *Cândida* e fungos filamentosos *Aspergillus parasiticus* quanto com bactérias *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Endófitos, Extrato, Fungos.

ABSTRACT

*Endophytes are useful in agriculture and in the food and pharmaceutical industries as metabolites source of human interest. Brazilian medicinal plants with ethnobotanical history, offer great opportunities to discovery new bioactive metabolites. In this study, 282 colonies of endophytic fungi were obtained from aerial parts of *B. grossularioides*. The frequency of complete fungal colonization of all the fragments was 53.6%, and the total number of grown colonies obtained only 55.24% of the leaves and stem of 51.66% presented distinct morphotypes and were isolated. Forty eight and 23 different morphotypes were identified from leaves and stems, respectively. The antimicrobial*

activity of aqueous extracts obtained from the isolated endophytic fungi proved to be ineffective when confronted with both the yeast strains of the genus *Candida* and with *Staphylococcus aureus* bacteria.

Keywords: Endophytes, Extract, Fungi.

RESUMEN

Los endófitos son útiles en la agricultura y en la industria alimentaria y farmacéutica como fuentes de metabolitos de interés humano. Plantas medicinales brasileñas con historia etnobotánica, ofrecen grandes oportunidades de descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos de estos hongos endófitos asociados con las plantas. En este estudio, 282 colonias de hongos endófitos se obtuvieron de partes aéreas de *B. grossularioides*. La frecuencia de la colonización fúngica completa de todos los fragmentos fue 53,6%, y el número total de colonias cultivadas, sólo el 55,24% de las láminas obtenidas y 51,66% mostró morfotipos distintos y fueron aislados. Ellos fueron identificados en hojas y tallos, respectivamente 48 y 23 morfotipos diferentes. La actividad antimicrobiana de los extractos acuosos obtenidos a partir de hongos endófitos ha demostrado ser ineficaz cuando se enfrentan a ambas cepas de levadura de género *Candida* y hongos filamentosos *Aspergillus parasiticus* y con *Staphylococcus aureus*.

Descriptor: Endófito, Extracto, Hongos.

INTRODUÇÃO

Associações entre micro-organismos e indivíduos multicelulares são comuns na natureza. Essas íntimas associações, especificamente com vegetais, ocorrem com os endófitos, definidos por Petrini (1991) e Wilson (1995) como organismos que colonizam intra e/ou intercelularmente os tecidos das plantas hospedeiras, em algum momento do seu ciclo vital. Segundo Chapla *et al.*, (2013) endófitos são quaisquer micro-organismos que residem no interior de plantas, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Esta classe de micro-organismos é encontrada na região do vegetal definida como endosfera, onde se estabelecem, sendo favorecidos por condições ideais de nutriente, pH e umidade (BACKMANN e SIKORA, 2008; LINNAKOSKI *et al.*, 2011).

De acordo com Souza *et al.*, (2004) as interações endófito-planta, ainda que não sejam totalmente esclarecidas, podem ser simbióticas, e/ou neutras. Nas simbióticas, o micro-organismo pode induzir a produção de metabólitos secundários que conferem diversas vantagens às plantas.

A literatura ainda afirma que, micro-organismos endófitos são potencialmente úteis na

agricultura e na indústria, particularmente, na alimentação e farmacêutica como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse médico. (STAMFORD *et al.*, 1998; STIERLE *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000).

Assim a tecnologia de manipulação de micro-organismos endofíticos possibilita, no entender de Peixoto-Neto *et al.*, (2002), formas de se estabelecer novos processos mais eficientes na produção de novos fármacos. Ainda podem segundo estes mesmos autores, minimizar o perigo de extinção de algumas espécies vegetais, que são coletadas de forma indiscriminada com fins de extração de produtos medicinais.

