

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EXTRAÍDOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS: O CASO DO *Colletotrichum* sp.

BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF SECONDARY METABOLITES EXTRACTED FROM ENDOPHYTIC FUNGI: THE CASE OF *Colletotrichum* sp.

JOÃO ALENCAR PAMPHILE^{1*}, ALESSANDRA TENÓRIO COSTA², PRISCILA ROSSETO³, JULIO CESAR POLONIO⁴, JOSÉ ODAIR PEREIRA⁵, JOÃO LÚCIO AZEVEDO⁶

1. Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, docente do curso de graduação de Tecnologia em Biotecnologia e coordenador do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 2. Pós-Doutoranda do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental na Universidade Estadual de Maringá; 3. Mestre em Biotecnologia Ambiental pela Universidade Estadual de Maringá; 4. Doutorando em Biotecnologia Ambiental pela Universidade Estadual de Maringá; 5. Doutor e Professor da Universidade Federal do Amazonas; 6. Doutor e Professor Aposentado da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP.

* Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-900. prof.pamphile@gmail.com

Recebido em xx/xx/201x. Aceito para publicação em xx/xx/201x

RESUMO

Endófitos são aqueles micro-organismos que habitam o interior das plantas, sem causar prejuízo ao hospedeiro. Nas interações simbióticas os micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos secundários que podem conferir vantagens à planta, tais como, a diminuição da herbivoria, ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos. Além de exercerem diversas funções de importância para o hospedeiro, os mesmos são úteis na agricultura, indústria farmacêutica e de defensivos agrícolas. A obtenção de metabólitos secundários e de substâncias de interesse econômico, como enzimas, antibióticos e outros fármacos, a partir de micro-organismos endofíticos, tem sido frequentemente relatada na literatura científica. Os fungos do gênero *Colletotrichum* são economicamente importantes, pois estão relacionados com diversas doenças em várias culturas. Estudos tem mostrado que é comum encontrar estes fungos na condição de endofíticos em inúmeros cultivares, indicando um grande potencial de se explorar este comportamento em prol da obtenção de produtos de interesse econômico. Nesta revisão, discutimos sobre as interações entre endófitos e seus hospedeiros, a produção de metabólitos secundários e o potencial biotecnológico do fungo *Colletotrichum* na condição endofítica.

PALAVRAS-CHAVE: Moléculas bioativas, atividade fitossanitária, biotecnologia microbiana.

ABSTRACT

Endophytes are those microorganisms that inhabit the interior of plants, without harming the host. In symbiotic interactions microorganisms produce or induce the production of secondary metabolites that can confer advantages to the plant, such as decreased herbivory, insect attack, increasing tolerance to abiotic stresses and control of other microorganisms. In addition to their importance for various functions of the host, the same are useful in agriculture, pharmaceuticals and agrochemicals. Obtaining secondary metabolites and

substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics and others drugs from endophytic microorganisms has been frequently reported in the scientific literature. The fungi of the genus *Colletotrichum* are economically important because they are related to cause diseases in various cultures. Studies have shown that it is common to find these fungi endophytically in several cultivars, indicating a large potential to exploit this behavior for the sake of obtaining products of economic interest. In this review, we will discuss about the interactions between endophytes and their hosts, the production of secondary metabolites and the biotechnological potential of *Colletotrichum* fungus in endophytic condition.

KEYWORDS: Bioactive molecules, phytosanitary activity, microbial biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento de plantas nos seus habitats envolve a sua capacidade de interagir com diferentes espécies de organismos. Entre essas associações, os micro-organismos chamados endófitos têm recebido atenção especial devido à sua interação complexa com diferentes espécies de plantas (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

Endófitos são micro-organismos que habitam o interior da planta, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais, como folhas, ramos e raízes, podendo ocupar espaços inter e intracelulares (AZEVEDO *et al.*, 2000; GARCIA *et al.*, 2012a, FELBER *et al.*, 2016). A definição de micro-organismos endofíticos foi inicialmente descrita por Azevedo & Araújo (2007), sendo ainda expandida por Mendes & Azevedo no mesmo ano. Uma definição mais recente, relatada por Azevedo (2014) considera-os todos os micro-organismos cultiváveis ou não que habitam as partes internas dos tecidos vegetais sem causar danos aos seus hospedeiros. Podem ser divididos em dois grupos: aqueles que não geram estruturas externas a partir do hospedeiro (grupo I) e o que são capazes de desenvolver estruturas externas, tais como os nódulos de bactérias

fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos (grupo II). Os micro-organismos endofíticos, como fungos e bactérias, desempenham papel importante em suas plantas hospedeiras.

