

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**Maurette dos Reis Vieira Fernandes**

Atividade biológica do extrato da fermentação do fungo endófito de  
café *Alternaria alternata*.

Alfenas/MG

2008

**Maurette dos Reis Vieira Fernandes**

Atividade biológica do extrato da fermentação do fungo endófito de  
café *Alternaria alternata*.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki.

Alfenas/MG

2008

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG

## PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação "Atividade biológica do extrato da fermentação do fungo endófito de café *Alternaria alternata*", elaborada por Maurette dos Reis Vieira Fernandes, como requisito parcial para conclusão do Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em:

---

Prof. Masaharu Ikegaki - Orientador UNIFAL/MG

Prof. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Agradeço a Deus que me deu forças nesta jornada difícil e de enorme valor.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao prof. Dr. Masaharu Ikegaki pela orientação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada.

Ao amigo Tales Alexandre Costa e Silva pelo grande auxílio nos experimentos e por contar sempre com sua amizade.

Ao Prof. Dr. Cláudio Miguel Costa-Neto e ao Prof. Dr. Severino M. Alencar pela disponibilidade e pela oportunidade de parceria na execução de parte dos experimentos.

A todos os professores e técnicos dos laboratórios de Fitoquímica, Bioquímica Básica, Microbiologia Básica e Controle de Qualidade, sem os quais muitos experimentos não seriam possíveis de serem realizados.

Aos alunos orientados pelo professor Marcelo Henrique dos Santos, pelo trabalho em conjunto. Especialmente à Kamila R. Dázio, sua cooperação foi valiosa.

À mestranda Priscilla Bento Matos Cruz Derogis pela amizade, companheirismo e carinho em todos os momentos.

À mestranda Cristiani Bigatti pelo exemplo de fidelidade e sinceridade.

Ao bibliotecário Ronan Lázaro Gondim pelo auxílio imprescindível.

À professora e amiga Gisele Bastos Singi pelos ensinamentos e sobretudo pelo carinho.

Ao meu marido Eduardo, essencial em minha vida, pelo importante apoio.

À coordenação do Curso de Pós-graduação pela política de incentivo à produção acadêmica.

Ao órgão de incentivo à pesquisa e desenvolvimento Proapi-CAPES, pelos auxílios.

A todos, amigos e familiares, incentivadores e compreensivos nos momentos difíceis ou de ausência.

## RESUMO

A busca de novos princípios ativos de microrganismos é uma das áreas em que mais se investe nos países desenvolvidos. Entre estes microrganismos, os fungos têm grande destaque por sua produção de diversos metabólitos de interesse farmacológico. Endófitos são todos os microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos ao hospedeiro e sem desenvolver estruturas externas, excluindo, dessa forma, bactérias noduladoras e micorrizas. Considerando a importância da cultura do café no estado de Minas Gerais, pesquisas com fungos endófitos de café, permitem a ampliação do conhecimento da diversidade desses fungos. Neste estudo, um total de 22 fungos endófitos isolados de café (*Coffea arabica* L.) foi cultivado *in vitro*. O *screening* foi conduzido usando o método de difusão em agar contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. O isolado mais efetivo contra todos os microrganismos testados foi a linhagem *Alternaria alternata* e posteriormente, seu extrato bruto foi analisado. A concentração de fenólicos totais do extrato bruto do endófito foi de 3,44 µgEAG/mg de extrato. Para os testes de atividade antimicrobiana, a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida e fungicida mínima (CBFM) contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* foram determinadas. Os valores de CIM variaram entre 50-100 µg/mL para *S. aureus* e 400-800 µg/mL para *E. coli*. O extrato não apresentou atividade nas concentrações testadas para *C. albicans*. Além destes testes, foi avaliada a atividade antioxidante pela capacidade sequestrante de radicais DPPH e pela oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico, as quais não apresentaram resultados significativos. A atividade antitumoral foi avaliada pelo teste do MTT. À diluição de 400 µg/mL, o extrato apresentou atividade de aproximadamente 50% sobre células HeLa *in vitro*. Esses resultados demonstram que fungos endófitos podem ser uma promissora fonte de compostos antimicrobianos necessitando de estudos posteriores.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Fungos.

## ABSTRACT

The search for new active components of microorganisms is one of the areas of greatest investment in developed countries. Among these microorganisms, fungi are distinguished by their ability to produce diverse metabolites for pharmacological purposes. Endophytes are all microorganisms, cultivated or not, that live inside plant tissue, without causing harm to the host and without developing external structures, excluding nodule bacteria and mycorrhiza. Considering the importance of coffee production in the state of Minas Gerais, studies of endophytic fungi in coffee allow for greater understanding of the diversity of these fungi. In this study, a total of 22 endophytic fungi isolated from coffee (*Coffea arabica* L.) were cultivated *in vitro*. The screening was conducted using the agar diffusion method against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast. The most effective isolated fungus among all of the tested microorganisms was the lineage *Alternaria alternata*, and subsequently, its extract was assayed. The total phenolic content was 3.44 µgGAE/mg of the crude extract. For the antimicrobial activity assays, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBFC) against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* were determined. The ranges of MIC values were 50-100 µg/mL for *S. aureus* and 800-1000 µg/mL for *E. coli*. The crude extract did not show activity in the tested concentrations for *C. albicans*. Through these tests, the antioxidant activity of the fungus was assayed through its ability to scavenge DPPH radicals and through β-carotene/linoleic acid system oxidation, both of which were not significant. Antitumour activity was studied by the MTT assay. At a dilution of 400 µg/mL, the extract displayed a cytotoxic activity of approximately 50% towards HeLa cells *in vitro*. These results indicate that endophytic fungi could be a promising source of antimicrobial compounds and are worthy of further study.

Keywords: Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Fungi.

## SUMÁRIO

1	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	9
1.1	FUNGOS ENDÓFITOS.....	10
1.2	FUNGOS ENDÓFITOS E SUAS POTENCIALIDADES.....	13
1.2.1	Atividade antimicrobiana .....	18
1.2.2	Atividade antioxidante .....	21
1.2.3	Atividade citotóxica .....	22
1.3	FUNGOS ENDÓFITOS DO CAFÉ.....	24
1.4	FUNGO <i>Alternaria alternata</i> .....	26
1.4.1	<i>Alternaria alternata</i> como fungo endófito.....	27
2	<b>APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	28
2.1	ARTIGO CIENTÍFICO .....	29
3	<b>CONCLUSÕES</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49



## 1 REVISÃO DE LITERATURA

A necessidade de novos compostos úteis para o tratamento de doenças humanas é crescente. A resistência aos fármacos em bactérias, o aparecimento de viroses que ameaçam a vida, os recorrentes problemas de doenças em pessoas com órgãos transplantados e o grande aumento na incidência de infecções fúngicas na população mundial salienta nossa inadequação para lidar com estes problemas (STROBEL et al., 2004).

Acima de 50% de produtos químicos novos registrados pelo FDA entre 1981 e 2002, como agentes anticâncer, antihipertensivos e para enxaqueca, foram produtos naturais (PNs) ou derivados deles (NEWMAN et al., 2003).

Os PNs têm sido utilizados por centenas de anos e as plantas têm sido a principal fonte de compostos usados pela medicina. O princípio ativo da aspirina, o medicamento mais conhecido do mundo e universalmente usado, foi encontrado e isolado inicialmente em espécies de *Salix* e *Populus*.

Quando Pasteur descobriu que a fermentação é causada por células vivas, começou-se a investigar microrganismos como fonte de produtos naturais. Então, Fleming e Chaim, após uma observação científica acidental, anunciaram a era do antibiótico com o descobrimento e a produção da penicilina do fungo *Penicillium notatum*. Muitos outros exemplos ilustram a importância dos produtos naturais de plantas e microrganismos na civilização moderna. O paclitaxel (Taxol) é o mais recente exemplo de tais produtos com um enorme impacto na medicina (STROBEL et al., 2004).

Entre todas as fontes naturais de pequenas moléculas, os microrganismos se destacam na síntese de metabólitos biologicamente ativos que encontram aplicações como agentes agroquímicos, antibióticos, imunossupressores, antiparasitários e antitumorais (GUANATILAKA, 2006).

Uma das propriedades mais importantes dos microrganismos, especialmente dos fungos, é a sua capacidade de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas. Fungos são também responsáveis pela produção de substâncias altamente tóxicas, denominadas micotoxinas, sendo que algumas são consideradas carcinogênicas potentes. Mas também, fármacos importantes de uso clínico foram obtidos de fungos. Além dos medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas, os antibióticos penicilinas e cefalosporinas, muitas substâncias com outras atividades farmacológicas foram produzidas a partir de metabólitos de fungos. Tem-se ainda como exemplos a mevinolina, um

agente redutor de colesterol, asperlicina, antagonista dos receptores da colecistoquinina (CCK) a qual é um hormônio gastrointestinal e também sintetizado por neurônios no sistema nervoso central (SNC), papulacandinas como antifúngico, entre outras (PINTO et al., 2002).

## 1.1 FUNGOS ENDÓFITOS

Uma variedade de microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habitam plantas e, portanto, são conhecidos como endófitos. Desde o seu descobrimento na Alemanha, em 1904, os pesquisadores têm definido os endófitos de diferentes modos, dependendo de como eles foram isolados e, subseqüentemente, examinados (STROBEL; DAISY, 2003).

Petrini et al. (1992) sugeriram uma definição mais abrangente do termo endófito, a qual inclui todos os microrganismos que, durante pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizam o interior dos tecidos vivos de seus hospedeiros sem causar sintomas de doenças. Como podemos observar por esta definição, os endófitos não incluem apenas os fungos filamentosos, mas também leveduras e, especialmente, bactérias endófitas, fato muitas vezes negligenciado na literatura (CHANWAY, 1996).

Em 1990, a magnitude da diversidade fúngica foi estimada em 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 1991). Segundo Arnold et al. (2000), há uma grande diversidade de fungos endófitos tropicais e o valor de 1,5 milhões de espécies descritas anteriormente subestima tal biodiversidade.

Segundo Strobel (2003), a relação entre os microrganismos endófitos e as plantas provavelmente iniciou-se há aproximadamente 100 milhões de anos com o surgimento das primeiras plantas na Terra. Durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com fungos endófitos ocorreram e promoveram várias adaptações. Entre elas, podemos relacionar a capacidade de defesa da planta contra o ataque de insetos, microrganismos e animais herbívoros, através da produção de uma variedade de compostos secundários como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos (LIU et al., 2001). Assim, a simbiose entre planta e endófito pode ser observada pela proteção e alimentação do fungo que, em contrapartida, produz substâncias bioativas (hormônios reguladores de crescimento, antibióticos, inseticidas, etc) que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (LU et al., 2000).

Há a hipótese de que a interação fungo endófito e planta hospedeira seja caracterizada por um equilíbrio entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta. Se o balanço é

perturbado por ambos, uma diminuição da defesa da planta ou aumento do poder de virulência do microrganismo, a doença pode se manifestar (SCHULZ et al., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005). Apesar do antagonismo balanceado, não se exclui a possibilidade de que os endófitos talvez possam promover benefícios ao hospedeiro, como por exemplo, através da indução de metabólitos secundários contra patógenos, secreção de fitohormônios e aumento da atividade metabólica da planta hospedeira (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Endófitos ocorrem em tecidos aéreos de plantas e também em raízes, porém são distintos das micorrizas por ocuparem exclusivamente o interior dos tecidos, sem formação de hifas externas (SAIKKONEN et al., 1998).

O microrganismo endófito, especialmente bactéria, penetra o tecido da planta principalmente pela raiz. Entretanto, partes aéreas como estômatos, flores e cotiledones, também podem servir como entrada (KOBAYASHI; PALUMBO, 2000).