Dentre os endófitos mais comuns estão àqueles pertencentes ao reino *Fungi* e, em estudos realizados em vegetais advindos de diferentes ecossistemas do planeta, uma ou mais espécies de fungos endofíticos foram descobertos colonizando seus tecidos (STIERLE *et al.*, 1993; STAMFORD *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2000; PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2004; BACKMANN e SIKORA, 2008; LINNAKOSKI *et al.*, 2011). Não obstante, o fato de países de clima tropical serem megadiversos do ponto de vista da cobertura

vegetal, pesquisas sobre micro-organismos endofíticos ainda são incipientes.

De acordo com Peixoto-Neto *et al.*, (2002) estes micro-organismos influenciam várias características expressas pelo hospedeiro, podendo desempenhar relevantes funções para a sanidade vegetal. Rakotoniriana *et al.*, (2007) afirmam que os endofíticos podem ser benéficos aos hospedeiros, uma vez que são capazes de produzir compostos químicos que conferem maior resistência contra insetos e herbívoros, aumento da tolerância à dessecação e às substâncias tóxicas, proteção contra patógenos, além de acentuar o crescimento vegetativo da planta.

Plantas brasileiras medicinais com histórico etnobotânico, como é o caso da *Bellucia grossularioides*, popularmente denominada muúba (Figura 01), oferecem grandes oportunidades de descoberta de novos metabólitos bioativos. Soares *et al.*, (2015) alicerçam este entendimento, afirmando existir um crescente interesse industrial e acadêmico na prospecção de substâncias com interesse terapêutico.

Figura 01. *Bellucia grossularioides*.



Fonte: Disponível em:
<http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedata/base>.

O conhecimento etnobotânico tradicional relata o uso de preparados obtidos a partir das partes aéreas deste vegetal como agentes antimicrobianos contra doenças causadas por fungos leveduriformes do gênero *Candida*, e bactérias *Staphylococcus aureus*. (MORS *et al.*, 2000, SATALAYA *et al.*, 2009 e VÁSQUEZ *et al.*, 2014). Além destes, interessa-nos sobremaneira, o gênero *Aspergillus* que representa uma das principais espécies de microagentes produtores de enzimas de ação alimentícia e de micotoxinas sendo, portanto, de interesse tanto econômico quanto médico (Souza *et al* 2004).

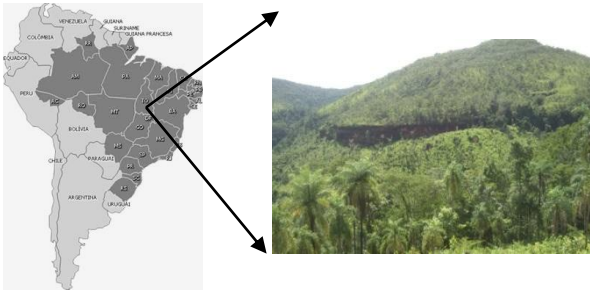
Apesar de a literatura indicar propriedades medicinais para variadas espécies vegetais, segundo Mei *et al.*,(2006); Costa *et al.*,(2008) e Lourenço *et al.*, (2009), ainda não há registro da bioprospecção de micro-organismos endofíticos presentes em *Bellucia grossularioides*, assim como de seus prováveis efeitos terapêuticos. O objetivo deste trabalho foi a caracterização da comunidade de micro-organismos endofíticos associados à *B. grossularioides*, e avaliação de seu potencial antimicrobiano frente a micro-organismos dos gêneros *Cândida*, *Aspergillus*, *Staphylococcus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização Geográfica

Os pontos de coleta situam-se às margens do Ribeirão Caranã, nas coordenadas S 10° 42` 50" W 47° 55`67", na fazenda Propriedade de Deus, no município de Monte do Carmo, TO, Brasil, em local isento de qualquer vestígio de antropização ou de dano ambiental.(Figura 02)

Figura 02. Área de coleta localizada na Fazenda Propriedade de Deus – Município de Monte do Carmo (TO)



Fonte: Mapa do Continente Sul-Americano disponível em www.google.com.br. Foto da área de coleta tirada pelos autores.