Apesar da imensa quantidade de espécies de plantas superiores existente, e o conhecimento de que cada planta individual, é hospedeira de um ou mais endófitos, poucas espécies de plantas foram estudadas em relação à sua biologia endofítica (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Normalmente, centenas de espécies endofíticas podem ser isoladas a partir de uma única planta e, pelo menos, uma espécie mostra especificidade ao hospedeiro. Assim, diferentes espécies de plantas como aquelas que possuem propriedades medicinais de importância agrícola foram pesquisadas quanto à presença de endófitos (GARCIA *et al.*, 2012a, ORLANDELLI *et al.*, 2012; RHODEN *et al.*, 2012).

A relação de um endófito com o hospedeiro pode variar de um hospedeiro para outro e as interações entre eles ainda não são bem compreendidas (ALY *et al.*, 2011; JALGAONWALA *et al.*, 2011). Esta associação sugere que esses organismos coevoluíram com seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualista onde os endófitos recebem nutrientes e proteção, enquanto a planta tem vantagens dessa interação, como maior resistência em ambientes com estresse intenso causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematoides parasitas e micro-organismos fitopatogênicos) e abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes e salinidade) (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Devido a essa interação, é que os endófitos são capazes de produzir substâncias de interesse biotecnológico.

Os fungos endofíticos representam uma rica fonte de novos produtos naturais e propriedades bioativas. Eles colonizam um habitat ecológico praticamente inexplorado e seus metabólitos secundários são particularmente ativos, possivelmente devido a interações metabólicas com seu hospedeiro (KUSARI *et al.*, 2012).

Os produtos naturais obtidos a partir de fungos endofíticos têm um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antimicrobianos, anti-oxidantes (JALGAONWALA *et al.*, 2011), propriedades imunossupressoras, antivirais (STROBEL; DAISY, 2003) e citotóxicos (ALY *et al.*, 2011). Os metabólitos produzidos podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcalóides, esteróides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ácidos fenólicos, entre outros (ZHANG *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2013).

Estudos mostram que os endófitos podem produzir um grande número de metabólitos secundários bioativos importantes, conhecidos apenas em plantas (ALY *et al.*, 2011; JALGAONWALA *et al.*, 2011). Um exemplo é a produção do Taxol pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, um importante fármaco anticancerígeno, isolado inicialmente da planta *Taxus brevifolia* (STIERLE *et al.*, 1993).

Fungos do gênero *Colletotrichum* são de grande importância para a agricultura, por se tratarem de

fitopatógenos de diversas culturas, dentre elas, a cultura do guaraná, de grande destaque na região amazônica, e que pode ser afetado por *C. guaranicola*, contudo a busca por alternativas para controlar a antracnose do guaraná, aponta para estirpes endofíticas de *Colletotrichum* sp. Diversos micro-organismos endofíticos vêm sendo estudados e utilizados como uma alternativa para o controle de muitas doenças.

Endófitos do gênero *Colletotrichum* tem recebido atenção nas pesquisas, devido à sua característica de produzir moléculas bioativas, como o ácido colletotrico, produzido por *C. gloeosporioides*, isolado de *Artemisia mongolica* que apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e contra o fungo patogênico *Helminthosporium sativum* (ZOU *et al.*, 2000). Além disso, as espécies de *Colletotrichum* produzem metabólitos fitotóxicos que induzem sintomas semelhantes aos dos próprios patógenos e podem ser usados para o controle biológico (GARCIA-PAJÓN, COLLADO, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo discutir as interações entre endófitos e seus hospedeiros, a produção de metabólitos secundários e o potencial biotecnológico do fungo *Colletotrichum* em condição endofítica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão da literatura baseada em artigos científicos publicados no período compreendido entre 1993 e 2017. Foram consultados artigos em inglês e português, referentes aos temas interação endófito-planta, moléculas bioativas, biotecnologia microbiana, atividade fitossanitária e *Colletotrichum*. A busca foi realizada nas plataformas eletrônicas PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Google Scholar (<https://scholar.google.com.br>), Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>).

3. DESENVOLVIMENTO

Interação endófito-hospedeiro e produção de metabólitos secundários

Uma variedade de micro-organismos endofíticos está presente no interior das plantas e a composição das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ambientais e sazonais, incluindo altitude e precipitação (JALGAONWALA *et al.*, 2011, SANTOS *et al.*, 2013).

As comunidades endofíticas, cuja composição varia em função do hospedeiro e das condições ambientais, estão inter-relacionadas em um equilíbrio harmônico (KUSARI *et al.*, 2012). A relação benéfica entre fungo e hospedeiro pode ser observada pela proteção, nutrição e produção de substâncias pelo fungo, o que aumenta o crescimento, a reprodução e a resistência das plantas no ambiente (SANTOS *et al.*, 2013).

