

Identificação de fungos endofíticos em *Hamelia patens* Jacq. e avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos fúngicos

Identification of endophytic fungi in *Hamelia patens* Jacq. and evaluation of the antimicrobial potential of fungal extracts

Identificación de hongos endófitos en *Hamelia patens* Jacq. y evaluación del potencial antimicrobiano de extractos fúngicos

Recebido: 08/05/2023 | Revisado: 17/05/2023 | Aceitado: 18/05/2023 | Publicado: 23/05/2023

Cristieli Rosa do Amaral

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-4369-6455>
Centro Universitário Campos de Andrade, Brasil
E-mail: dj_cristielyamaral@hotmail.com

Edson José Mazarotto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4893-266X>
Centro Universitário do Paraná, Brasil
E-mail: edmazarotto@gmail.com

Paulo César Gregório

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8954-2855>
Universidade Federal do Paraná, Brasil
Centro Universitário do Paraná, Brasil
E-mail: paulocezargregorio@gmail.com

Giane Favretto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7522-7934>
Centro Universitário Internacional, Brasil
E-mail: gianefavretto@gmail.com

Resumo

Objetivo: O objetivo desse estudo foi identificar os gêneros de fungos endofíticos associados às sementes de *Hamelia patens* e verificar o potencial antimicrobiano dos extratos dos isolados selecionados. **Método:** Para isso, foi sugerido as classes dos compostos produzidos por cromatografia de camada delgada (CCD), e avaliada a atividade biológica dos extratos fúngicos frente a linhagens de fungos fitopatogênicos, levedura, bactérias gram negativas e gram positivas. **Resultados:** Foram identificados 8 gêneros fúngicos associados as sementes como endófitos. O gênero com maior incidência foi *Diaporthe* com 60%. Houve inibição dos fitopatógenos em todos os testes *in vitro*, com exceção para o teste de metabólitos voláteis contra *Fusarium oxysporum*. Na avaliação do antibiograma, os isolados HP3, HP5 e HP6 se destacaram na inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. A partir de ensaio de CCD (Cromatografia de Camada Delgada) foram evidenciados compostos bioativos como terpenóides, compostos fenólicos e cumarinas tanto no micélio quanto no caldo fermentado dos isolados fúngicos. **Discussão:** Foi verificada a inibição dos patógenos em todos os ensaios contra fitopatógenos, exceto para *F. oxysporum* no teste de metabólitos voláteis. No antibiograma, foi verificado a inibição das bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. pyogenes*. Entre as classes de compostos sugeridos por CCD no caldo fermentado e micélio, estão terpenóides, cumarinas e compostos fenólicos. **Conclusão:** Os dados obtidos neste estudo trazem informações inéditas quanto à diversidade fúngica associada às sementes como endófitos, sendo o primeiro relato da associação de fungos endofíticos em semente de *H. patens*.

Palavras-chave: *Diaporthe*; Bioprospecção; Controle biológico.

Abstract

Objective: The objective of this study was to identify the endophytic fungal genera associated with *Hamelia patens* seeds and to verify the antimicrobial potential of the extracts of the selected isolates. **Method:** For this, the classes of compounds produced by thin layer chromatography (TLC) were suggested, and the biological activity of fungal extracts against strains of phytopathogenic fungi, yeast, gram-negative and gram-positive bacteria was evaluated. **Results:** 8 fungal genera associated with the seeds were identified as endophytes. The genus with the highest incidence was *Diaporthe* with 60%. There was inhibition of phytopathogens in all *in vitro* tests, except for the volatile metabolites test against *Fusarium oxysporum*. In the antibiogram evaluation, the isolates HP3, HP5 and HP6 stood out in the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. From CCD assay (Thin Layer Chromatography) bioactive compounds such as terpenoids, phenolic compounds and coumarins were evidenced both in the mycelium and in the fermented broth of the fungal isolates. **Discussion:** Inhibition of the

pathogens was verified in all the assays against phytopathogens, except for *F. oxysporum* in the volatile metabolites test. In the antibiogram, inhibition of *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *S. pyogenes* bacteria was verified. Among the classes of compounds suggested by CCD in the fermented broth and mycelium are terpenoids, coumarins and phenolic compounds. Conclusion: The data obtained in this study bring unprecedented information regarding the fungal diversity associated with seeds as endophytes, being the first report of the association of endophytic fungi in *H. patens* seeds.

Keywords: *Diaporthe*; Bioprospecting; Biological control.