Insetos herbívoros são vetores conhecidos de fungos patógenos, mas também podem dispersar esporos e hifas de fungos endófitos. A maioria dos endófitos é, provavelmente, transmitida horizontalmente por esporos de planta para planta. Também podem ser transmitidos verticalmente através das sementes, e neste caso, a interação mutualística é acentuada através do aumento da adaptação da planta hospedeira com o estágio de germinação. Porém, a transmissão vertical pode reduzir a habilidade do fungo endófito em infectar uma planta não infectada, tanto assexuadamente ou sexuadamente, via esporos. Nas associações simbióticas o tamanho, o formato e estágio de maturidade sexual da planta hospedeira obrigam o crescimento do fungo de acordo com o modelo do hospedeiro (Figura 1, Tabela 1) (SAIKKONEN et al., 1998; SAIKKONEN et al., 2004).

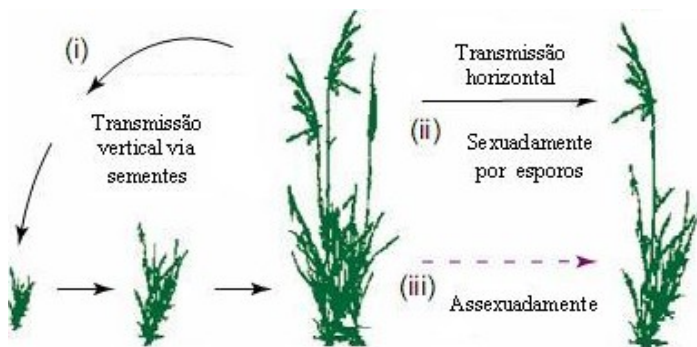


Tabela 1: Benefícios para os parceiros

	Planta	Fungo
Benefícios	↑Crescimento	Proteção
	↑Reprodução	Nutrição
	↑Resistência	Transmissão

(↑: aumento)

Fonte: SAIKKONEN et al. (2004).

Figura 1- Ciclo de vida de endófito sistêmico de gramínea.

Fonte: SAIKKONEN et al. (2004).

A disseminação de fungos endófitos associados a arbustos, árvores e plantas herbáceas ocorre horizontalmente via esporos, que penetram nos tecidos da planta através de aberturas

naturais, ou indiretamente, com o auxílio de um aparato enzimático. A colonização de plantas lenhosas por fungos endófitos é usualmente localizada, específica para um tipo de órgão ou tecido e pode ocupar uma pequena área do tecido infectado (Fischer; Petrini, 1992).

O interesse em estudar fungos endófitos vem aumentando nos últimos anos, com destaque para três principais vertentes cujos objetivos de estudo são:

i) determinar a sua importância como segmento da diversidade biológica de fungos, considerando sua elevada especialização frente ao ambiente em que vivem (ARNOLD et al., 2000; CANNON; SIMMONS, 2002; RODRIGUES; PETRINI, 1996);

ii) esclarecer a sua função na saúde das plantas e o seu envolvimento em processos de resistência a patógenos, pragas e estresses climáticos (ARNOLD et al., 2003; AZEVEDO et al., 2000; REDMAN et al., 2001; RUBINI et al., 2005);

iii) avaliar o seu potencial como produtores de metabólitos biologicamente ativos, com possível aproveitamento na agricultura e medicina (SCHULZ et al., 2002; STROBEL, 2002).

Fungos endófitos vivem internamente nos tecidos de plantas hospedeiras sem causar sintomas aparentes de doença (CHANWAY, 1996); porém, isto não impede que eles se tornem patogênicos caso o hospedeiro sofra estresse biótico ou abiótico (CARROL, 1988). A distinção entre fungo patogênico e mutualista nem sempre é possível, pois a separação de grupos ditos patogênicos, endófitos e oportunistas é meramente didática devido à distância entre um estágio e outro ser muito pequena. Portanto, um microrganismo pode ser considerado endófito, porém com a redução dos mecanismos de defesa da planta, pode se comportar como um patógeno (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Dentre as espécies comumente encontradas como endofíticas destacam-se, principalmente, membros do filo Ascomycota. Na literatura, os fungos endófitos são divididos em dois grupos principais: *balansiaceous* e não-*balansiaceous*. Endófitos *balansiaceous* são fungos ascomicetos pertencentes aos gêneros *Epichloë* e *Balansia* que se desenvolvem de forma sistêmica e intercelular em todos os órgãos de gramíneas e são transmitidos verticalmente através de sementes. Produzem uma série de metabólitos secundários, dentre os quais, as peraminas e lolinas (alcalóides inseticidas) e as lolitrem B e ergovalinas (alcalóides antivertebros) (SCHULZ; BOYLE, 2005). A relação entre fungos *balansiaceous* e seus hospedeiros é considerada mutualista, sendo que o fungo beneficia-se com o ganho nutricional e proteção contra estresse abiótico enquanto a planta beneficia-se pela proteção contra herbivoria através da produção de alcalóides tóxicos por parte do fungo (SAIKKONEN et al., 1998; SAIKKONEN et al., 2004).

Endófitos não-*balansiaceous* significa um grupo diverso, representado, em sua maioria, por espécies de diferentes famílias do filo Ascomycota e podem ser isoladas de todos os órgãos de praticamente todas as plantas terrestres (BACON; WHITE, 2000). São transmitidos horizontalmente (ARNOLD et al., 2003) e são cosmopolitas ocorrendo em ambientes temperados e tropicais, sendo os gêneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora*, frequentemente isolados de um grande número de hospedeiros (ARNOLD et al., 2000; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003).

Segundo Strobel (2003), é muito provável que todas as plantas superiores sejam hospedeiras de um ou mais microrganismo (fungos, bactérias e actinomicetos) endófito. Associações biológicas mais estreitas podem ter sido desenvolvidas entre estes organismos e seus respectivos hospedeiros, mais que os epífitos ou organismos relacionados ao solo. O resultado desta interação pode ser a produção de um número maior e uma diversidade de classes de biomoléculas, com atividades biológicas.

Neste contexto, Firáková, Sturdíková e Múcková (2007) verificaram que nos últimos anos a pesquisa de microrganismos endófitos levou às novas perspectivas promissoras para melhorar a produção de compostos de plantas medicinais como também de outras plantas.

## 1.2 FUNGOS ENDÓFITOS E SUAS POTENCIALIDADES

No que diz respeito aos fungos endófitos de gramíneas (*balansiaceous*), eles podem conferir resistência à planta contra organismos herbívoros por meio de dois mecanismos principais:

- 1) estímulo direto do vigor da planta
- 2) produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbivoria (CLAY; MARKS; CHEPLICK, 1993).

Rudgers e Swafford (2008) testaram a hipótese de que fungos endófitos em espécies nativas de gramíneas, como *Elymus virginicus* (Figura 2), promoveriam tolerância do hospedeiro à seca. Contudo, os benefícios dos endófitos foram mais acentuados sob irrigação diária que sob a seca, sugerindo que o estresse da seca pode tanto afetar o endófito quanto a planta hospedeira.

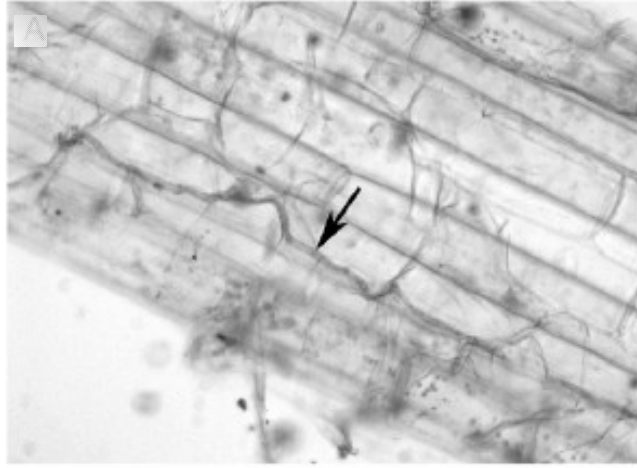


Figura 2 - Fotografia de hifa do endófito *Epichloë* em tecido foliar de *Elymus virginicus* (S. F. Austin-400A). A seta indica o endófito.

Fonte: RUDGERS; SWAFFORD (2008).

Fungos endófitos geram o crescimento vegetal pela síntese de fitormônios e fixação de nitrogênio (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Para White et al. (2002), os fungos produtores de hormônios de crescimento vegetal o fazem para modificar a fisiologia e estrutura da planta, visando à extração de nutrientes para si.

Fungos endófitos, que colonizam seus hospedeiros assintomaticamente, são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico (BOYLE et al., 2001).

Alguns dados da literatura têm relatado a habilidade dos fungos endófitos em produzir, *in vitro*, metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (STROBEL et al., 1996).

Aproximadamente 80% dos fungos endófitos produzem compostos biologicamente ativos (antibacterianos, fungicidas e herbicidas), segundo Schulz e Boyle (2005). De acordo com Strobel (2002), os metabólitos secundários bioativos de endófitos podem apresentar aplicações na medicina, agricultura e indústria. Esses metabólitos pertencem a diversas classes químicas, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, peptídeos, esteróides, xantonas, compostos fenólicos, isocumarinas, quinonas, terpenóides, citocalasinas, compostos alifáticos e clorados (Figura 3) (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005).

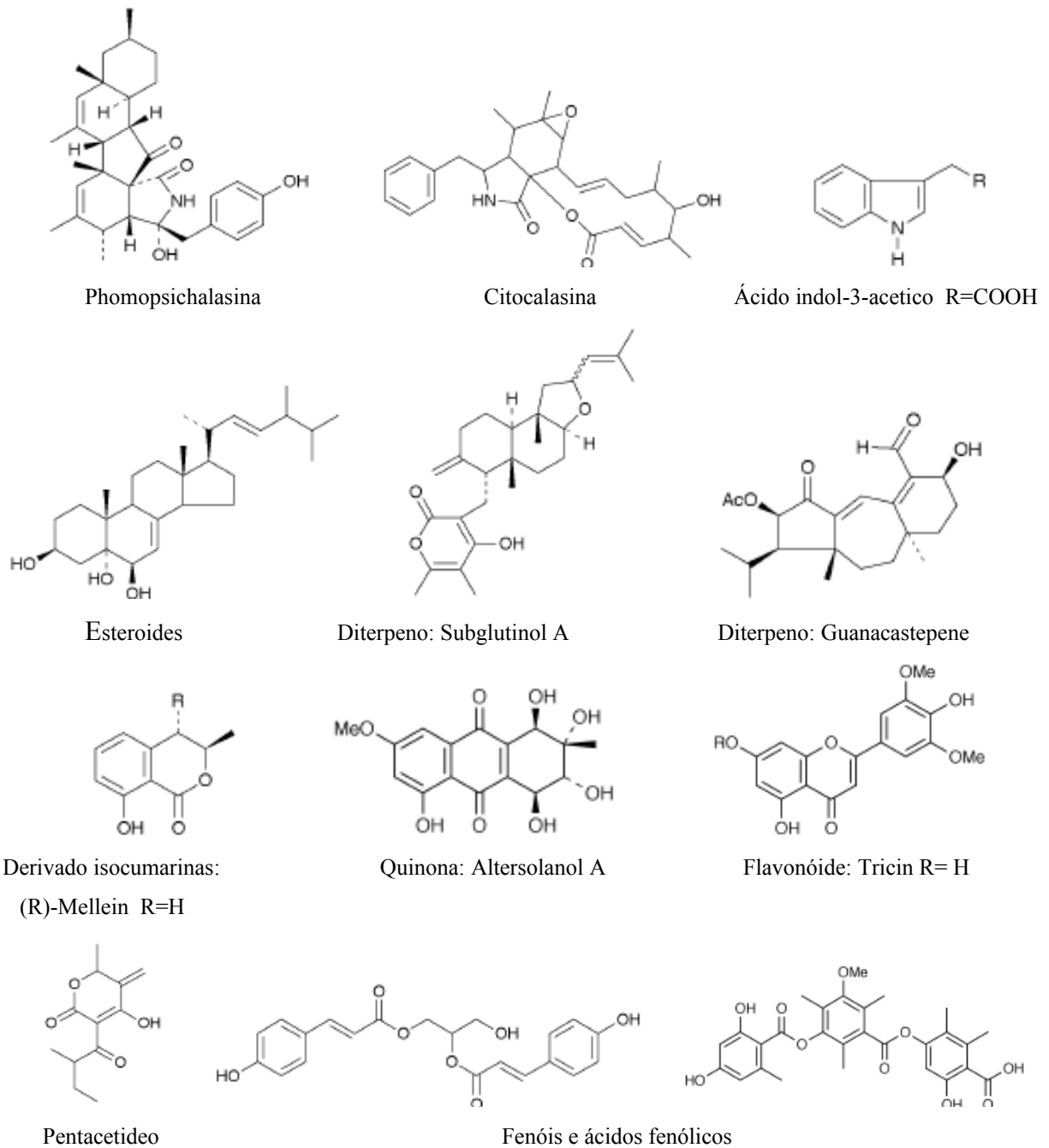


Figura 3 - Alguns exemplos da diversidade estrutural de metabólitos isolados de fungos endófitos.  
Fonte: TAN; ZOU (2001).