Kusari *et al.* (2012) relataram sobre a complexa interação química entre micro-organismos e seus

hospedeiros, destacando que existem inúmeras barreiras químicas e físicas que devem ser superadas para estabelecer com sucesso uma associação. A hipótese do antagonismo equilibrado é estabelecida como um endófito evitando a ativação das defesas do hospedeiro, garantindo a auto resistência antes, de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro; e conseguindo crescer dentro de seu hospedeiro sem causar manifestações visíveis de infecção ou doença, onde há um antagonismo do equilíbrio entre planta e hospedeiro. Quando a virulência fúngica e a defesa da planta são equilibradas, a associação permanece aparentemente assintomática e avirulenta. Se os mecanismos de defesa da planta contra-atacam os fatores de virulência fúngica, o fungo morrerá. Por outro lado, se a planta sucumbe à virulência do fungo, uma relação planta-patógeno levaria à doença das plantas. O fato de muitos endófitos poderem ser patógenos latentes, fazem com que estes possam ser influenciados por certas condições intrínsecas ou ambientais para expressar fatores que levam à patogenicidade.

A colonização no aspecto endófito-patógeno não depende apenas dos mecanismos de adaptação dos organismos envolvidos, órgãos, estádios de desenvolvimento da planta, mas também na virulência inata, porém variável do endófito, na resposta de defesa do hospedeiro e nas condições ambientais, isto é, no triângulo da doença.

Além disso, este complexo pode proporcionar uma situação sinérgica entre os metabólitos produzidos pelas plantas e seus hospedeiros podendo gerar ações que reduzem a herbivoria dos tecidos vegetais, podendo agir como controladores de patógenos, insetos pragas e outras fitossanidades (KUSARI *et al.*, 2012).

Os fungos endofíticos auxiliam as plantas na adaptação aos mais variados ambientes (secos, frios, etc.) e induzem tolerância aos fatores de estresse (baixo pH, salinidade, presença de metais pesados) e a resistência ao ataque de insetos herbívoros / fitopatógenos, por meio da produção de metabólitos funcionais (ZHANG *et al.*, 2006). Eles vivem em mutualismo com plantas hospedeiras, onde recebem nutrientes e produzem compostos químicos, como enzimas, fitohormônios, alcalóides e antibióticos, entre outros, que protegem e auxiliam a planta em certas condições de estresse e ainda podem produzir compostos de importância biotecnológica (AZEVEDO *et al.*, 2000).

A maioria dos fungos tem vias bioquímicas peculiares, resultando em metabólitos característicos ou específicos de uma determinada espécie, embora as produções destes metabólitos dependam de vários fatores. Os produtos destas vias metabólicas incluem fármacos importantes, tais como penicilina e estatinas ou substâncias tóxicas como aflatoxinas (KELLER *et al.*, 2005). Assim, os micro-organismos endofíticos isolados de plantas são um recurso para a produção de metabólitos secundários, uma vez que, um único endófito pode ser capaz de produzir uma variedade de metabólitos bioativos (RAMASAMY *et al.*, 2010). As

substâncias bioativas de fungos são geralmente derivadas do metabolismo secundário, por meio do qual geram compostos de baixo peso molecular pertencentes a diferentes classes químicas, tais como, policetídeos, alcalóides, terpenos, peptídeos não ribossomais (CANUTO *et al.*, 2012). O papel fisiológico desempenhado pelos fungos endofíticos estimulou as investigações químicas e biológicas para aplicações na agricultura, medicina e indústria alimentar (ZHAO *et al.*, 2010).

Aplicações Biotecnológicas

A indústria agroquímica vem investindo na descoberta de produtos naturais bioativos para o controle de pragas e doenças de plantas, devido à biodegradabilidade e baixa toxicidade desse tipo de substância (DAYAN *et al.*, 2009). O potencial biológico dos fungos, onde o espectro de ação é amplo, é suportado pela descoberta de pelo menos 1.500 compostos produzidos por esses que apresentam atividade antifúngica, antibacteriana ou anticancerígena (KELLER *et al.*, 2005). Embora a maioria desses estudos seja direcionada para uso clínico, muitas substâncias fúngicas já tinham atividades biológicas de interesse para a agricultura (ZHANG *et al.*, 2006).

Uma das características interessantes em relação aos fungos endofíticos é promover o crescimento das plantas pela síntese de fitohormônios e fixação de nitrogênio. Esses fungos podem promover o crescimento das plantas modificando a estrutura e a fisiologia da planta, positivamente, em troca da extração de nutrientes para si próprio (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

Os micro-organismos endofíticos são uma excelente fonte para a exploração de metabólitos secundários com potencial biotecnológico, pois estão diretamente relacionados à planta hospedeira. O isolamento e a utilização desses metabólitos nos bioensaios são uma alternativa na busca por produtos naturais bioativos para controle biológico e produção de produtos farmacêuticos (AZEVEDO *et al.*, 2000). Neste contexto, vários estudos mostram a importância da investigação nesta área e a eficiência dos metabólitos secundários que atuam principalmente como inibidores de patógenos.