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue identificar los géneros fúngicos endófitos asociados a las semillas de *Hamelia patens* y verificar el potencial antimicrobiano de los extractos de los aislados seleccionados. Método: Para ello, se sugirieron las clases de compuestos producidos por cromatografía en capa fina (CCF), y se evaluó la actividad biológica de los extractos fúngicos frente a cepas de hongos fitopatógenos, levaduras, bacterias gram negativas y gram positivas. Resultados: Se identificaron ocho géneros fúngicos asociados a las semillas como endófitos. El género con mayor incidencia fue *Diaporthe* con un 60%. Hubo inhibición de los fitopatógenos en todas las pruebas in vitro, excepto en la prueba de metabolitos volátiles contra *Fusarium oxysporum*. En la evaluación del antibiograma, los aislados HP3, HP5 y HP6 destacaron en la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. A partir del ensayo CCD (cromatografía en capa fina) se evidenciaron compuestos bioactivos como terpenoides, compuestos fenólicos y cumarinas tanto en el micelio como en el caldo fermentado de los aislados fúngicos. Discusión: Se verificó la inhibición de los patógenos en todos los ensayos contra fitopatógenos, excepto para *F. oxysporum* en el ensayo de metabolitos volátiles. En el antibiograma, se verificó la inhibición de las bacterias *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes*. Entre las clases de compuestos sugeridos por el CCD en el caldo fermentado y en el micelio se encuentran los terpenoides, las cumarinas y los compuestos fenólicos. Conclusión: Los datos obtenidos en este estudio aportan información sin precedentes sobre la diversidad fúngica asociada a semillas como endófitos, siendo el primer informe de la asociación de hongos endófitos en semillas de *H. patens*.

Palabras clave: *Diaporthe*; Bioprospección; Control biológico.

1. Introdução

A *Hamelia patens* Jacq., pertence à família Rubiaceae, sendo encontrada em quase todas as regiões do Brasil. Suas flores, frutos e ramos jovens, são utilizados na medicina popular para tratar diversas patologias, como infecções, problemas de pele, diarreia, febre, dores pós-parto e problemas menstruais (Marchioretto & Schnorr, 2014). A espécie apresenta um grande potencial farmacológico, por ser rica em compostos bioativos como efedrina, flavonas, taninos, rutina e alcalóides (Ahmad et al., 2012). Além disso, apresenta uma alta quantidade de ácido clorogênico, substância conhecida devido sua atividade antimicrobiana (Paz et al., 2018).

Pesquisas revelaram o potencial terapêutico da planta, no controle de fungos oportunistas como *C. albicans* e *Aspergillus* sp (Abubacker et al., 2013). Também apresentou atividade citotóxica relevante frente a células do adenocarcinoma cervical e carcinoma escamoso do útero (Mena-Rejon et al., 2009).

Segundo Strobel (2003), as plantas são hospedeiras de uma infinidade de microrganismos endofíticos que colonizam os hospedeiros sem causar dano, habitando raízes, folhas, frutos, flores e caule. Os endófitos estabelecem uma relação simbiótica, recebendo nutrientes da planta e em troca fornecem proteção contra patógenos, insetos e herbívoros, além de induzir a produção de metabólitos secundários (Canuto et al., 2012; Strobel, 2003).

Os endófitos de maior relevância são os fungos, pois possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários similares ou idênticos aos de seus hospedeiros (Zhao et al., 2010). O fungo *Taxomyces andreanae*, isolado como endófito da casca da árvore *Taxus brevifolia* Nut., sintetiza o mesmo diterpenóide que a planta, conhecido como Taxol, utilizado como antitumoral (Mussi-Dias et al., 2012). Novos estudos comprovaram que outro gênero fúngico, o *Stegolerium kukenani*, isolado da planta *Stegolepsis guianensis* da família Rubiaceae, também produz o Taxol, o que foi uma grande descoberta pois, para se obter 1kg de Taxol, são utilizadas cerca de mil árvores com cem anos de idade. Devido a isso, essa espécie quase entrou em extinção (Stierle et al., 1993).

Foram isolados fungos endofíticos do gênero *Xylaria* sp., da planta *Palicourea marcgravii* da família Rubiaceae, que apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*

(Cafêu et al., 2005). Os endófitos *Papulaspora immersa* e *Arthrimum state of Apiospora montagnei* Sacc., isolados da raiz de *Smallanthus sonchifolius*, produziram metabólitos com atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (Ramos et al., 2010).