O termo composto fenólico abrange um amplo grupo de moléculas que possuem em comum um anel aromático portando uma ou mais hidroxilas. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e em microrganismos. Os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese dos compostos fenólicos em pequena quantidade é feita utilizando o anel benzênico de substâncias ingeridas na dieta. Os vegetais e a maioria dos

microrganismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e, a partir dele, produzir diferentes tipos de compostos fenólicos, tais como, os floroglucínóis, os flavonóides, as xantonas, entre outros. (MANN, 1994).

Do ponto de vista farmacológico possuem atividades anticâncer (CAI et al., 2004), antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante (FIRÁKOVÁ; STURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ, 2007), portanto, é relevante a pesquisa destes compostos quando se trabalha com produtos naturais.

Segundo Osbourn (2001), a produção de enzimas também é uma característica expressa por fungos endófitos. Analisando uma planta colonizada por *Cladosporium fulvum* constatou-se uma indução da defesa bioquímica através da produção de altos níveis de peroxidases, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fenilalanina amônio liases (FAL), proantocianidinas e fenilpropanóides. A produção de enzimas em resposta à colonização do endófito, pode ter um papel fundamental na limitação do crescimento do endófito e/ou patógeno e da virulência dos mesmos (ARNOLD et al., 2003; SHULZ; BOYLE, 2005).

Shulz et al. (2002), avaliaram fungos endófitos quanto à produção de enzimas *in vitro* necessárias para penetrar e colonizar a planta hospedeira. O tipo das enzimas variou de isolado para isolado, mas todos sintetizaram enzimas. Também foi observado que a penetração, colonização e crescimento foram diferentes entre endófitos e patógenos.

Atualmente, enzimas amilolíticas termoestáveis produzidas por fungos endófitos são investigadas para melhorar processos industriais de degradação do amido.

A mais nova aplicação de endófitos está na área de fitorremediação (auxílio na remoção de xenobióticos do solo) (FIRÁKOVÁ; STURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ, 2007).

Segundo Li et al. (2005), metabólitos de fungos endófitos são tidos como um arsenal versátil de agentes antimicrobianos, visto que alguns endófitos demonstraram possuir capacidades biossintéticas superiores devido a sua provável recombinação genética com o hospedeiro, enquanto residem e se reproduzem dentro dos tecidos de plantas saudáveis. Os autores identificaram como *Aspergillus* sp. o fungo endófito mais ativo de um total de 32 fungos endófitos isolados da planta medicinal *Cynodon dactylon* (Poaceae) e examinados *in vitro* para atividade anti- *Helicobacter pylori*. Como metabólitos secundários deste fungo, foram isolados quatro compostos: o ácido helvólico, monometilsulocrina, ergosterol e 3β-hidroxi-5α,8α-epidioxo-ergosta-6,22-diene, sendo que o metabólito mais ativo contra *H. pylori* foi o ácido helvólico.



Wang et al. (2002) estudaram a substância brefeldina A, isolada do fungo endófito *Aspergillus clavatus*, a qual apresentou atividade antifúngica, antiviral e uma maior citotoxicidade frente a várias linhagens tumorais quando comparada ao taxol.

Um novo pentacetídeo isolado de *Fusarium* sp apresentou potente atividade antifúngica contra *Candida albicans* (BRADY; CLARDY, 2000).

De acordo com um estudo feito com 81 espécies de plantas medicinais da Tailândia, foram obtidos 582 isolados de fungos endófitos, sendo que seus extratos foram testados para atividades biológicas e apresentaram atividades antimicrobiana, contra *Mycobacterium tuberculosis*; antimalárica, contra *Plasmodium falciparum*; antiviral, contra o vírus tipo 1 do Herpes simples e antitumoral, contra células de carcinoma epidermoide oral humano e células de câncer de mama (WIYAKRUTTA et al., 2004).

Dando continuidade aos estudos de bioprospecção, Cafêu et al. (2005) selecionaram várias espécies vegetais do Cerrado e Mata Atlântica brasileira para o isolamento e cultivo de fungos endófitos. De *Palicourea marcgravii*, uma Rubiaceae de larga ocorrência no Cerrado, vários fungos endófitos foram isolados, dentre os quais, *Xylaria* sp foi selecionado para estudo devido ao seu extrato bruto ter apresentado atividade frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, indicando a produção de metabólitos com atividade antifúngica em potencial.

Phongpaichit et al. (2007) avaliaram atividades biológicas de 65 extratos brutos de 51 fungos endófitos selecionados, isolados de espécies de *Garcinia*. Entre estes, 80% dos extratos fúngicos dos caldos de fermentação e dos micélios demonstraram atividades: antimicobacteriana (76,9%); antimalárica (14,1%); antiviral (16,7%); antioxidante (22,2%); antiproliferação (11,1% contra células NCI-H187 e 12,7% contra células KB) e citotoxicidade para células Vero (40,0%).

Foi relatado pela primeira vez por Kusari et al. (2008), a produção de hipericina por um fungo endófito INFU/Hp/KF/34B, isolado de *Hypericum perforatum* L. proveniente de Harwan, Jammu e Kashmir na Índia. A hipericina apresenta as atividades antidepressiva, antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória e antiviral (HIV-1, HSV-1, HSV-2 e influenza A). Vários estudos *in vitro* ainda têm revelado atividade citotóxica deste composto.

### 1.2.1 Atividade antimicrobiana

Ezra, Hess e Strobel (2004) estudaram o fungo *Muscodor albus*, um microrganismo endófito primeiramente isolado de *Cinnamomum zeylanicum*, que produz uma mistura de compostos orgânicos voláteis em cultura e têm um amplo espectro de atividade antimicrobiana.

O extrato bruto de culturas de 13 cepas fúngicas identificadas como *Phomopsis* sp. e isoladas como endófitos de folhas de *Aspidosperma tomentosum* e brotos de *Spondias mombin* foram examinados quanto às suas atividades antifúngicas e antibacterianas. Três dos 13 extratos inibiram eficientemente o crescimento de todos os organismos testados, indicando que eles podem representar um potencial para aplicações farmacêutica e/ou na agricultura e são válidos para estudos posteriores (CORRADO; RODRIGUES, 2004).

No Brasil, um grupo de pesquisadores, relatou atividade antimicrobiana de fungos endófitos de plantas tóxicas da Amazônia, os quais foram identificados por taxonomia convencional como *Aspergillus niger*, *Colletotrichum* sp., *Glomerella* sp., *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Trichoderma* sp., e *Xylaria* sp. De uma amostra de 79 isolados fúngicos, 19 inibiram um ou mais microrganismos patogênicos e fitopatogênicos testados (SOUZA et al., 2004).

No estudo de Li et al. (2005), também foram feitos testes do espectro antimicrobiano do metabólito caracterizado mais ativo anti-*Helicobacter pylori*, o ácido helvólico, do extrato do endófito *Aspergillus* sp. Este metabólito inibiu o crescimento de *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Phongpaichit et al. (2006) selecionaram para estudo de atividade antimicrobiana, fungos endófitos isolados de plantas de *Garcinia* encontradas no sul da Tailândia. Foi verificada atividade antimicrobiana contra pelo menos um microrganismo testado, como *S. aureus*, *S. aureus* resistente a metilina e *Cryptococcus neoformans* em 18,6%, ou seja, 70 isolados dos 377 isolados fúngicos inicialmente testados.

Entre 67 fungos endófitos isolados de *Quercus variabilis*, 53,7% dos caldos de fermentação inibiram o crescimento de pelo menos um microrganismo testado, tal como fungos patogênicos (*Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium canis*) e bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*), segundo Wang et al. (2007). Ainda neste estudo, a amostra fúngica com mais atividade, I(R)9-2 *Cladosporium* sp. foi selecionada e do seu

extrato de fermentação foi isolado o metabólito secundário brefeldina A. Este é o primeiro relato de antimicrobianos potenciais de fungos endófitos de *Quercus variabilis*.

No estudo de Lin et al. (2007), 174 fungos endófitos foram isolados da planta medicinal, *Camptotheca acuminata*. Os testes de bioatividade contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* mostraram que 27,6% dos fungos endófitos inibiram o crescimento de mais de um microrganismo testado.

Weber et al. (2007) isolaram e identificaram seis compostos bioativos dos extratos do filtrado e do micélio de cinco espécies de fungos endófitos. A atividade antifúngica, contra *Candida albicans*, de quatro compostos foi comparável à da anfotericina B, usada como padrão.

Firáková, Sturdíková e Múcková (2007) apresentam uma visão geral dos metabólitos secundários isolados de endófitos nos últimos cinco anos. Alguns exemplos: isopestacina isolado do fungo endófito *Pestalotiopsis microspora* da planta *Terminalia morobensis*, com atividade antimicrobiana (HARPER et al., 2003); kakadumicina A, do fungo *Streptomyces* NRR1 30566 da planta *Grevillea pteridifolia*, com amplo espectro de atividade antibiótica, especialmente contra bactérias Gram-positivas e acentuada atividade contra o parasito da malária (CASTILHO et al., 2003); pomol do fungo endófito *Phomopsis* spp. da planta *Erythrina cristagalli*, com atividade antifúngica e antibacteriana (WEBER et al., 2004); coronamicina, do *Streptomyces* sp. da planta *Monstera* sp. com atividade contra fungos patogênicos humanos como o *Cryptococcus neoformans* e atividade contra *Plasmodium falciparum* (EZRA; HESS; STROBEL, 2004); asperfumoide, do fungo endófito *Aspergillus fumigatus* CY 018, da planta *Cynodon dactylon*, inibiu o crescimento de *Candida albicans* (LIU et al., 2004); griseofulvina, do fungo *Xylaria* sp. F0010, da planta *Abies holophylla*, com atividade antifúngica e antibiótica (PARK et al., 2005).

Na constante busca por novos compostos com atividade biológica, Chomcheon et al. (2005) obtiveram extratos de isolados de fungos endófitos que exibiram atividade antimicobacteriana. A análise química destes extratos levou à identificação do ácido 3-Nitropropiónico (3-NPA) o qual demonstrou potente atividade antimicobacteriana com MIC de 3,3 µM. Foram encontrados endófitos produtores de altos níveis de 3-NPA e, portanto este composto acumulado em certas plantas pode ser produzido por endófitos associados.

De acordo com Silva et al. (2006), o fungo endófito *Phomopsis cassiae* foi selecionado entre isolados obtidos da planta *Cassia spectabilis* para investigação biológica e química. O extrato bruto do fungo apresentou significativa atividade antifúngica contra os

fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* levando a estudos posteriores. O estudo do extrato bruto resultou em cinco novos sesquiterpenos.