Use *et al.* (2014) demonstraram a importância da prospecção de metabólitos. O fungo endofítico *Pestalotiopsis virgatula* foi isolado da planta medicinal *Vitex negundo* L. e seu extrato parcialmente purificado foi testado contra estirpes de células de câncer de mama humano e estirpes de bactérias multirresistentes. Os resultados deste estudo mostraram que o extrato fúngico apresentou atividade antibacteriana eficaz contra estirpes de *S. aureus* resistente a múltiplos fármacos, bem como, atividade citotóxica intensa contra células humanas de cancro da mama.

Garcia *et al.* (2012b) investigaram o potencial biotecnológico de extratos brutos de isolados de fungos endofíticos obtidos de *Sapindus saponaria* testando-os contra cinco bactérias patogênicas. A atividade antibacteriana dos extratos obtidos a partir das quatro

estirpes endofíticas, foi promissora, uma vez que, todos eles inibiram o crescimento de pelo menos uma de todas as bactérias avaliadas. Estes resultados mostraram que os isolados de *S. saponaria* possuem potencial biotecnológico para o controle de bactérias patogênicas testadas *in vitro*.

Polonio *et al.* (2015) obtiveram o extrato bruto do fungo endofítico *Diaporthe citri* isolado de *Mikania glomerata* (guaco) e avaliaram sua ação contra as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *S. aureus*, obtendo resultados promissores contra *S. aureus*. A análise química desse extrato revelou a presença do ácido 3-nitropropiónico, composto que pode estar envolvido em sistemas de defesa e nutrição de endófitos e plantas hospedeiras, podendo também participar do ciclo biogeoquímico do nitrogênio (POLONIO *et al.*, 2016).

Considerando a produção de metabólitos de outros gêneros de fungos endofíticos, tem-se destacado o *Phomopsis*, comumente encontrado como endófito em plantas medicinais tropicais, conforme relatado por Garcia *et al.* (2012a), Orlandelli *et al.* (2012) e Rhoden *et al.* (2012). Este gênero é uma fonte biologicamente rica de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana contra vários agentes patogênicos, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* (JAYANTHI *et al.*, 2011); e também apresenta potencial para proteger as plantas de doenças fúngicas.

Li *et al.* (2012) isolaram 39 metabólitos da cepa de *Aspergillus fumigatus*, que colonizam a casca do caule de *Melia azedarach*. Destes, 16 compostos mostraram atividade antifúngica contra os fitopatógenos: *B. cinerea*, *Alternaria alternata*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Gibberella saubinetii*. Quatro metabólitos mostraram efeitos comparáveis aos fungicidas comerciais carbendazim e himexazol.

Varughese *et al.* (2012) extraiu o composto cordycepsidone isolado de *Cordyceps dipterigena*, um fungo endofítico das folhas de *Desmotes incomparabilis* que foi eficiente no controle de *G. fujikuroi*, fitopatógeno que afeta seriamente a produtividade de arroz, devido à produção excessiva de ácido giberélico, um hormônio que regula o crescimento e desenvolvimento de plantas.

O fracionamento do extrato de *Nigrospora* sp., um endófito encontrado na raiz da planta medicinal *Moringa oleifera*, levou à obtenção de griseofulvina (antibiótico comercial de uso clínico), que apresentou atividade contra seis tipos de fungos fitopatogênicos: *Botrytis cinerea*, *C. orbiculare*, *F. oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotium* (ZHAO *et al.*, 2012).

No estudo de avaliação do potencial biológico dos metabólitos de *A. fumigatus* isolado de *Melia azedarach*, Li *et al.* (2012) descobriram dois alcalóides indólicos (fumitremorgina e verruculogeno) com considerável ação inibitória do apetite para larvas de lagartas como a *Mythimna separata*.

Potencial Biotecnológico de *Colletotrichum* endofítico

O fitopatógeno do gênero *Colletotrichum* pode afetar uma ampla gama de culturas economicamente importantes, tais como, morango, café, guaraná e uva. Este fungo causa doença nas frutas, folhas e caules, aparecendo manchas escuras e necróticas e massas alaranjadas de esporos nos tecidos das plantas. No entanto, ele tem sido objeto de muita pesquisa na busca por compostos bioativos, pela sua capacidade de produzir metabólitos secundários e metabólitos secundários fitotóxicos que induzem sintomas semelhantes aos dos próprios agentes patogênicos (JIMÉNEZ-TEJA *et al.*, 2009).