Coleta de Amostras

Partes aéreas (folhas e caules) de exemplares de *Bellucia grossularioides* (L) Triana, foram coletadas na área de vegetação nativa, nos meses de março, julho e novembro de 2014, compreendendo os períodos chuvoso e seco. A excisada foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Tocantins sob o nº HTO 10640. O material coletado foi processado no Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada (LMGA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Isolamento e preservação de endófitos.

Seguiu-se a metodologia padrão proposta por Araújo *et al.* (2010). Inicialmente foi realizada uma lavagem com detergente neutro e enxague com H₂O mQ (água milique) estéril. Logo após, três fragmentos de cada folha medindo aproximadamente 5 mm de diâmetro e três frações de cada caule, com aproximadamente 5 mm de comprimento foram excisados e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, em seguida, em hipoclorito de sódio a 2% por 03 minutos e lavadas com H₂O mQ estéril por mais 02 minutos. Após o procedimento de assepsia, os fragmentos foram transferidos para placas de cultura contendo meio de cultivo Ágar-Dextrose-Batata (BDA) suplementado com 100 µg/mL de cloranfenicol, para inibir o crescimento bacteriano.

As placas foram incubadas a 28°C por um período de até 15 dias.

Para a purificação das amostras, discos de 5 mm de diâmetro dos isolados fúngicos obtidos, foram reinoculados em placas de cultura contendo meio BDA e novamente incubados a 25°C por mais 07 dias.

A preservação dos isolados seguiu o método do congelamento em glicerol. Para tanto, seis fragmentos do micélio purificado foram retirados e acondicionados em tubos criogênicos de 2,5 ml contendo glicerol a 15 % e mantidos, em refrigeração, a -80°C e depositados na coleção de cultura Carlos Augusto Rosa da Universidade Federal do Tocantins.

Taxa de colonização

A taxa de colonização foi calculada conforme TAYLOR *et al.*, (1999), utilizando-se a fórmula: $(Nd/Nt)*100$, onde Nd e Nt correspondem, respectivamente, ao número de amostras das quais foi possível isolar um ou mais endófitos, e ao número total de fragmentos amostrados.

Determinação da atividade antimicrobiana contra patógenos *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Staphylococcus aureus*.

Nesta etapa foram realizados testes *in vitro* e em triplicata, com a finalidade de avaliar a antibiose dos metabólitos extracelulares presentes nos meios fermentados obtidos do cultivo, em meio líquido, dos endófitos isolados, seguindo-se a metodologia estabelecida por Kawamoto e Lorbeer (1976) *apud* Souza *et al.*, (2004) denominada método do filtrado, com algumas modificações.

Discos miceliais, com um diâmetro aproximado de 5 milímetros dos endófitos purificados, cultivados em meio BDA sólido, foram inoculados em Erlenmeyers com 50 mL de caldo

BDA a 28°C, incubados com agitação manual diária, por 15 dias com vistas à obtenção do extrato metabólico fúngico bruto. Em seguida, o micélio foi separado da cultura por filtração em papel filtro Whatman nº 05, sendo o resíduo sólido descartado e o sobrenadante obtido refiltrado em papel filtro Whatman nº 01. O produto final foi filtrado em membrana de esterilização millipore 0,22 µm/cm² de poro, para remoção de contaminantes residuais e armazenados em tubos de ensaio esterilizados. O produto final, assim obtido, foi considerado como concentração padrão.

Para a determinação da atividade antimicrobiana, os sobrenadantes foram confrontados com cepas-padrão dos patógenos humanos *C. albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (ATCC 18805) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo os testes realizados com base no modelo descrito por Quiroga *et al.*, (2001) modificado. Desta forma, após diluição e padronização de concentração pela escala de Mc Farland (0,5), os patógenos do gênero *Candida*, foram inoculados, por meio da técnica do esgotamento, em placa de Petri contendo meio Ágar Sabouraud (AS) e *S. aureus* foi inoculado em placa contendo meio Müeller-Hinton (MH). Em seguida, 20µl de cada extrato aquoso bruto foi aplicado em um disco branco de papel estéril (com aproximadamente 5 mm de diâmetro) à temperatura ambiente. Seis discos assim preparados foram depositados sobre a superfície do ágar inoculado com o patógeno alvo. Como controle positivo utilizou-se fluconazol 5mg/4ml para os testes que envolveram as leveduras e gentamicina para *S. aureus*. As placas foram incubadas em estufa BOD por 48 horas.