Guimarães et al. (2008) isolaram 39 fungos endófitos de *Viguiera arenaria* e de *Tithonia diversifolia*, ambas coletadas no estado de São Paulo. Os extratos brutos de todos os isolados foram avaliados em relação à atividade antimicrobiana. Dois extratos (5,1%) foram ativos contra *S. aureus*, dez (25,6%) contra *E. coli* e 25 (64,1%) contra *Candida albicans*. A proporção relativamente alta de extratos ativos contra *Candida albicans* indica que estes fungos endófitos podem produzir potentes compostos antifúngicos.

No estudo de Liu et al. (2008), foi relatado pela primeira vez o metabólito 7-amino-4-metilcoumarina (P3) isolado do extrato da cultura do fungo endófito *Xylaria* sp. Este fungo foi isolado e caracterizado da planta *Ginkgo biloba* L. O composto mostrou significativas atividades antibacteriana e antifúngica *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia* sp., *Shigella* sp., *Candida albicans*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger*. Os resultados fornecem informações que mostram o potencial uso deste fungo endófito e seus componentes no controle da deterioração de alimentos e de doenças provenientes de alimentos (intoxicações alimentares).

Kusari et al. (2008) relataram pela primeira vez o isolamento de um fungo endófito de plantas do gênero *Hypericum*. Tal endófito produziu os compostos emodim e hipericina por meio da fermentação. Foi determinada a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto do endófito e dos compostos isolados contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* (DSM 799) , contra as Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* ssp. *azaenae* (DSM 681), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 1128), *Salmonella enterica* ssp. *enterica* (DSM 9898) e *Escherichia coli* (DSM 682) e também contra *Candida albicans* (DSM 1386) e *Aspergillus niger* (DSM 1988). Todos os microrganismos foram consideravelmente suscetíveis aos dois compostos, hipericina e emodin, demonstrando que este endófito possui significativo potencial industrial e científico para suprir a demanda farmacêutica por hipericina.

### 1.2.2 Atividade antioxidante

Nos últimos anos, grande atenção tem sido dada para descoberta de novas moléculas antioxidantes, devido às muitas condições patológicas, as quais estão associadas ao estresse oxidativo (RODRIGUES et al., 2005).

O extrato da cultura do fungo endófito, *Pestalotiopsis microspora*, isolado da planta *Terminalia morobensis* da Papua Nova Guiné (STROBEL et al., 2002), apresentou tanto atividade antifúngica como antioxidante devido aos seus metabólitos secundários, dos quais a isopestacina foi isolada e caracterizada.

Segundo Harper et al. (2003), o composto chamado pestacina, também extraído do fungo endófito, *Pestalotiopsis microspora*, tem moderada propriedade antifúngica e atividade antioxidante onze vezes maior que a vitamina E.

De acordo com Song et al. (2005), a grafis-lactona A isolada do fungo endófito *Cephalosporium* sp. IFB-E001, da planta *Trachelospermum jasminoides*, apresenta propriedades antioxidantes.

Foi estabelecida a metodologia para isolamento, identificação e caracterização de um novo endófito (*Trametes hirsuta*) que produz ligninas. Esses compostos produzidos por este microrganismo são biologicamente ativos e exibem potentes propriedades antioxidantes, anticâncer e radioprotetoras (PURI et al., 2006).

Segundo Liu et al. (2007), foi realizado um estudo pela primeira vez de um fungo endófito *Xylaria* sp. (amostra YX-28) de *Ginkgo biloba*. O extrato metanólico da cultura do fungo apresentou significativa atividade antioxidante nos dois métodos de análise, DPPH e ácido linoléico- $\beta$ -caroteno.

Huang et al. (2007) estudaram 1.160 isolados fúngicos endófitos obtidos de diferentes tecidos de 29 plantas da medicina tradicional chinesa. O objetivo dos autores foi explorar fungos endófitos que produzissem *in vitro* compostos bioativos com potente atividade antioxidante. Foram investigados a capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais de 292 isolados fúngicos morfologicamente distintos. Observou-se uma correlação positiva entre estes parâmetros, sugerindo que compostos fenólicos são os principais constituintes antioxidantes de endófitos. Este estudo revelou que metabólitos produzidos por fungos endófitos em cultura podem ser uma fonte potencial de antioxidantes naturais.

### 1.2.3 Atividade citotóxica

No campo dos agentes antineoplásicos, as descobertas da camptotecina (Figura 4) e do taxol (Figura 5) têm muito mais em comum do que apenas seu uso terapêutico, pois ambos os fármacos foram descobertos pelo mesmo grupo de pesquisa. Em 1966, Wall, Wani e colaboradores relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina a partir de uma árvore chinesa, *Camptotheca acuminata*. Mais recentemente, um grupo da Montana State University (EUA) relatou a obtenção do taxol e da bagatina III (outro taxano de origem natural) a partir de espécies de fungos endófitos, *Taxomyces andreana*, isolado das cascas de *T. brevifolia* e *Pestalotiopsis microspora* (BARREIRO; VIEGAS; BOLZANI, 2006).

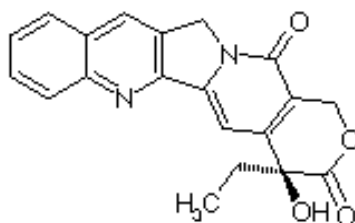


Figura 4 - Camptotecina.

Fonte: NEWMAN; CRAGG; SNADER (2000).

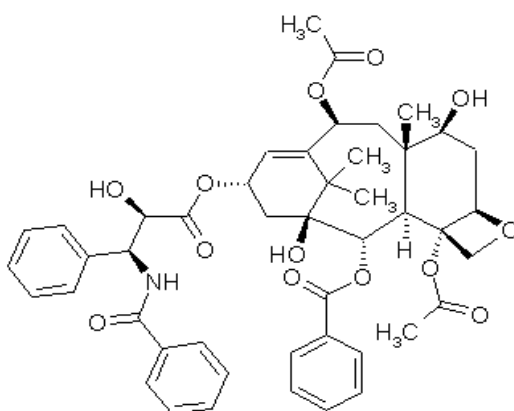


Figura 5 - Taxol.

Fonte: TAN; ZOU (2001).

O taxol é um importante fármaco anticâncer aprovado pelo FDA para tratamento de câncer de ovário, mama e carcinoma de pulmão e se tornou o primeiro produto descrito que estabilizou os microtúbulos evitando a replicação celular. Os microtúbulos estão envolvidos em muitos aspectos da biologia celular como transporte intracelular de partículas, deslocamento de cromossomas na mitose e manutenção da forma das células. Sendo assim, representam um alvo importante de quimioterápicos anticâncer (SOUZA, 2004).

Segundo Huang et al. (2001), fungos endófitos podem ser uma fonte promissora para agentes bioativos antifúngicos e antitumorais. Nesse estudo, os fungos endófitos foram isolados de cascas internas de três tipos de plantas medicinais: *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis*, coletadas da província Fujian, China. Entre todos os fungos endófitos isolados, o gênero *Paecilomyces* sp. demonstrou atividades antifúngica e antitumoral mais acentuadas.

Puri et al. (2005) relataram, pela primeira vez, a produção do alcalóide camptotecina por um fungo endófito isolado de *Nothapodytes foetida* da costa oeste da Índia. Este também foi testado contra uma série de linhagens de células cancerígenas humanas. O isolamento de um microrganismo produtor de camptotecina pode, no futuro, prover uma fonte mais acessível para produção desta molécula precursora de fármaco anticâncer.

Teles et al. (2005) isolaram quatro benzopiranos de um fungo endófito *Curvularia* sp, associado à planta brasileira *Ocotea corymbosa*. Um dos novos derivados foi indutor da proliferação celular de células HeLa.

Wiyakrutta et al. (2004) coletaram 81 espécies de plantas medicinais de florestas da Tailândia e estudaram os fungos endófitos com atividade biológica presentes nestas plantas. Entre 582 isolados obtidos, 360 fungos distintos morfologicamente foram cultivados. Em relação às células de carcinoma epidermóides orais humanas, 60 isolados foram ativos e 48 demonstraram atividade contra células de câncer de mama.

De acordo com Li et al. (2005), foram isolados e testados 130 fungos endófitos de 12 plantas da medicina tradicional chinesa, coletadas no sudoeste da China. Foram avaliadas quanto à atividade antifúngica e anticancerígena em linhagens BGC-823 de células tumorais gástricas humanas e quanto à inibição do crescimento contra sete fungos fitopatogênicos. 9,2% dos isolados demonstraram atividade antitumor e 30% exibiram atividade antifúngica.

Firáková, Sturdíková e Múcková (2007) relacionaram metabólitos de fungos endófitos com atividade anticâncer. Como exemplos têm os compostos rubrofusarina B e aurasperone A, isolados de *Aspergillus niger* IBF-E003 da planta *Cynodon dactylon* como fortes co-inibidores da xantina oxidase, nas células de câncer de cólon (SONG et al., 2004); o composto

(+)- epiepoxidon, do fungo endófito *Apiospora montagnei* da planta *Polysiphonia violacea* exibiu significante citotoxicidade contra linhagens de células de câncer humano (KLENKE et al., 2004); compostos macrolídeos do endófito *Streptomyces* sp. Is 9131 da planta *Maytenus hookeri* apresentaram atividade antineoplásica significante (ZHAO et al., 2005) e podofilotoxina do fungo endófito *Trametes hirsuta* da planta *Podophyllum hexandrum* com atividade anticâncer (PURI et al., 2006).

Segundo Prachya et al. (2007), no estudo de uma planta medicinal da Tailândia, *Hydnocarpus anthelminthicus*, foi isolado o fungo endófito *Phomopsis* sp. e do extrato da sua cultura foram isolados compostos com potente atividade citotóxica como o micoepoxidieno e derivados, como também diacetil micoepoxidieno.

Lin et al. (2008), isolaram do córtex da planta *Aegiceras corniculatum* coletada na China, o fungo endófito identificado como *Penicillium* sp. GQ-7. O extrato da fermentação deste endófito mostrou citotoxicidade contra linhagens de células P388. Estudos dos compostos ativos deste fungo levaram ao isolamento de seis novos derivados de ácidos tetrâmicos denominados penicilenols A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub> juntamente com citrinina, ácido fenólico A, fenol A e dihidrocitrinina.

### 1.3 FUNGOS ENDÓFITOS DO CAFÉ

O desenvolvimento de pesquisas com fungos endófitos de café, uma das culturas mais importantes para a economia do país e, em especial para o estado de Minas Gerais, permite a ampliação do conhecimento da diversidade desses fungos como também a busca por novas substâncias com potencial bioativo.

Até o presente momento, foram publicados poucos trabalhos referentes a fungos endófitos de café. No trabalho de Almeida (2007), foram estudados fungos endófitos de café (*Coffea arabica* L.) em sistema orgânico e convencional de cultivo e sobre as espécies de *Phoma* associadas a este hospedeiro. O sistema orgânico apresentou uma taxa de colonização de 53,9%, 993 UFCs e 38 espécies, enquanto o sistema convencional, 44,6%, 733 UFCs e 33 espécies, resultados que contribuem para o conhecimento da diversidade biológica de fungos endófitos de café.

De acordo com Santamaría e Bayman (2005), as plantas contêm diversas comunidades de fungos e outros microrganismos. Os autores compararam comunidades fúngicas epífitas e



endófitas associadas a folhas de café (*Coffea arabica* L.) em Porto Rico. Os autores observaram que endófitos de café dominantes em algumas áreas, são frequentemente de menor importância ou não encontrados em outras. Um total de 821 colônias foram isoladas e agrupadas em 131 morfoespécies. Dos gêneros mais comuns, *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram significativamente mais comuns como epífitos. Como endófitos, os mais comuns foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia*. Esta é a primeira comparação quantitativa de fungos epífitos e endófitos em folhas de café.

Segundo Peterson e colaboradores (2005), *Penicillium coffeae* foi descoberto na natureza como um endófito de café (*Coffea arabica* L.) no Hawai. Os autores estudaram a relação filogenética entre o *Penicillium coffeae* e três isolados do mesmo gênero. Sugeriram, ainda, que estudos químicos dos metabólitos ajudariam a esclarecer a relação entre os fungos e a planta do café.