É de fundamental importância estudar as diferentes espécies de *Colletotrichum*, com comportamento fitopatogênico ou endofítico, e a sua produção de metabólitos secundários com propriedades biotecnológicas. A caracterização desses metabólitos não só facilita a identificação de diferentes espécies deste gênero, mas também ajuda a entender o papel desses compostos no mecanismo de infecção desses organismos.

Existem algumas espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* mais estudados quanto à produção de metabólitos tóxicos, são elas: *C. gloeosporioides*, *C. nicotianae*, *C. lagenarium*, *C. fragariae* e *C. truncatum*. Entre essas espécies, *C. gloeosporioides* destaca-se pelo seu papel no desenvolvimento de doenças de plantas e por sua resposta quando avaliada a atividade biológica (GARCIA-PAJÓN, COLLADO, 2003). O *C. dematium*, um fungo patogênico específico de *Epilobium angustifolium* tem sido investigado como agente no controle biológico de ervas daninhas. Este patógeno provoca graves lesões necróticas nas folhas e caules de plantas infectadas. Dois flavonoides foram isolados do extrato obtido da cultura líquida filtrada do fungo com o uso de acetato de etila. Estes filtrados demonstraram um alto grau de atividade fitotóxica e antimicrobiana (GARCIA-PAJÓN, COLLADO, 2003).

Bruckart *et al.* (2004) testou a capacidade do fungo patogênico *C. gloeosporioides* em infectar e causar danos em *Salsola tragus*, considerado uma praga por ser um reservatório para vários tipos de viroses de plantas e insetos, e ter resistência a diversos tipos de herbicidas. Duas estirpes sensíveis a *S. tragus* foram testadas, sendo que uma das cepas de *C. gloeosporioides* causou grandes danos e reduções na biomassa de *S. tragus*. Os resultados revelaram a necessidade de mais estudos para elucidar a pesquisa; e que *C. gloeosporioides* pode ser um fungo promissor para o controle biológico desta praga.

O gênero *Colletotrichum* foi encontrado como fungos endofíticos majoritários em algumas espécies de plantas. Gonzaga *et al.* (2014) observou que os fungos deste gênero são abundantes na comunidade endofítica de *Phaseolus vulgaris*, e os marcadores IRAP (Polimorfismo amplificado inter-retrotransposição) e REMAP (Retrotransposição-polimorfismo amplificado por microsátélites) podem ser usados para distinguir

rapidamente *C. lindemuthianum* e outros membros de *Colletotrichum* que são frequentemente encontrados como endófitos.

Nath *et al.* (2015) examinou a planta *Rauwolfia serpentina* Benth (uma planta etnomedicinal usada em medicamentos populares no nordeste da Índia) para os fungos endofíticos e suas atividades biológicas associadas. *C. gloeosporioides* foi considerado o fungo dominante com uma frequência de colonização média de 6,8%, seguida por *Penicillium* sp. (3,8%) e *A. awamori* (2,1%), com o isolado *Penicillium* sp., mostrando uma promissora atividade hipocolesterolêmica.

Assim, o gênero *Colletotrichum* mostrou possuir algumas propriedades biotecnológicas importantes na condição endofítica. Um estudo realizado por Inácio *et al.* (2006) com folhas saudáveis de *Cryptocarya mandioccana*, planta típica da Mata Atlântica brasileira, levou ao isolamento de 15 fungos endofíticos, entre eles a espécie *C. gloeosporioides*. A pesquisa mostrou que as substâncias isoladas de *C. gloeosporioides* endofíticos tem atividade antifúngica significativa contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Os autores sugerem que a atividade exibida pelos metabólitos secundários de *C. gloeosporioides* está relacionada à função protetora da planta hospedeira contra os fitopatógenos, demonstrando a importância ecológica do estudo desse tipo de micro-organismo endofítico.

Lu *et al.* (2000) mostraram que quatro esteróides antimicrobianos isolados de fungos endofíticos *Colletotrichum* sp. de *Artemisia annua*, apresentaram atividades fungistáticas contra a cultura de fungos patogênicos *Phytophthora capsici*, *R. cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* e *Helminthosporium sativum*.

Lakshmi & Selvi (2013) isolaram duas espécies de fungos endofíticos (EFB01 e EFB02) de folhas de *Barringtonia acutangula*, uma planta medicinal, e realizaram a extração de metabólitos secundários. Os extratos foram selecionados para teste contra linhagens de células HT-29 de câncer de cólon humano. A estirpe EFB01 foi identificada como *C. gloeosporioides* e apresentou 52% de citotoxicidade contra as células cancerosas, efetivamente com uma maior porcentagem do que a cepa EFB02, não identificada no artigo.