Determinação da atividade antimicrobiana contra *Aspergillus parasiticus*.

Os fungos endofíticos isolados foram testados, segundo o método da cultura pareada,

quanto à produção de substâncias voláteis e difusíveis frente ao fitopatógeno *A. parasiticus* (IMI 242695). Os isolados endofíticos foram previamente cultivados em meio BDA por 07 dias. Em seguida, um disco de ágar com 5 mm de diâmetro contendo o micélio de cada fungo endofítico foi inoculado em uma das extremidades de uma nova placa de Petri contendo meio BDA e incubado em estufa BOD por três dias a 25°C. Após este período, um disco de, aproximadamente, 05 mm do fitopatógeno *A. parasiticus* foi inoculado em um ponto diametralmente oposto ao endófito cultivado.

Em seguida as placas foram incubadas a 25°C por 7 dias, e o raio do micélio do fungo fitopatogênico foi mensurado e comparado com valores observados no controle negativo (cultura pura). Para a verificação da produção de compostos voláteis foram utilizadas placas de cultura com meio cindido na parte central a fim de que fosse evitada possível difusão de qualquer substância não desejada de um extremo a outro da placa.

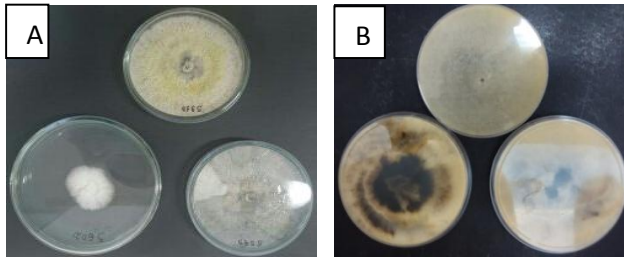
Visando evitar a dissipação dos compostos voláteis, cada placa foi selada com filme de parafina plástica (Parafilm®). Foram confrontados (em lados diametralmente opostos da placa) o endofítico e o fitopatógeno. Os controles negativos foram realizados com a inoculação de cada fitopatógeno no meio de cultura sem a presença do antagonista, sendo que a inibição do crescimento foi avaliada, medindo-se o crescimento do micélio do fitopatógeno incubado na presença do endofítico teste, em comparação com o controle. Todos os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade dos fungos isolados dos diferentes tecidos vegetais foi determinada com base

na contagem das colônias purificadas e na análise morfológica macroscópica. Em folhas e em caules foram identificados, respectivamente, 48 e 23 morfotipos diferentes (Figura 03).

Figura 03. Amostra da diversidade morfotípica de fungos endofíticos isolados de partes aéreas (folhas e caules) de *B. grossularioides*. A) Endófitos isolados da folha; B) Endófitos isolados do caule.



A tabela 1 abaixo exhibe a distribuição das colônias isoladas neste trabalho que, em conjunto, perfazem um total de 282 amostras.

Tabela 1. Isolamento de fungos endofíticos colonizadores das partes aéreas de *Bellucia grossularioides*.

INDIVÍDUOS	COLÔNIAS CRESCIDAS	COLÔNIAS ISOLADAS	ISOLAMENTO (%)
01	18	14	78
02	21	14	67
03	21	14	67
04	15	10	67
05	23	12	52
06	21	09	43
07	22	13	59
08	11	07	64
09	16	08	50
10	23	06	26
11	11	08	73
12	20	08	40
13	16	09	56
14	16	10	63
15	16	07	44
16	15	04	27

17	19	10	53
18	16	09	56
19	21	10	48
20	14	08	57
21	20	09	45
22	17	07	41
23	16	10	63
24	18	12	67
25	16	11	69
26	22	09	41
27	19	11	58
28	17	09	53
29	13	08	62
30	11	06	55
Total	524	282	54

Segundo a literatura, fragmentos caulinares e foliares têm sido as partes vegetais mais utilizadas para a obtenção de fungos endofíticos em estudos de diversidade e bioprospecção (SURYANARAYANAN *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2004; PROMPUTTHA *et al.*, 2007; GONZÁLEZ e TELLO, 2011; HIGGINBOTHAM *et al.*, 2013).