Vega et al. (2006) estudaram tecidos de várias partes (folhas, caules, grãos e raízes) de plantas de café como *Coffea arabica*, *C. congensis*, *C. deweyrei* e *C. liberica*. Estas amostras foram coletadas no Hawai e na Colômbia e foram analisadas quanto à presença de fungos endófitos as quais revelaram 11 fungos conhecidos do gênero *Penicillium* entre eles *P. coffeae*, *P. brocae*, *P. citrinum* e outros. Somente quatro isolados produziram ocratoxina A. Os autores relatam que o papel que os fungos endófitos desempenham nas plantas de café ainda é desconhecido.

Foram identificados como fungos endófitos de plantas de café brasileiro (*Coffea arabica* e *Coffea robusta*), *Aspergillus niger*, *Colletotrichum* sp., *Glomerella* sp., *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Trichoderma* sp., e *Xylaria* sp. Além destes, também outros fungos, incluindo organismos não esporulados foram identificados. Os fungos foram investigados quanto à sua atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas humanas: *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e contra quatro diferentes sorotipos de *Escherichia coli*. Dezesete fungos inibiram pelo menos uma das bactérias estudadas. Em função dos fungos endófitos de café caracterizados neste trabalho terem mostrado potencial antibacteriano para patógenos humanos, estas amostras podem ser consideradas importantes para estudos futuros a fim de se identificarem os compostos responsáveis por tal atividade. (SETTE et al., 2006).

#### 1.4 FUNGO *Alternaria alternata*

*Alternaria* é um gênero de fungos ascomicetos (Figura 6, Tabela 2). Algumas espécies deste fungo são conhecidas como fitopatógenos. Eles são também alérgenos comuns em humanos, podendo causar febre do feno ou reações de hipersensibilidade que algumas vezes levam à asma. Eles facilmente causam infecções oportunistas em pessoas imunocomprometidas como pacientes com AIDS. Existem 44 espécies bem definidas, mas estima-se que possam existir mais de 100. Eles são ubíquos no meio ambiente e estão também presentes no processo de apodrecimento e decomposição de material orgânico. Espécies deste fungo são produtoras de uma variedade de compostos tóxicos. Os efeitos destes compostos na saúde animal e de plantas não são bem conhecidos. Os termos *alternariosis* e *alternariatoxicosis* são usados para desordens em humanos e animais causadas por um fungo deste gênero. Nem todas as espécies de *Alternaria* são patógenas, algumas têm se mostrado promissoras como agentes de controle biológico contra espécies invasoras de plantas.

Tabela 2: Classificação de *Alternaria alternata*



Figura 6 – *Alternaria* sp.  
Fonte: [www.mycobank.org/mycotaxo.aspx](http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx)

Classificação científica	
Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Classe:	Dothideomycetes
Ordem:	Pleosporales
Família:	Pleosporaceae
Gênero:	<i>Alternaria</i>
Espécie:	<i>A. alternata</i>

Fonte: [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy)

#### 1.4.1 *Alternaria alternata* como fungo endófito

Schulz et al. (2002) estudaram a síntese de exoenzimas de fungos endófitos *in vitro* e o fungo *Alternaria alternata* produziu várias enzimas como amilase, fenoloxidase, lipase, celulase e xilanase, importantes para penetração e colonização da planta hospedeira.

De acordo com Lin et al. (2007), no estudo com a planta medicinal *Camptotheca acuminata*, foram isolados 174 fungos endófitos, dos quais 12,6% foram do gênero *Alternaria*. Das 22 amostras de *Alternaria* testadas, três mostraram atividade antimicrobiana.

Recentemente, pesquisadores extraíram e purificaram um novo composto, o alternol, do produto da fermentação do microrganismo *Alternaria alternata* var. *monosporus*. No estudo de Liu et al. (2007), o composto alternol foi testado em células linfocíticas leucêmicas L1210 de camundongos e foram constatadas a inibição da proliferação e indução da apoptose das células. Além disso, a exposição das células ao alternol resultou em um significativo aumento nas espécies reativas de oxigênio.

Micotoxinas produzidas por *Alternaria* e especificamente por *Alternaria alternata* são numerosas. No estudo de Centeno e Calvo (2002), foi avaliada a produção de micotoxinas pelo *Alternaria* e os autores constataram que o fungo produziu o éter monometil alternariol (EMA), altenueno (ALT) e altertoxina I. Essas micotoxinas, além do ácido tenuazônico (AT) e o alternariol (AOH), as quais não foram produzidas pelo fungo neste trabalho, são amplamente estudadas.

## **2 APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO**

Segundo as normas do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão e discussão ampla da literatura, seguida de artigos científicos referentes aos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa. Sendo assim, foi redigido um artigo o qual está em fase de submissão à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Qualis A Internacional (consultado no site: [www.qualis.capes.gov.br/webqualis/ConsultaPeriodicos.faces](http://www.qualis.capes.gov.br/webqualis/ConsultaPeriodicos.faces) em 10 de junho de 2008).

**Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L.**

Maurette R. Vieira Fernandes <sup>1</sup>; Tales A. Costa e Silva<sup>1</sup>; Ludwig H. Pfenning <sup>2</sup>; Cláudio Miguel Costa-Neto <sup>3</sup>; Tassiele A. Heinrich <sup>3</sup>; Severino M. Alencar <sup>4</sup>; Marisa A. Lima<sup>1</sup>; Masaharu Ikegaki<sup>1\*</sup>

*<sup>1</sup>Universidade Federal de Alfenas / Unifal-MG; Departamento de Farmácia; Alfenas /MG; <sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras /UFLA; Departamento de Fitopatologia;Lavras / MG; <sup>3</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Bioquímica e Imunologia;Ribeirão Preto/SP; <sup>4</sup> Esalq/USP; Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição; Piracicaba-SP*

---

\*Correspondence:  
Masaharu Ikegaki  
Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - centro  
37130-000 Alfenas-MG  
Tel: (0xx35) 3299-1102  
E-mail address: [masaharu@unifal-mg.edu.br](mailto:masaharu@unifal-mg.edu.br)

## ABSTRACT

A total of 22 endophytic fungi isolated from coffee (*Coffea arabica* L.) were cultivated *in vitro*, and their crude extracts were tested. The screening was carried out using the agar diffusion method against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast. The most effective isolated was *Alternaria alternata* (CML 867) and subsequently, its extract was assayed. The total phenolic content was 3.44 µg GAE/mg of the crude extract. For the antibacterial and antifungal activity assays, minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal and fungicidal concentrations (MBFC) against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* were determined. The ranges of MIC values were 50-100 µg/mL for *S. aureus* and 400-800 µg/mL for *E. coli*. The extract did not show activity in the tested concentrations for *C. albicans*. The fungal crude extract was assayed for antioxidant activities. Its ability to scavenge DPPH radicals and antioxidant activity by β-carotene/linoleic acid system oxidation were not significant. In addition, antitumour activity was studied by the MTT assay. At a dilution of 400 µg/mL, the extract displayed a cytotoxic activity of approximately 50% towards HeLa cells *in vitro*. The results indicate that endophytic fungi could be a promising source of bioactive compounds and are worthy of further study.

**Uniterms:** Endophytic fungi; bioactive compounds; *Alternaria alternata*.

## RESUMO

Um total de 22 fungos endofíticos isolados de café (*Coffea arabica* L.) foi cultivado *in vitro* e seus extratos brutos testados. O screening foi conduzido pelo método de difusão em agar contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. O isolado mais efetivo foi *Alternaria alternata* (CML 867) e, subsequentemente, seu extrato foi analisado. O conteúdo de fenólicos totais do extrato bruto foi de 3,44 µgEAG/mg de extrato. Para os testes de atividades antibacteriana e antifúngica, a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida e fungicida mínima (CBFM) contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* foram determinadas. Os valores da CIM variaram entre 50-100 µg/mL para *S. aureus* e 400-800 µg/mL para *E. coli*. O extrato bruto não apresentou atividade nas concentrações testadas para *C. albicans*. Foram analisadas as atividades antioxidante do extrato bruto. Sua habilidade para seqüestrar radicais DPPH e a atividade antioxidante pela oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico não foram significativas. Além disso, a atividade antitumor foi estudada pelo teste do MTT. À diluição de 400 µg/mL, o extrato apresentou uma atividade de aproximadamente 50% sobre as células HeLa *in vitro*. Os resultados indicam que fungos endófitos podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos necessitando de estudos futuros.

**Unitermos:** Fungos endofíticos; compostos bioativos; *Alternaria alternata*.

## INTRODUCTION

Natural products play a dominant role in the discovery of leads for the development of drugs in the treatment of human diseases. Much of nature remains to be explored, particularly marine and microbial environments (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Microorganisms have the ability to utilize various substrates as a consequence of the diversity of their biological and biochemical evolution. The solid substrates they use include, among others, live plants. Both bacteria and fungi are known to collaborate with many plants to form mutually beneficial associations. Actinomycetes and fungi, of all microorganisms studied, have been found to be the most prolific producers of secondary metabolites (GUANATILAKA, 2006).

In 1990 the magnitude of fungal diversity was estimated at 1.5 million species (HAWKSWORTH, 1991), however, Arnold *et al.* (2000) suggested that tropical fungal endophytes might prove to be hyperdiverse, and therefore the 1.5 million figure underestimates fungal biodiversity.

In the last few years, considerable amount of knowledge has been accumulated on the biology of endophytic microorganisms (FIRÁKOVÁ; STURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ, 2007). Petrini *et al.* (1992) has expanded the definition of endophytes to include all those microorganisms that, during a more or less long period of life, colonize symptomlessly the living internal tissue of their hosts.

Metabolites produced by endophytes are being recognized as a versatile arsenal of antimicrobial agents, since some endophytes have been known to possess superior biosynthetic capabilities, owing to their presumable gene recombination with the host, while residing and reproducing inside the healthy plant tissues (LI *et al.*, 2005). A high proportion of endophytic fungi (80%) produce biologically active compounds in tests for antibacterial, fungicidal and herbicidal activities (SCHULZ *et al.*, 2002). The continued development of new antimicrobial compounds is important to overcome the difficulties related to the treatment of infections caused by resistant pathogens (PETERSEN *et al.*, 2004), and endophytic fungi have emerged as an alternative source for the production of new antimicrobial agents.

Due to the importance of secondary metabolites production by endophytic fungi, a study of these coffee fungi allows us a better understanding of its diversity.



The purpose of this study was to evaluate several isolated fungi from the *Coffea arabica* L. plant and select an endophytic fungus for further evaluation of its antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Isolation of the endophytic fungi**

For isolation of the endophytic fungi, adult and healthy leaves were selected and subjected to surface sterilization. They were first washed with running water and then immersed in a aqueous ethanol (3:7) for 1 minute, then in a 3% aqueous sodium hypochlorite solution for 4 minutes and finally in aqueous ethanol (0.2:9.8) for 0.5 minute, with further drying in sterilized paper in a biosafety chamber (PETRINI *et al.*, 1982).

The sterilized leaves were cut into 5 mm diameter pieces and placed in a Petri dish containing 2% malt-extract agar (MEA 2%) augmented with 50 µg/mL of chloramphenicol and 10 µg/mL of cyclosporin A with approximately 5 leaves cut in the shape of a discus on each dish. The material was incubated at 25 °C for 10 days. All strains were isolated by culture in 2% malt-extract agar (MEA 2%) with no antibiotic. The fungi were identified by Dr. Ludwig H. Pfenning and deposited in the fungal collection with the accession number CML (Coleção Micológica de Lavras) at the UFLA (Universidade Federal de Lavras).