Os fungos endofíticos são uma fonte de recursos naturais inexplorada, com potencial para o avanço biotecnológico, podendo ser aplicado em diversas áreas de interesse como medicina, agricultura e principalmente na indústria farmacêutica na descoberta de novas substâncias. Frente a isso, o objetivo desse estudo foi identificar os gêneros de fungos endofíticos associados às sementes de *H. patens* e verificar o potencial antimicrobiano dos extratos obtidos dos isolados selecionados.

2. Metodologia

2.1 Origem das sementes

As sementes foram obtidas a partir de frutos maduros, coletados na região de Balsa Nova-PR, Brasil (25° 35' 02" S 49° 38' 09" O). Os frutos foram macerados em peneira sobre água corrente, para obtenção das bagas com sementes. Após, foram secas em papel filtro e armazenadas no Centro Universitário Campos Andrade, para posterior utilização.

2.2 Isolamento de fungos endofíticos

Foram utilizadas 150 bagas de sementes de *H. patens*, imersas em álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 1% por 4 minutos, álcool 70% por 30 segundos, e lavadas em água destilada esterilizada. As bagas ficaram sobre papel filtro esterilizados até secagem (Araújo et al., 2002).

Após a desinfecção, foi realizada a semeadura das bagas em placas de Petri contendo meio ágar-batata-dextrose (BDA - HiMedia). Foram colocadas cinco bagas por placa e posteriormente incubadas a 20 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. Lâminas foram preparadas com micélio dos fungos e gotas de lactoglicerol azul de algodão, e comparadas com literatura para identificação dos gêneros (Barnett & Hunter, 1987).

2.3 Caracterização morfológica dos fungos endofíticos

Foram cortados dois cubos de aproximadamente 1cm² de BDA camada alta, e colocados nas bordas de uma lâmina de vidro, no interior de placas de Petri esterilizadas. Os fungos foram inoculados nas laterais do cubo, que por sua vez foi coberto por uma lamínula esterilizada, e a placa mantida em incubadora do tipo B.O.D de 7 a 14 dias, a 24 °C. Após esse período as lamínulas foram retiradas e colocadas sobre uma lâmina contendo lactoglicerol azul de algodão e foram observadas as estruturas dos endófitos em microscópio óptico (Carl Zeiss- Axiolab. A1) (Kern & Blevins, 1999).

2.4 Linhagens patogênicas e isolados endofíticos

Foram selecionados para os testes, os fungos fitopatogênicos, *Fusarium solani* (DET-13) e *Fusarium oxysporum* (DET-25). Quanto às bactérias patogênicas, foram utilizadas cepas ATCC das espécies, *P. aeruginosa* (10145), *S. aureus* (12600), *S. pyogenes* (12344), *E. coli* (11755), *K. pneumoniae* (13883) e a levedura *C. albicans* (10231).

Entre os fungos endofíticos isolados de *H. patens*, foram selecionados sete isolados de *Diaporthe* sp. (HP1 a HP7) e um isolado de *Colletrotrichum* sp., (HP8) para avaliação nos testes de inibição e produção dos extratos.

2.5 Pareamento de Cultura

Foram retirados discos de 5 mm das bordas das culturas dos isolados endofíticos crescidos em BDA por 7 dias, bem como dos fitopatógenos. Os discos foram pareados a 2 cm da borda de placas de Petri de 90 mm, contendo meio BDA. O

ensaio foi realizado em triplicata e incubado por 7 dias a 24 °C. O controle contou apenas com o disco do patógeno (Mariano, 1993).

2.6 Metabólitos voláteis

Na avaliação de metabólitos voláteis, foram inoculados discos com micélio ativo dos endófitos e dos patógenos, individualmente no centro de placas de Petri contendo meio BDA. Então, as placas foram sobrepostas e unidas por Parafilm® e incubadas por 7 dias a 24 °C. O ensaio foi realizado em triplicatas e o controle recebeu discos do patógeno em ambas as placas (Dennis & Webster, 1971).

2.7 Metabólitos não voláteis

Para avaliar a produção de metabólitos não voláteis, discos de celofane estéreis foram colocados sobre a superfície de placas de Petri contendo meio BDA. Foram inoculados discos contendo micélio dos endófitos no centro da placa, sobre o celofane e incubados por 4 dias a 24 °C em triplicatas. O controle recebeu apenas discos de BDA. Após esse período, o celofane foi removido e inoculados discos dos patógenos no centro, retornando para a B.O.D por 7 dias a 24 °C (Mariano, 1993).