De modo geral houve maior frequência de fungos endofíticos nas folhas do vegetal hospedeiro que nos caules, sendo que do total de colônias isoladas (282), 158 foram obtidas de folhas (55,24%) e 124 obtidas do caule (51,66%). As taxas de colonização fúngica das partes aéreas de *B. grossularioides* são demonstradas na tabela 2.

Tabela 2. Taxas de colonização endofítica por tecido vegetal analisado.

TVA	TCC	Média ± Sd	TCI	Média ± Sd
Folha	286	9,5 ± 2,30	158	5,3 ± 2,1
Caule	240	8 ± 2,18	124	4,1 ± 1,3
Total	524	17,5 ± 3,50	282	9,4 ± 2,5

TVA – Tecido Vegetal Analisado; TCC – Total de Colônias Crescidas; TCI – Total de Colônias Isoladas.

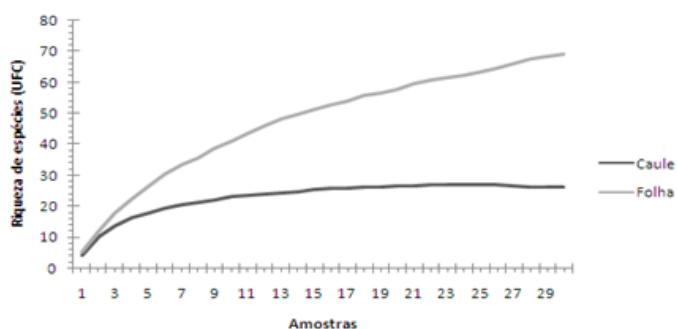
Estes dados apresentam-se consonantes à literatura, quando indicam uma alta taxa de colonização em partes aéreas de muúba. Percentagens elevadas de colonização endofítica foram descritas por Souza *et al.*, (2004) e Galvão (1998) para as folhas das plantas tropicais *Pueraria phaseoloides* e *Theobroma grandiflorum* com taxas de 72,5% e 58,7% respectivamente. Huang *et al.*, (2008) observaram frequências de colonização superiores a 74% em folhas, caules e frutos de 29 plantas medicinais tradicionais chinesas. Banhos *et al.*, (2014) que obtiveram taxa de colonização endofítica de 53,3% em *Myrcia guianenses* utilizando os métodos de desinfecção da superfície similares aos apresentados neste trabalho, e o mesmo meio para o isolamento (BDA). Vieira *et al.*, (2012) relataram frequências de colonização acima de 23,5% fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccínea*. Silva *et al.*, (2006) evidenciaram taxas de colonização superiores a 54,8% em folhas e 77,2% em caules de plantas pertencentes ao gênero *Annona*.

Huang *et al.*, (2008) afirmam que a abundância da colonização endofítica varia de acordo com os tecidos do hospedeiro. A literatura científica sugere como uma explicação possível para o fato de serem notadas altas taxas de colonização em determinados tipos de tecidos vegetais o fato de que fungos endofíticos podem exercer papel basilar nas estruturas anatômicas e fisiológicas das plantas incrementando, desta forma, a resistência a prováveis inimigos naturais (GALVÃO, 1998; SOUZA *et al.*,

2004; SILVA *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2012).

A avaliação de riqueza para revelação da suficiência do esforço amostral foi revelada através da curva de acumulação de morfotipos por indivíduo vegetal coletado. (Figura 04).