### **Fermentation**

For initial screenings, the mycelium of different endophytes grown on MEA 2% plates were inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks containing 10 g of wheat bran as the substrate which was moistened with 10 mL of distilled water to get an initial moisture content of 100% before autoclaving at 121 °C for 20 minutes. These flasks were incubated at 25 °C for 10 days under appropriate experimental conditions. The biomass of each endophyte was extracted two times with dichloromethane (100 mL) at room temperature and further concentrated using a vacuum pump to give dried residues prior to biological assays. For the production of crude extract on a large scale, the mycelium of fungus selected was inoculated into 1.000 mL Erlenmeyer flasks containing 100 g of wheat bran as the substrate with 100 mL of distilled water to get an initial moisture content of 100% before autoclaving at 121 °C for 20 minutes. These flasks were incubated at 25 °C for 10 days. The biomass of endophyte was extracted and concentrated at the same conditions.

### **Determination of total phenolic content**

The phenolic compounds of both the crude extract and wheat bran were determined by using the Folin-Ciocalteu reagent solution (WOISKY; SALATINO, 1998). Briefly, the appropriate dilutions of the sample (0.5 mL) were oxidized with 2.5 mL Folin-Ciocalteu reagent (1:10) for 3-8 minutes at room temperature. Then the reaction was neutralized with 4% saturated sodium carbonate. The absorbance of the resulting blue color was measured at 740 nm with the spectrophotometer after incubation for 2 hours at room temperature in darkness. Gallic acid was employed as the standard. All tests were carried out in triplicate and the results were expressed as gallic acid equivalents ( $\mu\text{g GAE/ dry weight of the crude extract}$ ).

### **Test microorganisms**

The microorganisms used in this study were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 and yeast *Candida albicans* ATCC 69548. The cultures were stored at 4-8°C for bacteria and yeast in BHI agar (brain heart infusion agar). These microorganisms were kindly donated by the Microbiology Laboratory of Unifal-MG.

### **Antimicrobial screening**

The crude extracts were screened for their antimicrobial activity using the agar diffusion method (Lorian, 1996) against potentially pathogenic bacteria and yeast. The microorganisms were seeded by pour plate method. All test plates were incubated at 37 °C for 24 hours for bacteria and at 25 °C for 24-48 hours for yeast. The inhibition zones were observed, measured and recorded. The procedure was repeated and confirmed. The culture of the endophytic fungus *Alternaria alternata* (CML 867) afforded the most promising antibacterial and antifungal activities and, subsequently, its extract was assayed.

### **Microbiological assay**

The antimicrobial activity of the crude extract of fungus *Alternaria alternata* (CML 867) was assayed against bacteria and yeast. Test solution was prepared with known weight of crude extract, dissolved in DMSO. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBFC) were determined in accordance with CLSI guidelines (M100-S15, 2005) and Duarte *et al.* (2003), with few modification.

Individual colonies isolated from 24 hour cultures of bacteria and yeast were suspended in sterile NaCl solution 0.89%. The suspension was properly inoculated in Nutrient broth for bacteria and Sabouraud broth for yeast, containing a twofold dilution series of the crude extract (concentrations ranged from 50 to 800 µg/mL reaction) to achieve an assay concentration of 10<sup>5</sup> CFU/mL or the control (DMSO). The tubes were incubated at 37 °C, for 24 hours for bacteria, and 25 °C, for 24 hours, for yeast. The test was performed on three replicates for each concentration of the extract. The lowest concentration of extract that had restricted growth to a level of absorbance < 0.05 at 660 nm (no visible growth) was recorded as the MIC. To determinate the MBC, an aliquot (50 µL) of all incubated tubes with concentrations higher than the MIC was subcultured on Nutrient agar for bacteria and Sabouraud agar for yeast. The MBC was defined as the lowest concentration of the extract that allowed no visible growth on the agar plate after the period of incubation (KOO *et al.*, 2000). Three replicates were made for each concentration of the extract.

### **Antioxidant assay**

#### ***Reagents***

All the chemicals and reagents used in this study were of analytical grade. 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), ascorbic acid, gallic acid (GA), Folin-Ciocateau reagent solution, sodium carbonate, α- tocopherol, β- carotene, linoleic acid and Tween 40 were purchased from Sigma-Aldrich, Merck or Vetec.

#### ***Free radical-scavenging activity measurement***

Four mL of dilutions of crude extract (100, 500 and 1000 µg/mL) were added to 1 mL of 0.5 mM DPPH in 96% ethanol. The mixtures were vigorously shaken and left to stand at room temperature for 30 minutes in the dark (YEN; CHANG; DUH, 2005, with few modification). Absorbance at 517 nm was measured versus ethanol as blank. Standard samples (BHT and ascorbic acid) were used in the same concentrations. A degradation of DPPH was evaluated by comparison with a control (4 mL ethanol and 1 mL of DPPH solution). The DPPH radical-scavenging capacity was calculated by the formula:

$$\% \text{ CS} = \frac{\text{A negative control} - \text{A sample}}{\text{A negative control}} \times 100$$

Negative control: 4.0 mL ethanol and 1.0 mL of DPPH solution.

Where A = Absorbance

% CS = % scavenging capacity

### ***Antioxidant activity on linoleic acid oxidation***

This assay was performed as described by Ahn *et al.* (2004) with some modifications.  $\beta$ -carotene (10 mg) was dissolved in 100 mL of chloroform. Then, an aliquot (3 mL) of  $\beta$ -carotene- chloroform solution was added to 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40. Chloroform was then removed under a stream of nitrogen gas. Distilled water (100 mL) was added, and the solution was mixed well. Aliquots (3 mL) of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid emulsion were mixed with 50  $\mu$ L of crude extract solution and incubated in a water bath at 50 °C. Oxidation of the emulsion was monitored spectrometrically by measuring absorbance at 470 nm over a 120 minutes period, in intervals of 20 minutes. The control sample contained 50  $\mu$ L of solvent in place of the extract. The antioxidant activity was expressed as a percentage of inhibition relative to the control after 120 minutes of incubation using the equation:

$$AA = \frac{DR_C - DR_S}{DR_C} \times 100$$

Where AA = antioxidant activity.

$DR_C$  is the degradation rate of the control ( $= A_{C0} - A_{C120}$ );  $A_{C0}$  is the initial absorbance at time 0, and  $A_{C120}$  is the absorbance at 120 minutes.

$DR_S$  is the degradation rate in the presence of the sample ( $= A_{S0} - A_{S120}$ );  $A_{S0}$  is the initial absorbance at time 0, and  $A_{S120}$  is the absorbance at 120 minutes.

The crude extract and wheat bran samples were evaluated at concentrations of 500 and 1000  $\mu$ g/mL, and  $\alpha$ -tocopherol and BHT (200  $\mu$ g/mL) were used as positive controls.

## **Cytotoxic assay**

### ***Cell culture and cytotoxic activity***

The HeLa (Human Cervix Cancer) cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub>, using a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) at pH 7.4. Gentamicin (10 µg/mL) was used as an antibiotic. Cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Gaithersburg, MD) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium salt (MTT) from Sigma. On the first day, cells were detached and seeded in a 48-well plate (2.0 x 10<sup>4</sup> cells/well). After 24 hours the medium was exchanged. Solution of the crude extract and wheat bran extract were prepared in DMSO (vehicle). The final concentrations (400, 300 and 200 µg/mL) were achieved by direct dilution into the cell medium. The samples or the vehicle were added and incubated for a period of 48 hours. After this interval, 50.0 µL of a MTT solution (5.0 mg/mL in PBS) were added to each well and the cells were incubated for an additional 3 hours (MOSMANN, 1983). Subsequently, the medium was removed, cells were washed two times with PBS, and 300 µL of isopropanol-HCL (0.04 mol/L) were added. Cell viability was determined by absorbance measurements at 570 nm.

### **Statistical analysis**

All of the data was expressed as a mean ± s.d. from at least three separated experiments (repetitions) performed in triplicate. The ANOVA test for unpaired observation between controls and experimental samples and Tukey's test for multiple comparisons were conducted to evaluate statistical differences; *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Isolation of endophytic fungi**

22 strains of endophytic fungi were isolated and identified from coffee leaves (*Coffea arabica* L.), as listed in Table I.

TABLE I: Endophytic fungi isolated from coffee (*Coffea arabica* L.)

Code	Identification
CML 370	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CML 450	<i>Hypoxilan</i> sp.
CML 451	<i>Phomopsis</i> sp.
CML 452	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CML 453	<i>Phoma herbarum</i>
CML 455	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
CML 456	<i>Xylaria</i> sp.
CML 457	<i>Colletotrichum crassipes</i>
CML 706	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>
CML 865	<i>Pseudohalonestria lutea</i>
CML 866	<i>Staninwardia</i> sp.
CML 867	<i>Alternaria alternata</i>
CML 868	<i>Periconia</i> sp.
CML 869	<i>Paraclothyrium</i> sp.
CML 870	<i>Libertella</i> sp.
CML 871	<i>Phomopsis stipata</i>
CML 872	<i>Myrothecium roridum</i>
CML 873	<i>Microascus</i> sp.
CML 874	<i>Leptosphaeria</i> sp.
CML 875	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
CML 876	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
CML 877	<i>Guignardia</i> sp.

Sette *et al.* (2006) isolated and identified 37 endophytic filamentous fungi from coffee plants (*Coffea arabica* and *C. robusta*), which were studied with respect to the production of antimicrobial compounds against human pathogenic bacteria. The results revealed that, 36 of the endophytic filamentous fungi isolates belong to the Ascomycetes group, including 14 different genera: *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Mycosphaerella*, *Phomopsis*, *Rosellinia*, *Talaromyces*, *Trichoderma* and *Xylaria*.

According to Santamaria and Bayman (2005), having studied endophytic and epiphytic fungal communities associated with coffee leaves (*Coffea arabica*) in Puerto Rico, determined that *Colletotrichum*, *Xylaria* and *Guignardia* are the most common types of endophytes.

### Antimicrobial screening

The screening was conducted by agar diffusion method against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast. All of the crude extracts of fungi isolates inhibited at least one of the microorganisms studied (Table II). The most effective fungus was *Alternaria alternata* (CML 867).

TABLE II: Antimicrobial activity of extracts from fungal fermentation and fungi isolated from *Coffea arabica* host plants.

Active extracts/total extracts tested (%)	Microorganisms		
	Sa	Ec	Ca
	18/22 (81.8)	13/22 (59.1)	8/22 (36.4)

Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922; Ca: *Candida albicans* ATCC 69548.

Species of *Alternaria* are common and prevalent in the mycoflora, infesting and often parasitizing seeds of a wide variety of food crops (SCHROEDER; COLE, 1977).

The results obtained in this screening showed that endophytic fungi are a promising source of bioactive natural products.

The crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) was assessed for several bioactivities such as antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities. The extract obtained from the culture medium (blank) was tested in all of the assays and did not present significant activity, showing that positive results were due to secondary metabolites produced by the fungus.

### Antimicrobial assay

The crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) was assessed for antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*. The MIC and MBFC values of crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) are shown in Table III.

TABLE III: The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal and fungicidal concentration (MBFC) of crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867).

	Microorganisms					
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
	ATCC 6538		ATCC 25922		ATCC 69548	
	MIC <sup>a</sup>	MBC <sup>a</sup>	MIC	MBC	MIC	MFC
<i>Alternaria alternata</i> crude extract <sup>b</sup>	50-100	>800	400-800	>800	>800	>800
Wheat bran crude extract <sup>b</sup>	*	*	*	*	*	*
DMSO	*	*	*	*	*	*

<sup>a</sup> The MIC and MBC values are expressed in  $\mu\text{g/mL}$ . The concentrations of crude extracts ranged from 50 to 800  $\mu\text{g/mL}$

<sup>b</sup> Three replicates were made for each concentration of the extracts for all assays.

\* showed no activity.

Compounds isolated from endophytic fungi also displayed antimicrobial activity. Altersin, a natural product isolated from two endophytic *Alternaria* species, showed potent minimum inhibitory concentration against several pathogenic Gram-positive bacteria

(HELLWIG *et al.*, 2002), suggesting that this compound could be present in the crude extract of the fermentation of *Alternaria alternata* (CML 867), requiring subsequent confirmation.