Hussain *et al.* (2014) encontraram um novo metabólito, denominado ácido "colletonoico", produzido pelo fungo endofítico *Colletotrichum* sp.. Este novo composto isolado foi testado contra *B. megaterium*, *Microbotryum violaceum* e *Chlorella fusca*, exibindo boa atividade antibacteriana, antifúngica e algicida.

Bin *et al.* (2014), realizaram o isolamento, caracterização e atividade bacteriana anti-múltipla resistente a fármacos (MDR) do *Colletotrichum* endofítico isolado da planta de mangue, *Aegiceras corniculatum*. *Colletotrichum* e *Pestalotiopsis* foram os gêneros mais frequentes, representando as frequências de colonização (CF) de 29,5 e 37,7%. O *Colletotrichum* endofítico inibiu duas bactérias patogênicas humanas *K. pneumonia* e *A. baumannii* MDR. A concentração

inibitória mínima (CIM) do extrato de *Colletotrichum* contra *K. pneumonia* MDR foi de 4 µg/mL e contra *A. baumannii* MDR foi de 0,5 µg/mL.

De acordo com Chithra *et al.* (2014) muitos fungos endofíticos têm sido relatados com potencial biossintético para produzir idênticos ou semelhantes metabólitos presentes em plantas hospedeiras. Esses autores estudaram a produção de piperina por *C. gloeosporioides* endofíticos isolados de *Piper nigrum*. A planta hospedeira *P. nigrum*, uma planta de Piperaceae, é muito notável devido à presença do alcalóide piperina que possui amplas propriedades bioativas, que vão desde atividades antimicrobianas, antidepressivas, antiinflamatórias e antioxidantes, a atividades anticancerígenas.

Ferreira *et al.* (2015) investigaram a comunidade de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Carapa guianensis* e seu potencial para a produção de compostos bioativos. Um total de 162 isolados de fungos endofíticos foram obtidos e identificados por métodos moleculares. Estes isolados foram classificados em 35 táxons diferentes. Os colonizadores mais frequentemente recuperados de *C. guianensis* foram: *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* cf. *mayteni* e *Pestalotiopsis* sp.. A comunidade fúngica apresentou uma riqueza moderada, mas altos índices de diversidade e de uniformidade. *Colletotrichum* sp. e *Pilidiella wangiensis* apresentaram atividade antibacteriana seletiva; *D.* cf. *mayteni* e *Endomelanconiopsis endophytica* apresentaram alta atividade contra as formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*; e *Colletotrichum* sp., *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp. e *D. melonis* foram capazes de inibir a proliferação do vírus da febre amarela. Os resultados sugerem que as plantas que vivem na floresta tropical, como a região do "hotspot" amazônico, podem viver em simbiose com comunidades ricas, escondidas e subestimadas de fungos endofíticos, que merecem protocolos e / ou leis específicas para manter sua futura conservação. A capacidade desses fungos endofíticos para produzir compostos bioativos pode ser parte de sua defesa química e resposta adaptativa para sobreviver e colonizar o hospedeiro vegetal em ambiente selvagem. Consequentemente, estas comunidades fúngicas podem proporcionar uma fonte de moléculas bioativas, incluindo aquelas capazes de inibir ou controlar doenças tropicais negligenciadas.

Radiastuti *et al.* (2017) identificaram 13 isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos de diferentes partes de *Cinchona calisaya* Wedd, uma planta medicinal utilizada no tratamento da malária, plantadas no Centro de Pesquisa de Plantas de Chá e Quina, na Indonésia, empregando análise molecular da região ITS (região espaçadora interna) do rDNA (DNA ribossômico), análise da presença do alcalóide cinchona (quinina) e características antibacterianas. Dos 13 isolados identificados, 6 são de frutos, 5 de folhas, 1 de ramo e 1 de raiz. Na análise filogenética, foram identificados como *Colletotrichum* sp, *C. aegnigma*, *C. cordylinicola*, *C. arxii* e *C. karstii*. Destes, o *Colletotrichum* sp. M1

(folha), M3 (ramo), M8 (frutos) e *C. karstii* M5 (frutos) foram identificados como potenciais alcalóides quinina; e cinco estirpes de *Colletotrichum* spp. com atividade antibacteriana contra *S. aureus* e nove *Colletotrichum* spp. contra *E. coli*. Os fungos endofíticos *Colletotrichum* estudados não só poderiam produzir alcalóides quinina, mas também poderia produzir outros compostos bioativos como antibacterianos.