Figura 4. Curva de riqueza de morfotipos por tecido vegetal coletado de *B. grossularioides* observada pelo estimador Jackknife 1



Analisando estas variáveis percebe-se um crescimento contínuo no número de morfotipos com o aumento da amostragem em endófitos oriundos das folhas, sem, no entanto, ocorrer uma estabilização. Uma possível explicação para este fato de acordo com Malta (2013) é de que é grande a probabilidade de que fossem encontrados mais morfotipos caso o esforço amostral tivesse sido maior. O índice de Jackknife demonstrou uma assíntota apenas nas amostras oriundas do caule. Para o tecido foliar, no entanto, os dados apresentados evidenciam a necessidade de complementação da amostragem para estabilização da curva de riqueza de espécies.

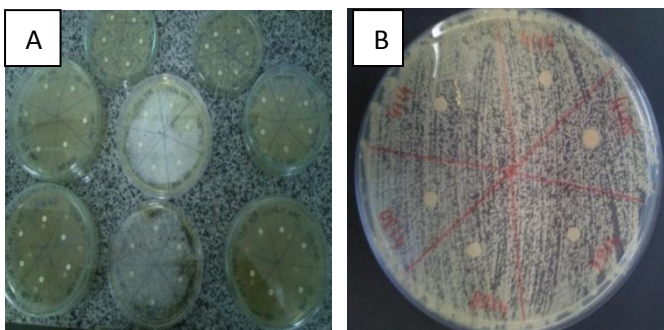
Ao se observar o panorama do tratamento das doenças infecciosas, nota-se que o rápido desenvolvimento de resistência à terapia antimicrobiana motiva a pesquisa de novos fármacos capazes de combater de forma eficaz e segura estes patógenos. (MACHADO *et al.*, 2010).

Alguns autores a exemplo de Piatto (1997) e Glehn e Rodrigues (2012) mencionam que a candidose é uma doença causada, por fungos do

gênero *Candida* que são parte significativa da microbiota fúngica humana, podendo habitar o trato gastrointestinal e geniturinário e que, sob determinadas circunstâncias, tornam-se patogênicos. Estes micro-organismos são responsáveis por várias formas de infecções (dentre elas infecções leucorréicas) e são recomendadas como cepas-padrão para testes de susceptibilidade antifúngica. (MENEZES *et al.*, 2009).

Nestas análises, avaliou-se as atividades antifúngica e/ou antibacteriana do filtrado do cultivo dos endófitos testados. Nenhuma atividade antimicrobiana foi observada para quaisquer dos extratos brutos testados sobre nenhum dos micro-organismos alvo como demonstrado pela figura 05 abaixo.

Figura 05. Teste antimicrobiano do extrato aquoso bruto dos fungos endofíticos isolados e purificados de *B. grossularioides* em presença de patógenos humanos do gênero *Cândida* e do gênero *Staphylococcus*. A) Início do experimento; B) Placas após 48 h de incubação.



Desta maneira, os resultados observados, contrastam dos obtidos por Souza *et al.* (2004) que aferiram a capacidade inibitória dos metabolitos secundários de endófitos isolados de plantas amazônicas tóxicas contra *S. aureus*. Ramasamy *et al.* (2010) verificaram igualmente, atividade antibacteriana de extratos metabólicos produzidos por fungos endofíticos encontrados na Malásia, contra este mesmo micro-organismo.

Em contrapartida, Soares *et al.* (2015) relataram não registrar nenhuma atividade antibacteriana dos compostos produzidos por fungos endofíticos filamentosos isolados a partir das partes aéreas de *Costus spiralis*. Estes autores afirmaram não visualizar inibição do crescimento dos patógenos-alvo (*Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae*) em presença dos endófitos-teste. Não obstante, Ascêncio *et al.*, (2014) comunicaram que os extratos advindos desta mesma planta apresentaram atividade inibitória contra as leveduras do gênero *Candida*, bem como contra bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Enterococcus*.