In accordance with Lin *et al.* (2007), in the study of the medicinal plant *Camptotheca acuminata*, 174 endophytic fungi were isolated. Of the 18 taxa obtained, *Alternaria* (12.6%) was dominant, among others. Of the 22 *Alternaria* extracts tested, three showed antimicrobial activity.

Of the 67 endophytic fungi isolated from *Quercus variabilis*, 19.4% (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Alternaria* sp.) showed significant antimicrobial activity (WANG *et al.*, 2007).

Phongpaichit *et al.* (2006) isolated 377 fungi and its fermentation broths were tested for antimicrobial activity. The results revealed that 6-10% and 1% of the crude ethyl acetate extracts inhibited both strains of *S. aureus* (MIC 32-512 µg/mL) and *C. albicans* (MIC 64-200 µg/mL), respectively.

Were tested 37 endophytic filamentous fungi isolated from coffee plants (*Coffea arabica* and *Coffea robusta*) with respect to their production of antimicrobial compounds against human pathogenic bacteria such as *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and four different *Escherichia coli* serotypes. Seventeen fungi inhibited at least one of the bacteria studied (SETTE *et al.*, 2006).

### **Antioxidant assay**

The crude extract of fungus *Alternaria alternata* (CML 867) was evaluated for its antioxidant activity in the DPPH assay and by  $\beta$ -carotene/linoleic acid system oxidation as shown in Figure 1 and Figure 2, respectively.

The radical DPPH scavenging activity model is a classic, simple and rapid method of assessing antioxidant activity (GÜLÇİN; ALICI; CESUR, 2005). The extracts used and the standards, butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid, were assessed at a concentration of 100 – 1000 µg/mL.



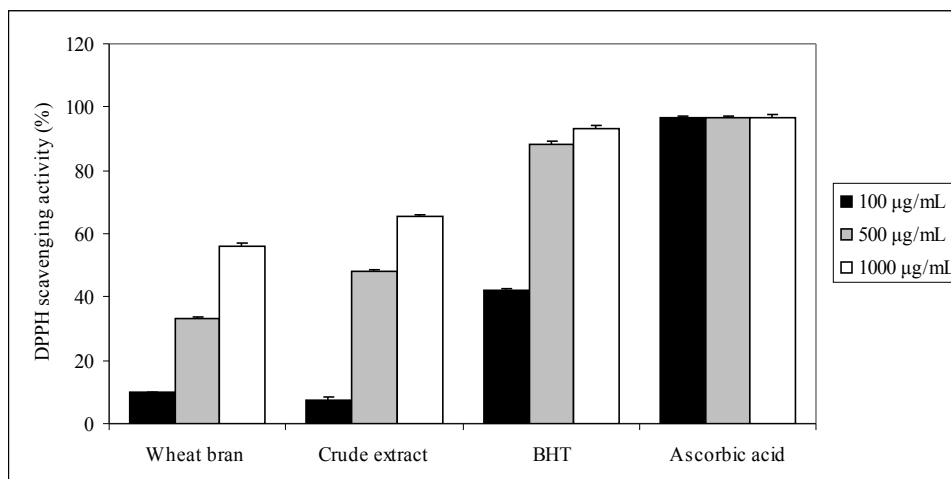


FIGURE 1 – DPPH scavenging activity of BHT, ascorbic acid, and the crude extracts from *Alternaria alternata* (CML 867) and wheat bran at different concentrations.

In a concentration of 100 µg/mL, the crude extract of the endophyte showed less significance ( $p < 0.05$ ), in relation to the crude extract of wheat bran. In concentrations of 500 and 1.000 µg/mL, a significant difference between the fungus' and wheat bran's crude extracts' sequestering capability of DPPH radicals indicates the presence of antioxidant compounds in the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867). This extract presented a sequestering potential of approximately 8 times less than the standard BHT, with  $IC_{50}$  of 86.7 and 687.2 µg/mL, respectively. The  $IC_{50}$  values were obtained from the plot of absorbance against concentration for each sample. The  $IC_{50}$  is the sample concentration that lead 50% less scavenging capacity.

In the  $\beta$ -carotene-linoleic acid assay, the linoleic acid free radical attacked the highly unsaturated  $\beta$ -carotene models. The presence of different antioxidants can hinder the extent of  $\beta$ -carotene bleaching by neutralizing the linoleate radicals formed in the system (SHON; KIM; SUNG, 2003).

The negative control, ethanol control, showed the ineffectiveness of the vehicle used in the inhibition of the oxidation of the system, observed by the reduction of the inhibition rate (Figure 2). The standards effectively showed, over time, that they are able to maintain the values of inhibition at 120 minutes at  $84.7 \pm 1.9$  and  $90.7 \pm 2.2\%$ .

The crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) presented a dose-dependent response. There was no significant difference between the activity of the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) at 500 µg/mL and the crude extracts of wheat bran at 500 and

1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p > 0.05$ ). At 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the endophytic extract presented an inhibition rate ( $56.4 \pm 3.9 \%$ ,  $p < 0.001$ ) significant to that of the crude extract of wheat bran in the same concentration, showing that the action of the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) is independent of the action of the wheat bran.

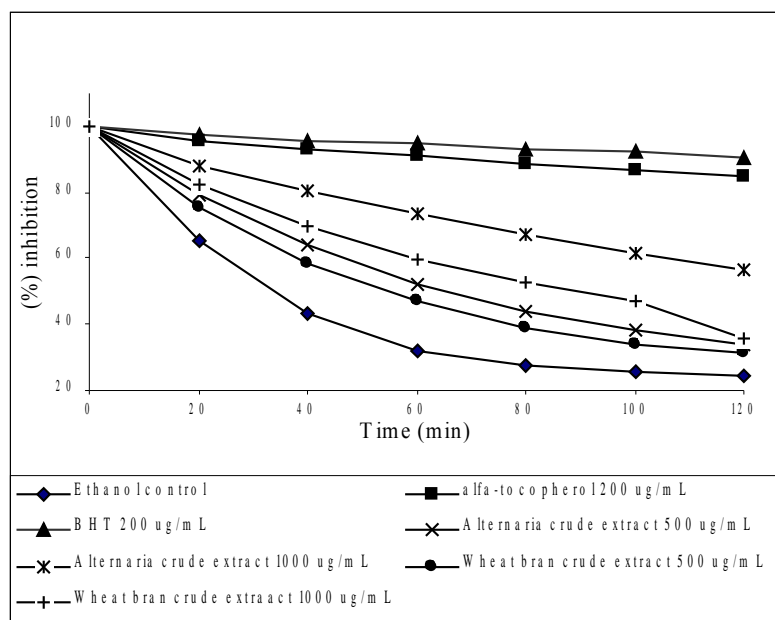


FIGURE 2 – Inhibition rate of oxidation of  $\beta$ -carotene-linoleic acid system by *Alternaria alternata* (CML 867) crude extract at different concentrations in comparison with the wheat bran crude extract and the standards.

The data reinforces that the substrate used in the fermentation process interfered significantly in the determination of antioxidant activity, as this substrate already possessed this ability. According to Soares (2002), wheat bran extract was described as an important antioxidant agent due to the presence of considerable quantities of phenolic acids, such as protocatechuic, gentisic, caffeic, vanilic, chlorogenic and pterulic.

Phenolic compounds seem to have an important role in stabilizing lipid oxidation and are associated with antioxidant activity, which is emphasized in several reports (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001). Therefore, in this work, we determined the total phenolic content of the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) and wheat bran, obtaining values of 16.90 and 13.47  $\mu\text{g}$  GAE/mg of dry crude extract, respectively.

The difference of phenolic content, which was 3.44  $\mu\text{g}$  GAE/mg of dry crude extract, can be related to the major activity of the endophyte crude extract with respect to the wheat bran extract in the different models of antioxidant activity. However, the content of total phenolics depends on the solvent used in the extraction. In the study of different extracts of

endophyte *Xylaria* sp, Liu *et al.* (2007) proved that extracts obtained from more polar solvents present a higher amount of total phenolics. In our study, the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867), obtained through the extraction with dicloromethane, presented a lower amount of total phenolics, as did the chloroformic extract of *Xylaria* sp. ( $12.66 \pm 0.92 \mu\text{g}$  GAE/mg dry weight of the fruiting bodies) described by Liu *et al.* (2007). The analysis of 292 endophytes isolated from 29 traditional Chinese medicinal plants evidenced that the antioxidant capacities of endophytic fungal cultures were significantly correlated with their total phenolic content (HUANG *et al.*, 2007). This relationship was also observed in the present study.

A comparison the antimicrobial activity and antioxidant activity in relation to the amount of total phenolics of different propolis extracts, certified that a moderate correlation exists between the amount of total phenolics and the biological activity. In one group of extracts there was a strong linear relationship between total phenol contents and the measured activities, while in the other group this relationship was weaker (SILVA *et al.*, 2006). In this context, the crude extract of the endophyte *Alternaria alternata* (CML 867) presented a greater antimicrobial activity, a moderate antioxidant activity in the tested concentrations, and overall, presented a lower total phenolic content.

### Cytotoxic assay

The results of the cytotoxic activity of the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) are shown in Figure 3.

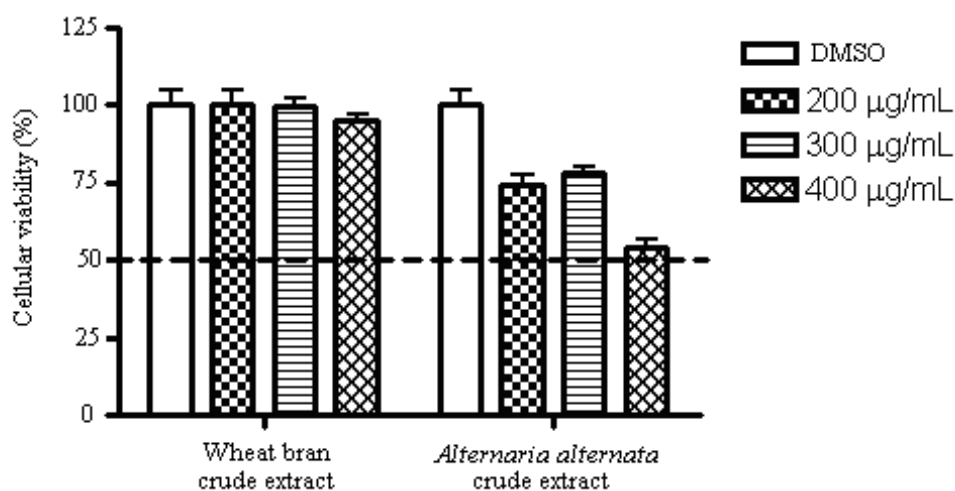


FIGURE 3 – Cytotoxic analysis of crude extract of wheat bran and *Alternaria alternata* (CML 867) for HeLa cells. The data represent averages of three independent experiments performed in triplicate.

The cytotoxic assays showed moderate activity of the crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) on the viability of HeLa cells *in vitro*, when compared to the DMSO treated cells. Three concentrations were tested varying between 200-400 µg/mL and it was determined that, in the concentration of 400 µg/mL, the crude extract of the endophyte was able to inhibit about 50% of cell proliferation in HeLa cells. In this test, the crude extract of wheat bran showed no activity under the tested cells. The crude extract of *Alternaria alternata* (CML 867) presented a dose-dependent response.

Several cytotoxic compounds have been isolated from endophytic fungi, showing the potential of these fungi in the search for antitumoral agents (GUIMARÃES *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2007) demonstrated for the first time that Alternol, a new compound purified from the fermenting products of *Alternaria alternata* var. *monosporus*, from the bark of Yew, was found to inhibit proliferation and induce apoptosis in mouse lymphocyte leukemia L1210 cells. Alternol induced the activation of caspase-3, caspase-9, but not caspase-8. Moreover, there was a significant increase in reactive oxygen species (ROS) which might also play a role in apoptosis. Based on this study, we can suggest that *Alternaria alternata* (CML 867) can also be able to produce this compound with cytotoxic activity under HeLa cells.