2.8 Obtenção do meio fermentado

Foi inoculado três fragmentos de 5 mm dos isolados endofíticos, em frascos estéreis Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de caldo batata-dextrose (BD) (Souza et al., 2004). Os frascos foram incubados em incubadora do tipo shaker por 10 dias a temperatura de 24 °C sob agitação constante de 120 rpm. Após o cultivo, o meio foi filtrado a vácuo em funil de Büchner para separação do micélio e em membrana Millipore de 0,22 µm. O meio fermentado foi armazenado a 4 °C para posterior extração dos metabólitos.

2.9 Extração dos metabólitos

Para obtenção do extrato, o volume final do meio fermentado foi acrescido da mesma quantia de acetato de etila e colocado em agitador magnético por 15 minutos. Após a agitação, o material foi colocado em funil de separação para obtenção da fase aquosa e repetiu-se novamente o processo. Posteriormente, a fase aquosa foi seca com auxílio de evaporador rotativo a 45 °C (Buatong et al., 2011).

2.10 Cromatografia de Camada Delgada

Para realização da CCD, o extrato seco foi ressuscitado em 1 ml de metanol e com o auxílio de um capilar, foram impregnadas as amostras em placas de sílica (Macherey-Nagel®). As placas foram colocadas em cuba de vidro contendo os solventes específicos (fase móvel) para cada classe de composto, seguido da adição do revelador (Quadro 1).

Quadro 1 - Marcha química em CCD.

| Classe | Fase Móvel | Revelador | Resultado esperado | Metodologia |
|---------------------------------|--|--|--|--------------------------------|
| Esteroides e Triterpenos | Tolueno:Acetato de etila (93:7) | Vanilina Sulfúrica (1%) | Presença de banda azul-violácea e/ou verde (a olho nu) Presença de banda marrom escura (polifenóis) | Wagner, Bladt & Zgainski, 1996 |
| Flavonoides e Taninos | Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26) | Reativo de NEU (Flavonoide) | Presença de banda verde e/ou amarela e/ou laranja fluorescente e/ou castanha (sob luz UV – 254 nm) | Wagner, Bladt & Zgainski, 1996 |
| | | Cloreto férrico (Taninos e Polifenóis) | Presença de banda azul (taninos hidrolisados) e/ou verde escura (taninos condensados) Presença de banda castanha escura a preta (polifenóis) (a olho nu) | |
| Alcaloides | Clorofórmio:MeOH (95:5) universo amônio | Dragendorff | Presença de banda de coloração tijolo (a olho nu) | Valente et.al, 2006 |
| Cumarinas | Tolueno:Acetato de etila (80:20) | Reativo de NEU e NaOH | Presença de banda azul fluorescente sob luz UV (254 nm) que se intensifica com a adição de NaOH | Miguel, 2003 |

Fonte: Autoria própria (2003).

2.11 Antibiograma

As colônias bacterianas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), na escala 0,5 Macfarland. Foi utilizado o swab para espalhar a solução em toda a placa de Petri de 150 mm, contendo meio ágar Muller-Hinton. Discos de papel filtro autoclavados, foram impregnados com o 25 µl do extrato dos isolados fúngicos. Para controle negativo, foi utilizado acetato de etila PA e para controle positivo foi utilizado Gentamicina e Anfotericina B. Os discos foram semeados nas placas em triplicatas e incubados em estufa a 37 °C por 24 horas, para posterior medição dos halos de inibição (Tortora, et al., 2017).