Suryavanshi *et al.* (2017) relataram a micossíntese de nanopartículas de enxofre (SNPs) e nanopartículas de óxido de alumínio (AINPs) de *Colletotrichum* sp. endofítico e avaliaram a atividade antimicrobiana dessas nanopartículas, os óleos essenciais extraídos de *Citrus medica* e *Eucalyptus globulus* e os óleos essenciais nanofuncionalizados (combinação dos óleos essenciais e as nanopartículas) contra agentes patogênicos alimentares, tais como, *Chromobacterium violaceum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *F. oxysporum* e *A. flavus*. A atividade de SNPs e AINPs também foi avaliada em combinação com tetraciclina, oxitetraciclina, gentamicina, fluconazol, cetoconazol, anfotericina B e nistatina. Os resultados mostraram que a micossíntese de SNPs e AINPs é simples e rentável. Ambas as nanopartículas apresentaram uma atividade antimicrobiana significativa contra os agentes patogênicos alimentares testados. Os óleos nanofuncionalizados mostraram atividade antimicrobiana significativa em comparação com as nanopartículas e os óleos essenciais testados separadamente. Além disso, os SNPs e as AINPs demonstraram atividade sinérgica com antibióticos comercialmente disponíveis tais como tetraciclina, oxitetraciclina, gentamicina, fluconazol, cetoconazol, anfotericina B e nistatina. Os SNPs e os AINPs sintetizados biologicamente podem ser usados como novo agente antimicrobiano em combinação com óleos essenciais, o que ajudará na prevenção de patógenos transmitidos pelos alimentos. Além disso, pode servir como uma forma eficiente de aumentar a biodisponibilidade.

4. CONCLUSÃO

As aplicações e estudos de fungos endofíticos estão aumentando e se intensificando com o objetivo de comprovar a eficácia dos mesmos. Esses micro-organismos tem comprovadamente um elevado potencial na promoção do crescimento e na resistência à herbivoria, redução de estresses bióticos e abióticos, auxílio na fixação de nitrogênio, além da produção de substâncias economicamente importantes principalmente para as indústrias farmacêutica, química e agrícola. Por estas vantagens, a utilização de fungos endofíticos em várias práticas é uma alternativa viável e sustentável. Também é de fundamental importância o estudo das diferentes espécies de *Colletotrichum*, quanto a sua interação com a planta hospedeira e produção de metabólitos secundários. A caracterização desses metabólitos não só facilita a identificação de diferentes espécies deste gênero, mas também ajuda a entender o

papel dessas moléculas no mecanismo de infecção desses micro-organismos, além da sua aplicação em indústrias biotecnológicas.

5. AGRADECIMENTOS ou FINANCIAMENTO

Agradecemos ao Banco Santander pela bolsa concedida ao professor Doutor João Alencar Pamphile; a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado (P. Rosseto), doutorado (J.C. Polonio) e CAPES/PNPDU-UEM pela bolsa de pós-doutorado (A.T. Costa) e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [01] ALY, A.H. *et al.* Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.90, n.6, p.1829-1845, 2011.
- [02] AZEVEDO, J.L. *et al.* Endophytic Microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3, n.1, p.40-65, 2000.
- [03] AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI BN, DESHMUKH SK, editors. *Fungi: multifaceted microbes*. New Delhi: Anamaya Publishers, 189-207p, 2007.
- [04] AZEVEDO, J.A. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: KHARWAR, RN *et al.* (eds.). *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, Springer India, 17-22p, 2014.
- [05] BIN, G. *et al.* Isolation, characterization and anti-multiple drug resistant (MDR) bacterial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant, *Aegiceras corniculatum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.13, n.4, p.593-599, 2014.
- [06] BRUCKART, W. *et al.* Differential susceptibility of Russian thistle accessions to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biological Control*, v.30, n.2, p.306-311, 2004.
- [07] CANUTO, K.M. *et al.* *Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura*. Embrapa, *Documentos 154*. 2012.
- [08] CHITHRA, S. *et al.* Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine*, v.21, n.4, p.534-540, 2014.
- [09] DAYAN, F.E. *et al.* Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.17, p.4022-4034, 2009.
- [10] ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. *Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia*, 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 638p, 2010.
- [11] FELBER, A.C. *et al.* Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordó and Concord cv. *Annals of Microbiology*, v. 66, p.765-775, 2016.
- [12] FERREIRA, M.C. *et al.* Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.59, p.36-44, 2015.