Firáková, Sturdíková and Múcková (2007) presented the overview of bioactive secondary metabolites with anticancer activity produced by endophytes, for example, camptothecin of a fungal endophytic isolate, podophyllotoxin, aryltetralignans of *Trametes hirsuta*, cytoskyrins of *Curvularia lunata*, macrolides of *Streptomyces* sp. Is9131 and brefeldine A of *Phoma medicaginis*, among others.

Therefore, endophytic fungi play an important role in the search for antitumoral compounds and might also represent an alternative source for the production of therapeutic agents that are not easily obtained by chemical synthesis. The potential of these fungi is of great interest and deserves further investigation.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Unifal-MG and Proapi-Capes for financial support.

## REFERENCES

- AHN M-R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K-S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 7286-7292, 2004.
- ARNOLD, A. E.; ZULEYKA, M.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, v.3, p. 267-274, 2000.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement* CLSI document M100-S15. Wayne, PA, 2005, 177 p.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, n.4, p. 527-531, 2003.
- FIRÁKOVÁ, S; STURDÍKOVÁ, M; MÚCKOVÁ M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava, Section Botany*, v. 62, n. 3, p. 251-257, 2007.
- GUANATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.*, v. 69, p. 509-526, 2006.
- GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 52, p. 134-144, 2008.
- GÜLÇİN, İ.; ALICI, H. A; CESUR, M. Determination of *in vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. *Chem. & Pharm. bulletin*, v.53, n.3281, p.281-285, 2005.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.*, v. 95, p. 641-655, 1991.
- HELLWIG, V.; GROTHE, T.; MAYER-BARTSCHMID, A.; ENDERMANN, R.; GESCHKE, F. U.; HENKEL, T.; STADLER, M. Altersin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *J. Antibiotic.*, v. 55, p. 881-892, 2002.
- HUANG, W-Y.; CAI, Y-Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2007.

KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biol.*, v. 45, p. 141-148, 2000.

LI, Y.; SONG, Y. C.; LIU, J. Y.; MA, Y. M.; TAN, R. X. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fangal cultures. *World J. of Microbiol. Biotechnol.*, v. 21, p. 553-558, 2005.

LIN, X.; LU, C.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, p. 1037-1040, 2007.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIAN, M., LV, X; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Gingko biloba*. *Food Chem.*, v. 105, p. 548-554, 2007.

LIU, Z-Z.; ZHU, J.; SUN, B.; LIU, S.; GENG, S.; LIU, X.; LI, C-L. Alternol inhibits proliferation and induces apoptosis in mouse lymphocyte leukemia (L1210) cells. *Mol. Cell. Biochem.* v. 306, p. 115-122, 2007.

LORIAN, V. (1996) *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edn. Williams and Wilkins, Baltimore, 330 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEWMAN D. J.; CRAGG G. M.; SNADER K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

PETERSEN, P. J.; WANG, T. Z.; DUSHIN, R. G.; BRADFORD, P. A. Comparative *in vitro* activities of AC98-6446, a novel semisynthetic glycopeptide derivate of the natural product mannopeptimycin alpha and other antimicrobial agents against Gram-positive clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemoth.* v. 48, p. 739-746, 2004.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins*, v.1, p. 185-196, 1992.

PETRINI, O.; STONE J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in wester Oregon: a preliminary study. *Canadian J. of Botany*, Ottawa, v. 60, p. 789-796, 1982.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 48, p.367-372, 2006.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbiol. Ecology* v. 50, p. 1-8, 2005.

SCHROEDER, H. W.; COLE, R. J. Natural Occurrence of Alternariols in Discolored Pecans. *J. Agric. Food Chem.* v. 25, n.1, p. 204-206, 1977.

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

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 22, p. 1185-1195, 2006.

SHON, M. Y.; KIM, T. H.; SUNG, N. J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chem.*, v. 82, p. 593-597, 2003.

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem.*, v. 99, p. 431-435, 2006.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, p. 79-83, 2007.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.*, v.37, n.2, p.99-105, 1998.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Inhibiting oxidation. In J. Pokorny, N. Yanishlieva & M. H. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: Practical applications*. Cambridge: CRC Press, Woodhead Publishing Limited, 2001, p. 22-70.

YEN W.J.; CHANG, L.W.; DUH, P.D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. *Food Science and Technol.*, v. 38, n. 3, p.193-200, 2005.

### 3 CONCLUSÕES

Foram isolados 22 fungos endófitos de café (*Coffea arabica* L.) entre os quais foi selecionado o fungo *Alternaria alternata* (CML 867) para dar prosseguimento ao trabalho.

O extrato bruto da fermentação apresentou valores de CIM variando entre 50-100 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, 400-800 µg/mL para *Escherichia coli* e CIM > 800 µg/mL para *Candida albicans*. A CBFM foi > 800 µg/mL para todos os microrganismos testados.

Na avaliação da atividade antioxidante, o extrato apresentou uma atividade moderada nos dois métodos de análise, quando utilizada a concentração de 500 µg/mL no método do DPPH e de 1000 µg/mL no método da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico .

O conteúdo de fenólicos totais do extrato bruto do endófito foi de 3,44 µg EAG/mg de extrato bruto.

O ensaio de citotoxicidade mostrou uma atividade moderada do extrato bruto do *Alternaria alternata* (CML 867) na viabilidade de células HeLa *in vitro* na concentração de 400 µg/mL . Esta inibição foi em torno de 50% da viabilidade celular.

Fungos endófitos são de grande interesse por produzirem uma diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas. Estudos posteriores devem ser realizados para se esclarecer quais compostos são responsáveis pelas atividades encontradas no extrato da fermentação do endófito *Alternaria alternata* (CML 867).



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. R. **Fungos endófitos e espécies de *Phoma* associadas ao cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2007. 84f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ALTERNARIA alternata. Disponível em: [www.mycobank.org/mycotaxo.aspx](http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx) e [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy) Acesso em: 28 mai. 2008.
- ARNOLD, A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, n. 4, p.267-274, 2000.
- ARNOLD, A. E. et al. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 26, p. 15649-15654, 2003.
- 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, April 2000. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/4.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2008.
- BACON, C. W.; WHITE J. F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON C. W.; WHITE J. F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 237-261.
- BARREIRO, E. J.; VIEGAS C. J.; BOLZANI V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- BOYLE, C. et al. Endophyte-host interactions III. Local vs systemic colonization. **Symbiosis**, Rehovot, v. 31, p. 259-281, 2001.
- BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, A new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1447-1448, 2000.
- CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae), **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CAI, Y. Z. et al., Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v.74, p.2157-2184, 2004.
- CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama forest Reserve, Guyana. **Mycology**. New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, 2002.
- CARROL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CASTILHO, U. et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 183-190, 2003.

CENTENO, S.; CALVO, M. A. Mycotoxins produced by fungi isolated from winw cork stoppers. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, p. 267-269, 2002.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 3, p. 321-322, 1996.

CHOMCHEON et al. 3-Nitropropionic Acid (3-NPA), a Potent Antimycobacterial Agent from Endophytic Fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1103-1105, 2005.

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, Brooklin, v. 74, p. 1767-1777, 1993.

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

EZRA, D.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, v. 150, n. 12, p. 4023-4031, 2004.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia, Bratislava, Section Botany**, v. 62, n. 3, p. 251-257, 2007.

FISCHER, P. J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 137-143, 1992.

GUANATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUIMARÃES, D. O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 134-144, 2008.

HARPER, J. K. et al. Pestacin: a 1,3-dihidro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n.14, p. 2471-2476, 2003.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.

HUANG, W. Y. et al. A Potential Antioxidant Resource: Endophytic Fungi from Medicinal Plants. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2007.

HUANG, Y. et al., Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mawei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 163-167, 2001.

KLENKE, C. et al. New secondary metabolites from the Marine Endophytic Fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1058-1063, 2004.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO J. D. Bacterial Endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON C.W., WHITE J. F. (eds). **Microbial Endophytes**. Marcel Dekker, ISBN 0-8247-8831, New York, 2000.

KUSARI, S. et al. An Endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces Hypericin. **Journal of Natural Products** v. 71, n. 2, p. 159-162, 2008.

LI, Y. et al. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 553-558, 2005.

LIN, Z.-J. et al. Penicillanols from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin** v. 56, n. 2, p. 217-221, 2008.

LIN, X. et al. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1037-1040, 2007.

LIU, J. Y. et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 279-287, 2004.

LIU, C. I. et al. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

LIU, X. et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 78, n. 2, p. 241-247, 2008.

LIU, X. et al. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 548-554, 2007.

LIU, Z. Z. et al. Alternol inhibits proliferation and induces apoptosis in mouse lymphocyte leukemia (L1210) cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 306, p. 115-122, 2007.

LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67–73, 2000.

MANN, J. et al. **Natural products: their chemistry and biological significance**. Longmann: Harlow, 1994, 455 p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

OSBOURN, A. Host-microbe Interactions: Molecular Intimacy Exposed: Probing Plant-Fungus Interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, p. 363-364, 2001.

PARK, J. H. et al. Griseofulvin from *Xylaria* sp strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 112-117, 2005.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.pdf> Acesso em: 10 mar. 2008.

PETERSON, S. W. et al. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. **Mycologia**, v. 97, n.3, p. 659-666, 2005.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.

PHONGPAICHIT, S. et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 367-372, 2006.

PHONGPAICHIT, S. et al. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 517-525, 2007.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRACHYA, S. et al. Cytotoxic Mycoepoxydiene Derivatives from an Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. Isolated from *Hydnocarpus anthelminthicus*. **Planta Medica** v.73, p. 1418-1420, 2007.

PURI, S. C., et al. An Endophytic Fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, 2005.

PURI, S. C., et al. The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**. v. 122, n.4, p. 494-510, 2006.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, Cambridge, v. 151, n. 3, p.705-716, 2001.

RODRIGUES, H. G. et al. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.56, n.2, p. 79-85, 2005.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1996, p. 57-69.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, p. 24-33, 2005.

RUDGERS, J. A.; SWAFFORD, A. L. Benefits of a fungal endophyte in *Elymus virginicus* decline under drought stress. **Basic and Applied Ecology**, Article in Press, (2008).

SAIKKONEN, K. et al. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SAIKKONEN, K. et al. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319-431, 1998.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v. 50, p. 1-8, 2005.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

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

SETTE, L. D. et al. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p. 1185-1195, 2006.

SILVA, G. H. et al. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

SILVA, J. F. M. et al. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

SONG, Y. C. et al. Characterization of Graphislactone A as the antioxidant and Free Radical-Scavenging Substance from the Culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an Endophytic Fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506-509, 2005.

SONG, Y. C. et al. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, p. 67-72, 2004.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strynos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, 2004.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v.5, p. 534 - 535, 2003.

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

STROBEL, G.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p. 179-183, 2002.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A. et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T. S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, Bangalore, v. 85, p. 489-493, 2003.

TAN, R. X; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TELES, H. L. et al. Benzopyrans from *Curvularia* sp. an endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2363-2367, 2005.

[VEGA, F. E.](#) et al. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, v. 98, n. 1, p. 31-42, 2006.

WANG, J. et al. Brefeldin A a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis* . **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 51-57, 2002.

WANG, F. W. et al. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 79-83, 2007.

WEBER, D. et al. Phomol, a new antiinflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **Journal of Antibiotics**, Tóquio v. 57, p. 559-563, 2004.

WEBER, R. W. S. et al. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 886-892, 2007.

WHITE JR., J. F. et al. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development symbiotic interaction with plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 33, p. 201-213, 2002.

WIYAKRUTTA, S. et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

ZHAO, P. J. et al. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp is9131 **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 1228-1232, 2005.