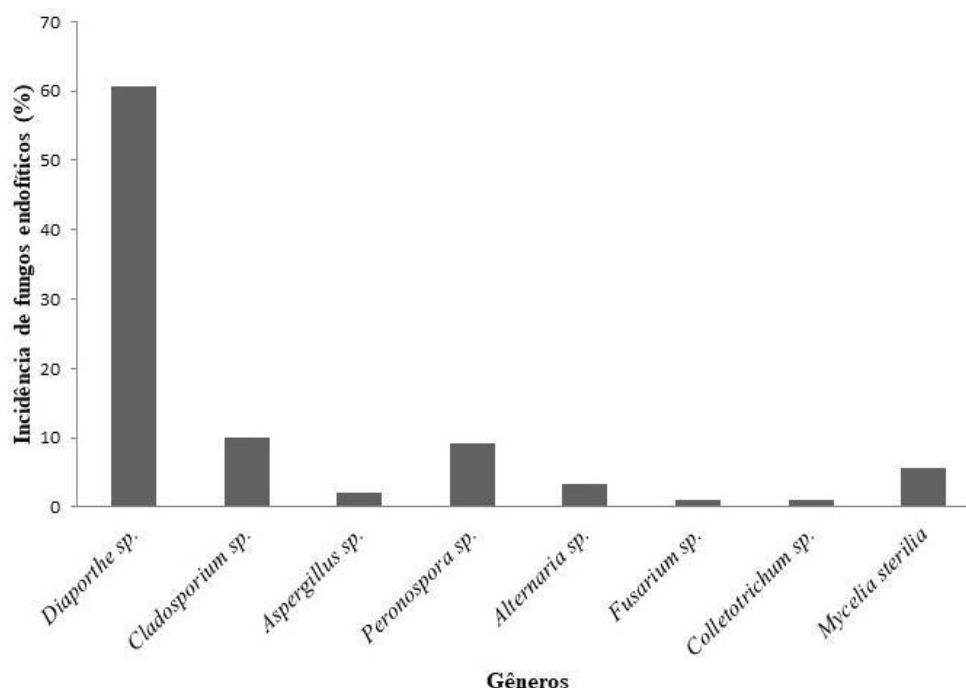
2.12 Análise estatística

Para determinar as diferenças significativas entre os resultados obtidos em cada experimento, foi realizada One-way ANOVA (análise de variância) seguido pelo teste de Tukey como Post Hoc com $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o software SISVAR versão 5.6 build 86 (Ferreira, 2011).

3. Resultados

Foram identificados sete gêneros de fungos endofíticos, associados às sementes de *H. patens*: *Diaphorte* sp., *Cladosporium* sp., *Peronospora* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. (Figura 1). O gênero *Diaphorte* apresentou maior incidência nas sementes (60,6%), seguidos dos gêneros *Cladosporium* (10%) e *Peronospora* (9,3%).

Figura 1 - Incidência de fungos endofíticos (%) em sementes de *H. patens*, após 7 dias, em meio BDA a 24 °C.



Fonte: Autoria própria (2003).

Houve variação no potencial de controle do crescimento de fungos fitopatogênicos pelos isolados endofíticos, de acordo com os testes avaliados. No pareamento de culturas, todos os endófitos inibiram o crescimento de *F. oxysporum*, no entanto, para *F. solani* não houve inibição pelos isolados HP7 e HP8 (Tabela 1).

Quanto aos metabólitos voláteis, houve inibição de *F. solani* apenas por HP5, enquanto para *F. oxysporum*, observamos que houve indução de crescimento do patógeno pelos isolados HP3 e HP4 (Tabela 1).

Para o teste de metabólitos não voláteis, observamos inibição de *F. solani* por HP5, enquanto *F. oxysporum* foi inibido por HP3, HP5 e HP6 (Tabela 1). O isolado HP5 obteve os melhores resultados entre os testes avaliados, frente aos fitopatógenos.

Tabela 1 - Crescimento de fungos fitopatogênicos (mm) após tratamento com oito isolados de fungos endofíticos de *Hamelia patens*, por efeito de pareamento de culturas, metabólitos voláteis e não voláteis a 24 °C por 7 dias.

| Tratamentos | Pareamento | | Voláteis | | Não Voláteis | |
|-----------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|
| | <i>F. solani</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. solani</i> | <i>F. oxysporum</i> | <i>F. solani</i> | <i>F. oxysporum</i> |
| Controle | 54,3 | 58,6 | 64,5 | 49,6 | 66 | 61,3 |
| HP1 | 42,3* | 41* | 67 | 55 | 63 | 63,3 |
| HP2 | 43,6* | 32,6* | 69 | 46,6 | 61,3 | 55,6 |
| HP3 | 46* | 35,6* | 71,5* | 65* | 68,6 | 52,6* |
| HP4 | 42,6* | 45,6* | 58,8 | 66,8* | 66,3 | 58 |
| HP5 | 39,3* | 42* | 53,8* | 60,8 | 57,3* | 49* |
| HP6 | 46* | 43,3* | 61 | 56,6 | 61,3 | 52,6* |
| HP7 | 54 | 43* | 61,1 | 53 | 65 | 62 |
| HP8 | 52 | 41,6* | 65,6 | 53,1 | 64,3 | 60 |

Nota: Valores sinalizados com asterisco (*) demonstram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Autoria própria (2003).