- [13] GARCIA, A. *et al.* Diversity of foliar endophytic fungi from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biological Research*, v.45, n.2, p.149-158, 2012a.
- [14] GARCIA, A. *et al.* Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v.2, n.10, p.035-040, 2012b.
- [15] GARCIA-PAJÓN, C.M., COLLADO, I.G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Natural Product Reports*, v.20, p.426-431, 2003.
- [16] GONZAGA, L.L. *et al.* Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology*, v.118, n.2, p.485-496, 2014.
- [17] HUSSAIN, H. *et al.* Seimatoric acid and colletonoic acid: Two new compounds from the endophytic fungi, *Seimatosporium* sp. and *Colletotrichum* sp. *Chinese Chemical Letters*, v.25, n.12, p.1577-1579, 2014.
- [18] INÁCIO, M.L. *et al.* Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides* an endophytic fungus in *Cryptocarya mandiocana* Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.34, n.11, p.822-824, 2006.
- [19] JALGAONWALA, R.B. *et al.* A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, v.1, n.2, p.21-32, 2011.
- [20] JAYANTHI, G. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. GJM07 isolated from *Mesua ferrea*. *International Journal of Current Science*, v.1, p. 85-90, 2011.
- [21] JIMÉNEZ-TEJA, D. *et al.* Lipase-catalyzed resolution of 5-acetoxy-1,2-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene. Application to the synthesis of (+)-(3R,4S)-cis-4-hydroxy-6-deoxyscytalone, a metabolite isolated from *Colletotrichum acutatum*. *Tetrahedron*, v.65, p.3392-3396, 2009.
- [22] KELLER, N.P. *et al.* Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.12, p.937- 947, 2005.
- [23] KUSARI, S. *et al.* Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, v.19, n.7, p.792-798, 2012.
- [24] LAKSHMI, P.J., SELVI, V.K. Anticancer potentials of secondary metabolites from endophytes of *Barringtonia acutangula* and its molecular characterization. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.2, n.2, p.44-55, 2013.
- [25] LI, X-J. *et al.* Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant and toxic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, n.13, p.3424-3431, 2012.
- [26] LU, H. *et al.* New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, v.151, n.1, p.67-73, 2000.
- [27] MENDES, R., AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA L, MALOSSO E, YANO-MELO AM (editors) *Micologia: avanços no conhecimento*. Brazilian Society Microbiology, p.129-140, 2007.
- [28] NATH, A. *et al.* Biological Activity of Endophytic Fungi of *Rauwolfia serpentina* Benth: An Ethnomedicinal Plant Used in Folk Medicines in Northeast India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*, v.85, n.1, p.233-240, 2015.
- [29] ORLANDELLI, R.C. *et al.* Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research*, v.11, n.2, p.1575-1585, 2012.
- [30] PEIXOTO-NETO, P.A.S. *et al.* Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biociência: Ciência & Desenvolvimento*, v.29, p.62-76, 2002.
- [31] POLONIO, J.C. *et al.* Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. *Genetics and Molecular Research*, v.14, n.3, p.7297-309, 2015.
- [32] POLONIO, J.C. *et al.* 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. *Fungal Biology*, v.120, n.12, p.1600-1608, 2016.
- [33] RADIASTUTI, N. *et al.* Endophytic *Colletotrichum* spp. from *Cinchona calisaya* Wedd. and its potential quinine production as antibacterial and antimalaria. *AIP Conference Proceedings* 1813, 020022, 2017, doi: 10.1063/1.4975960.
- [34] RAMASAMY, K. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. *Phytotherapy Research*, v.24, n.5, p.640-643, 2010.
- [35] RHODEN, S.A. *et al.* Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). *Genetics and Molecular Research*, v.11, n.3, p.2513-2522, 2012.
- [36] SANTOS, L.S. *et al.* A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. *SaBiosÇ Revista Saúde e Biologia*, v.8, n.1, p.92-101, 2013.
- [37] SURYAVANSHI, P. *et al.* *Colletotrichum* sp. mediated synthesis of sulphur and aluminium oxide nanoparticles and its in vitro activity against selected food-borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.03.038.
- [38] STIERLE, A. *et al.* Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science*, v.260, p.214-216, 1993.
- [39] STROBEL, G.A., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, n.4, p.491-502, 2003.
- [40] USE, A. *et al.* Cytotoxic and antibacterial activities of secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* VN2. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, v.4, n.1, p.107-115, 2014.
- [41] VARUGHESE, T. *et al.* Antifungal depsidone metabolites from *Cordyceps dipetrigena*, an endophytic fungus antagonistic to the phytopathogen *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron Letters*, v.53, n.13, p.1624-1626, 2012.
- [42] ZHANG, H.W. *et al.* Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, v.23, p.753-771, 2006.
- [43] ZHAO, J. *et al.* Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In: MENDEZ-VILAS, A. (editor). *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Badajoz: Formatex Research Center, v.1, p.567-576, 2010.
- [44] ZHAO, J.H. *et al.* Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.28, n.5, p.2107- 2112, 2012.
- [45] ZOU, W.X. *et al.* Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal Natural Product*, v.63, n.11, p.1529-1530, 2000.