Para a análise da atividade antagônica dos endófitos pesquisados frente à *Aspergillus parasiticus*, a literatura é abundante em demonstrações de resultados positivos a exemplo de Pimenta *et al.*, (2012); Malta (2013); Silva *et al.* (2013); Ascêncio *et al.* (2014) e Malta *et al.* (2015). No entanto, os endófitos isolados das partes aéreas de *B. grossularioides* não apresentaram potencial para biocontrole do fitopatógeno *A. parasiticus* através da produção de substâncias bioativas (difusíveis e voláteis).

CONCLUSÃO

A prospecção de micro-organismos endofíticos associados à *B. grossularioides* foi realizada demonstrando que a muúba constitui um importante reservatório de fungos endofíticos. A maior frequência de fungos endofíticos foi obtida nas folhas do vegetal hospedeiro (55,24%), do que no caule (51,66%). No entanto, não foi evidenciado nenhuma atividade antimicrobiana frente a micro-organismos dos gêneros *Cândida*, *Aspergillus* e *Staphylococcus*, para quaisquer dos extratos obtidos a partir dos endófitos testados sobre nenhum dos micro-organismos alvo.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

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**. 1. ed. Piracicaba, SP: Copiadora Luiz de Queiroz, v. 1, 167 p., 2010.

ASCÊNCIO, P.G.M.; ASCÊNCIO, S.D.; AGUIAR, A.A.; FIORINI, A.; PIMENTA, R.S. Chemical Assessment and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Endophytic Fungi Extracts Isolated from *Costusspiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol.2014, article ID 190543, 10 pages, 2014.

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

BANHOS, E.F.D.; SOUZA, A.Q.L.D.; ANDRADE, J.C.D.; SOUZA, A.D.L.D.; KOOLEN, H.H.F.; ALBUQUERQUE, P.M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 153-162, 2014.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Endophytic Fungi: An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products. **Revista Virtual Química**, v. 5, n. 3, p.421-437, 2013.

COSTA, R.J.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology** v.19, n. 118(1), p. 86-93, 2008.

GLEHN, E.A.V.; RODRIGUES, G.P.S. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 435-438, 2012.

GONZÁLEZ, V.; TELLO, M.L. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. **Fungal Diversity**, v.47, p. 29–42, 2011.

HIGGINBOTHAM, S.J.; ARNOLD, A.E.; IBAÑEZ, A.; SPADAFORA, C.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and

Distribution of Their Host Plants. **PLoS ONE** v.8, n. 9, 2013.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 61-75, 2008.

KAWAMOTO, S.O.; LORBEER, J.W. Protection of onion seedling from *Fusarium oxysporum* sp.cepae by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 189–191, 1976.

LINNAKOSKI, R.; PUHAKKA, H.; PAPPINEN, A. Endophytic fungi isolated from *Khaya anthothecain* Ghana. **Fungal Ecology**, n.3, v.12, p.444-453, 2011.

LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z.J.; ZOU, W.X.; TAN, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodondactylonas* a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 279-287, 2004.

LOURENÇO, A.C.S.; MIGUEL, L.K.; GUARIDO, K.L.; SENSIATE, L.A.; SALLES, M.J.S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.11, n.4, p.407-413, 2009.

MACHADO, F.L.S.; KAISER, C.R.; COSTA, S.S.; GESTINARI, L.M.; SOARES, A.R. Biological activity of the secondary metabolite from marine algae of the genus *Laurencia*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 441-452, 2010.

MALTA, C. M. Verificação da produção de substâncias bioativas a partir de micro-organismos associados à *Eugenia dysenterica* DC em região de cerrado no Tocantins. Dissertação (Mestrado)-PPG Ecologia de Ecótonos. UFT. Tocantins, Brasil, 2013.

MALTA, C. M.; FERREIRA, E. M. S.; COELHO, C. M.; PIMENTA, R. S. Fungos endofíticos de *Eugenia dysenterica* DC como biocontroladores de fitopatógenos *in vitro*. **Journal of Bioenergy and Food Science**, Macapá, v.2, n.4, p.189-193, out/dez, 2015.