Houve inibição das bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. pyogenes*, pela ação do extrato de HP5. O isolado HP6 obteve bons resultados contra *S. aureus* e *S. pyogenes*, enquanto HP6 inibiu apenas *S. pyogenes*. Os demais extratos avaliados, não obtiveram valores de inibição significativos (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana mensurada pelo tamanho dos halos (mm) por extratos de acetato de etila de isolados endofíticos de *Hamelia patens* em ensaio de disco difusão.

| Tratamentos | <i>E.coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. pyogenes</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>C. albicans</i> |
|-------------------------|---------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| Gentamicina | 17,6a | 29,6a | 36a | 33,6a | 22a | - |
| Anfotericina B | - | - | - | - | - | 17 |
| Acetato de Etila | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HP1 | 0 | 7,3d | 0 | 8cd | 6c | 0 |
| HP2 | 0 | 6d | 6,3d | 6d | 6c | 0 |
| HP3 | 8b | 16bc | 11,6c | 10,6c | 6,3c | 0 |
| HP4 | 7b | 12c | 14,6c | 9,6c | 7c | 0 |
| HP5 | 10,3b | 19,3b | 22,6b | 16,3b | 10,6bc | 0 |
| HP6 | 6b | 11c | 19,3b | 20b | 0 | 0 |
| HP7 | 0 | 11c | 11,3c | 19b | 0 | 0 |
| HP8 | 0 | 7,3d | 0 | 12c | 12,3b | 0 |

Nota: Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 Fonte: Autorial própria (2003).

A CCD nos revelou a presença de algumas classes de compostos, tanto no micélio seco, quanto no caldo fermentado dos isolados endofíticos de *H. patens*. Verificou-se a presença de terpenóides, compostos fenólicos e cumarinas no micélio seco de todos os isolados (HP1 a HP8), enquanto no caldo fermentado foi detectado apenas terpenóides em todos os isolados.

4. Discussão

Os dados obtidos neste estudo trazem informações inéditas quanto à diversidade fúngica associada às sementes de *Hamelia patens* como endófitos.

O gênero *Diaporthe*, em sua fase anamórfica é conhecido como *Phomopsis*, e embora a dupla nomenclatura, geneticamente são iguais. Este é caracterizado pela formação de picnídios escuros, com ostíolo normalmente em forma de pêra, conidióforos simples, alfa conídios hialinos, sem septos, unicelulares de forma ovóide. Também são formados beta conídios hialinos, filiformes, a maioria curvos em uma das extremidades, sem septos (Hanlin & Menezes, 1996).

Neste estudo, o gênero *Diaporthe* foi encontrado como endófito em valores altos, chegando a 60% de incidência. Assim como verificado em sementes de amélia, a associação de *Phomopsis* sp. com sementes é confirmada por Walker et al., (2013), que obteve incidência do gênero de até 100% em sementes de angico-vermelho, e Lazarotto et al. (2012) que verificaram a presença de *Phomopsis* sp. em todas as amostras de sementes de *Cedrela fissilis* avaliadas, apresentando incidência de até 30,5% em papel filtro e 19% em BDA (Lazarotto et al., 2012).

Os fungos do gênero *Phomopsis* colonizam os tecidos do hospedeiro muito cedo e estabelecem relações como endófito, saprófita ou parasita, estando associado às sementes, que são a sua principal forma de dispersão (Garzonio, 1983; Hernández et al., 2015).

Há relatos de *Phomopsis* em associação como endófito em uma ampla variedade de plantas, entre elas, *Sabal bermudana*, *Trachycarpus fortunei* (palmeira-moinho-de-vento-chinesa), *Cavendishia pubescens* (uva de monte), *Stylosanthes*

guianensis (mineirão), *Anacardium occidentale* (cajueiro) e *Mangifera indica* (mangueira) (Azevedo et al., 2000). Também é descrita esta associação em plantas medicinais, *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) (Siqueira et al., 2011), *Cassia spectabilis* (Cássia) (Cafêu et al., 2005), *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) (Orlandelli et al., 2012), *Spondias mombin* (cajá) e *Aspidosperma tomentosum* (peroba-do-cerrado) (Corrado & Rodrigues, 2004).

A atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos está relacionada com a produção de uma ampla variedade de compostos quimicamente distintos. O gênero *Phomopsis* tem se destacado por ser uma fonte rica em produção de metabólitos secundários com potencial biotecnológico (Chapla et al., 2010).

Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Guo et al., (2008) verificaram atividade antibacteriana de *Phomopsis* contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Isolados de *Phomopsis* sp. endófitos de *Tectona grandis* e *Samanea saman* inibiram *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans* (Chareprasert, Piapukiew, Thienhirun, Whalley & Sihanonth, 2006). *Phomopsis* sp. endófitos de *Aspidosperma tomentosum* e *Spondias mombin* inibiram o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Corrado & Rodrigues, 2004). Isolados de *Phomopsis cassiae*, inibiram os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Silva et al., 2006).

Este gênero representa um importante grupo de fungos com potencial biotecnológico, devido a produção de diversos metabólitos secundários, entre os quais podemos incluir as micotoxinas que afetam o sistema nervoso de vertebrados (Bills et al., 2002) e alcalóides com capacidade farmacológicas, tais como phomopsinas (Dai et al., 2005). Entre os principais metabólitos produzidos por *Phomopsis* sp. isolado como endofítico, está o antibiótico Phomol, obtido da fermentação do fungo em *Erythrina crista* (corticeira) (Weber et al., 2004).

Outros relatos de substâncias produzidas por fungos endofíticos com ação antimicrobiana, são descritos por Lu et al., (2000) que identificaram três novos metabólitos de *Colletotrichum* sp. isolado de *Artemisia annua* (erva-de-são-joão); O ácido coletotrico, produzido por *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de *Artemisia mongolica*, apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; *Sarcina luteae* contra o fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum* (Lu et al., 2000).

5. Conclusão

Este é o primeiro relato da associação de fungos endofíticos em sementes de *H. patens*. Foi verificada a inibição dos patógenos em todos os ensaios contra fitopatógenos, exceto para *F. oxysporum* no teste de metabólitos voláteis. No antibiograma, foi verificada a inibição das bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. pyogenes*. Entre as classes de compostos sugeridos por CCD no caldo fermentado e micélio, estão terpenóides, cumarinas e compostos fenólicos.

Como exposto neste estudo, os isolados de *Diaporthe* sp. apresentam potencial antimicrobiano, o que permite ampliar os estudos com novas frações dos extratos e também outros modelos toxicológicos, bem como, realizar o isolamento e identificação das moléculas produzidas pelo metabolismo secundário desses fungos.

Referências

- Abubacker, M. N., Sathya, C., & Prabakaran, R. (2013). In vitro antifungal potentials of *Hamelia patens* Jacq. (Rubiaceae) aqueous extracts of leaves, flowers and fruits. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10(2), 699–704. <https://doi.org/10.13005/bbra/1183>
- Ahmad, A., Pandurangan, A., Singh, N., & Ananad, P. (2012). A mini review on chemistry and biology of *Hamelia Patens* (Rubiaceae). *Pharmacognosy Journal*, 4(29), 1–4. <https://doi.org/10.5530/pj.2012.29.1>
- Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W., van Elsas, J. D., van Vuurde, J. W. L., & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4906–4914. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002>
- Azevedo, J. L., Maccheroni, W., Jr. Pereira, J. O., & Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 40-65.

- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1987). *Illustrated genera of imperfect fungi*. (4a ed.). American Phytopathological Society.
- Bills, G., Dombrowsky, A., Pelaez, F., & Polishook, J. (2002). Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. *Tropical mycology: micromycetes*, 2, 165-194.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V., & Sakayaroj, J. (2011). Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 3005–3008. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0765-8>
- Cafêu, M. C., Silva, G. H., Teles, H. L., Bolzani, V. D. S., Araújo, Â. R., Young, M. C. M., & Pfenning, L. H. (2005). Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*, 28(6), 991–995. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600011>
- Canuto, K. M., Rodrigues, T. H. S., Oliveira, F. S. A., & Gonçalves, F. J. T. (2012). Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. *Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos*, 1. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81780/1/Fungos-Endofiticos.pdf>
- Chapla, V. M., Zanardi, L. M., Lopes, M. N., Bolzani, V. S., Silva, D., & Araújo, Â. R. (2010). *Phomopsis* sp. um prolífico produtor de metabólitos especiais. *Sociedade Brasileira de Química*. <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0940-1.pdf>
- Chareprasert, S., Piapukiew, J., Thienhirun, S., Whalley, A. J. S., & Sihanonth, P. (2006). Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 481–486. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9060-x>
- Corrado, M., & Rodrigues, K. F. (2004). Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2), 157–160. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310341>
- Dai, J., Krohn, K., Florke, U., Gehle, D., Aust, H., Draeger, S., Schulz, B., & Rheinheimer, J. (2005). Novel highly substituted biaryl ethers, Phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. *European Journal of Organic Chemistry*, 23, 5100-5105.
- Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-IN3. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- Garzonio, D. M. (1983). Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. *Plant Disease*, 67(12), 1374. <https://doi.org/10.1094/pd-67-1374>
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X., & Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 136–142. <https://doi.org/10.1134/S0003683808020026>
- Hanlin, R. T., & Menezes, M. (1996). *Gêneros ilustrados de ascomicetos*. Recife, PE: Imprensa da Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Hernández, F. E., Pioli, R. N., Peruzzo, A. M., Formento, Á. N., & Pratta, G. R. (2015). Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 871. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i3.15930>
- Kern, M. E. & Blevins, K. S. (1999). Métodos de análise laboratorial e isolamento de fungos. In Kern, M. E. & Blevins, K. S. (ed.), *Micologia Médica: Texto e Atlas* (2a. ed., pp. 29-50) São Paulo, SP: Premier.
- Lazarotto, M., Muniz, M. F. B., Beltrame, R., Santos, Á. F. dos, Maciel, C. G., & Longhi, S. J. (2012). Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. *Ciência Florestal*, 22(3), 493–503. <https://doi.org/10.5902/198050986617>
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., & Tan, R. X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 151(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00199-5)
- Marchioretto, M. S., & Schnorr, D. M. (2014). Plantas medicinais no herbário anchieta (paca). *Botânica*, 97.
- Mariano, R. L. R. (1993). Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1, 369-409.
- Mena-Rejon, G., Caamal-Fuentes, E., Cantillo-Ciau, Z., Cedillo-Rivera, R., Flores-Guido, J., & Moo-Puc, R. (2009). In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(3), 462–465. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.012>
- Miguel, O. G. (2003). *Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR: Ensaio sistemático de análise em fitoquímica*. Curitiba, PR: UFPR.
- Mussi-Dias, V., Araújo, A. C. O., Silveira, S. F., Rocabado, J. M. A., & Araújo, K. L. (2012). Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(2), 261–266. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200002>
- Orlandelli, R. C., Alberto, R. N., Rubin Filho, C. J., & Pamphile, J. A. (2012). Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 1575–1585. <https://doi.org/10.4238/2012.May.22.7>
- Paz, J. E. W., Contreras, C. R., Munguía, A. R., Aguilar, C. N., & Inungaray, M. L. C. (2018). Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.018>
- Ramos, H. P., Braun, G. H., Pupo, M. T., & Said, S. (2010). Antimicrobial activity from endophytic fungi Arthrinium state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(3), 629–632. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300017>

Silva, G. H., Teles, H. L., Zanardi, L. M., Marx Young, M. C., Eberlin, M. N., Hadad, R., Pfenning, L. H., Costa-Neto, C. M., Castro-Gamboa, I., da Silva Bolzani, V., & Araújo, Á. R. (2006). Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, 67(17), 1964–1969. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.004>

Siqueira, V., Conti, R., Araújo, J., & Souza-Motta, C. (2011). Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. And their antimicrobial activity. *Symbiosis*, 53, 89-95.

Souza, A. Q. L. de, Souza, A. D. L. de, Astolfi Filho, S., Pinheiro, M. L. B., Sarquis, M. I. de M., & Pereira, J. O. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*, 34(2), 185–195. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>

Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214–216.

Strobel, G. A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5(6), 535–544. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00073-X](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00073-X)

Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2017). Principais mecanismos de ação dos fármacos antibacterianos. In Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. *Microbiologia* (12ª. ed., pp. 551-569) Porto Alegre, RS: Artmed.

Valente, L. M. M., Alves, F. F., Bezerra, G. M., Almeida, M. B. S., Rosario, S. L., Mazzei, J. L., D'Avila, L. A., & Siani, A. C. (2006). Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 216-223.

Wagner, H. M., Bladt, S., Zgainski, E. M. (1996). *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. New York, NY: Springer-Verlag.

Walker, C., Maciel, C. G., Bovolini, M. P., Pollet, C. S., & Muniz, M. F. B. (2013). Transmissão e patogenicidade de *Phomopsis* sp. associadas às sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Benth.). *Floresta e Ambiente*, 20(2), 216-222.

Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczancy, S., Martino, V., & Acevedo, C. (2004). Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *Journal of Antibiotics*, 57(9), 559–563. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.57.559>

Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., & Gao, X. (2010). *Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants*. *January*, 567–576.