MEI, N.; GUO, L.; ZHANG, L.; SHI, L.; SUN, Y.A.; FUNG, C. Analysis of gene expression changes in relation to toxicity and tumorigenesis in the livers of Big Blue transgenic rats fed confrey (*Symphytum officinale*). **BMC Bioinforma**, n. 2, v. 7, p.16, 2006.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications. 367 p. 2000.

- MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A.; ARAÚJO, K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.2, p.261-266, 2012.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leave. In: Andrews, J.; Hirano, S.S. (Eds). **Microbial Ecology of Leaves**. New York. Springer Verlag. p. 179 – 197, 1991.
- PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotec. Ciência & Desenv.**, ano 05, n. 29, p. 62 – 76, 2002.
- PIATO, S. 1997. **Tratado de ginecologia**. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda, 739p.
- PIMENTA, R.S.; SILVA, J.F.M.; BUYER, J.S.; JANISIEWICZ W.J. Endophytic Fungi from Plums (*Prunus domestica*) and Their Antifungal Activity against *Monilinia fructicola*. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1883-1889, 2012.
- PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; HUGE, E.; MACKENZIE, C.; HYDE, K. D.; JEEWON, R. A. Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 579-590, 2007.
- RAKOTONIRIANA, E. F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E. J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A. M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2007.
- RAMASAMY, K.; LIM, S. M.; BAKAR, H. A.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. S.; ALI, M. F.; WEBER, J. F. F.; COLE, A. L. J. Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. **Phytot. Res.**, v. 24, p. 640-643, 2010.
- RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal Basic Microbiology**, v. 40, n 4, p. 261–267, 2000.
- ROZWALKAI, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extracts, decoctions and essential oils of medicinal and aromatic plants in the inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Glomerella cingulata* isolates from guava fruits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.301-307, 2008.
- SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. **W. Journal Microb. Biotec.**, v. 19, p. 767-770, 2003.
- SATALAYA, R.J.; ROJAS, U.J.; RIOS, B.; GRANDEZ, M.; RENGIFO, E.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; GIMENEZ, A.; FLORES, N. Antiparasitic activity of medicinal plants from Peruvian Amazon. **Biofarbo**, v. 17, n. 2, p. 23-31, 2009.
- SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.
- SILVA, T.H.; PIMENTA, R.S.; MALTA, C.M. Utilização de fungos endofíticos associados à *Eugenia dysenterica* DC (cagaita) como antagonistas dos fungos fitopatogênicos: *Aspergillus parasiticus*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Monilinia fructicola*. **9º Seminário de iniciação científica**. UFT, 2013.
- SOARES, D.A.; ASCENCIO, P.G.M.; LEÃO, G.M.A.; RODRIGUES, K.M.T.M.; PIMENTA, R.S. Detecção de compostos voláteis com atividade antibacteriana por fungos endofíticos associados à *Costus spiralis*. **Journal of Bioenergy and Food Science**, n. 4, v.2, p.156-159, 2015.
- SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogensbentham*. **Acta Amazonica**, n. 2, v. 34, p. 185 – 195, 2004.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé *Pachyrhizus (erosus* L. Urban). **Ciência e Tec. de Alimentos**, n. 4, v. 18, p. 382 – 385, 1998.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214 – 216, 1993.
- SURYANARAYANAN, T.S.; MURALI, T.S.; VENKATESAN G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall

gradient. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, p. 818-826, 2002.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Ethnobotany of medicinal plants in riverine communities of the Municipality of Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 44, n. 4, p. 457–472, 2014.

VIEIRA, P.D.S.; SILVA, F.G.; SILVA, W.M.T.; CAVALCANTI, P.A.; LIMA, D. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L.

em Pernambuco, Brasil. **Rev. Bras. de Bioc.**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2012.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *tubercularia* sp. Strain tf5, an endophytic fungus of *taxus mairei*. **FEMS – Microbiology Letters**, v. 193, p. 249 – 253, 2000.

WILSON, D. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 2, n. 73, p. 274 – 276, 1995.