



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E PRODUÇÃO DE
L-ASPARAGINASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
CONFREI (*Symphytum officinale* L.)**

DIOGO HENRIQUE GALIZA LOPES

RECIFE

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E PRODUÇÃO DE
L-ASPARAGINASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
CONFREI (*Symphytum officinale* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.
Área de Concentração: Fungos de Interesse Industrial

Nome: Diogo Henrique Galiza Lopes

Orientadora: Keila Moreira Aparecida

Co-orientadora: Marília de Holanda Cavalcanti Maciel

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lopes, Diogo Henrique Galiza

Potencial antimicrobiano e produção de L- Asparaginase por fungos endofíticos do
confeiteiro (*Symphytum officinale* L.) / Diogo Henrique Galiza Lopes. – Recife, 2016.

46 f.: il.

Orientadores: Keila Moreira Aparecida, Marília de Holanda Cavalcanti
Maciel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos,
2016.

Inclui referências e anexos

1. Fungos 2. Enzimas de fungos 3. Plantas medicinais I. Aparecida,
Keila Moreira II. Maciel, Marília de Holanda Cavalcanti III. (orient.) II.
Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-398

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E PRODUÇÃO DE
L-ASPARAGINASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
CONFREI (*Symphytum officinale* L.)**

DIOGO HENRIQUE GALIZA LOPES

Data da defesa: 24/02/2016

**COMISSÃO EXAMINADORA
MEMBROS TITULARES**

Dra. Keila Aparecida Moreira (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Lidiane Roberta Cruz da Silva
Membro Externo

Dra. Laura Mesquita Paiva
Membro Interno

Dra. Erika Valente de Medeiros
Suplente Externo

Dra. Cristina Maria de Souza Motta
Suplente Interno

Dedico à minha família, em especial aos meus pais, que sempre acreditaram na minha formação e sempre deram apoio com uma educação de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por me oferecer o dom da vida, a sabedoria e o discernimento para executar todas as coisas que faço.

Aos meus pais, Carmem D. G. O. Lopes e Marcos A. A. Lopes, que sempre acreditaram em mim e nunca mediram esforços para me oferecer uma educação de qualidade. Aos meus irmãos, Marcos Lopes Júnior e Viviane Lopes, que sempre me incentivaram, mostrando-me companheirismo e amizade. Às minhas tias, Cleide Galiza e Lúcia Galiza, que são exemplos de vitória conquistada por esforços do estudo.

À minha noiva Micalyne Egito, pelo apoio e incentivo na vida estudantil, sendo uma das responsáveis por chegar onde cheguei. Ainda por todo amor, carinho, paciência e exemplo de pessoa que és. Muito obrigado!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Micologia e seus respectivos laboratórios que ajudaram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Laboratório de Citologia e Genética de Fungos, no qual este trabalho foi desenvolvido.

À minha orientadora Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira pela confiança depositada em mim, e a Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel pela co-orientação.

À Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta e a equipe da Micoteca URM – Profa. Maria Auxiliadora Cavalcanti pelo apoio.

À Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva, que sob coordenação do Laboratório de Citologia e Genética, permitiu o desenvolvimento do projeto no mesmo. Além de ser exemplo de profissional e pessoa.

À grande equipe do Laboratório de Citologia e Genética de Fungos, que sempre auxiliaram no desenvolvimento do trabalho, seja na prática ou na observação de alguns pontos relevantes do trabalho. Obrigado a todos!

Aos doutorandos Renan Nascimento e Marília Gomes que sempre estiveram dispostos a auxiliar no desenvolvimento do trabalho, estando sempre à disposição e não mediram esforços na ajuda.

Aos amigos da turma do mestrado (2014) pelo companheirismo, auxílio e descontração no momento certo. Em especial à Ana Lúcia, Ana Medeiros, Crisdiano Araújo, Isabela Lima, Julyanna Fonseca, Marina Araújo e Vanilla Mergulhão.

Aos amigos em Cristo, Robson Duarte, Claudiane Duarte, Ulisses Duarte Leandro Barbosa, Everton Melo, Rhayssa Annecceto, Natali Egito, Márcio Melo Jr. e Micalleyde Egito pela amizade, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho.

RESUMO GERAL

Micro-organismos endofíticos são definidos como aqueles que vivem no interior dos tecidos das plantas sem causar danos aparente ao hospedeiro. Os fungos endofíticos são importantes fontes de novos produtos naturais com atividade biológica. A planta herbácea *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae), conhecida como confrei, tem sido utilizada em diferentes formas terapêuticas. O objetivo desse estudo foi de avaliar o potencial antimicrobiano e a produção de L-asparaginase por fungos endofíticos do confrei (*S. officinale* L.). O material vegetal foi coletado no Centro de Educação e Formação em Medicina Popular (CEFOMP), Paulista-PE, e processada no Departamento de Micologia. A identificação dos endofíticos foi realizada por taxonomia clássica e os isolados que mostraram melhor desempenho nos testes antimicrobiano e enzimático foram identificados utilizando ferramentas da Biologia Molecular. Os micro-organismos utilizados na atividade antimicrobiana foram *Enterobacter aerogenes* (UFPEDA 348), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Candida albicans* (URM 7095), *C. lusitaniae* (URM 2101) e *C. parapsilosis* (URM 5789), e executados através da técnica de bloco de gelose. Quanto à produção da enzima, inicialmente foi verificado sua produção em meio líquido e posteriormente caracterizadas parcialmente. Foram isolados 117 endofíticos de 105 fragmentos e 11 gêneros identificados, além de muitos serem agrupados como *Mycelia sterilia*. Os isolados de *Penicillium* apresentaram os melhores resultados frente aos testes e teve sua identificação morfológica autenticada por meio do sequenciamento do DNA. Na atividade antimicrobiana, o isolado *P. citrinum* R4.5 obteve o maior halo de inibição frente as bactérias *S. aureus* e *E. aureogenes* (1,3 cm). O isolado *P. citrinum* F2.12 obteve maior resultado na produção da enzima (0,175 U/ml) e foi selecionado para posterior avaliação de efeito e estabilidade ao pH e a temperatura. A atividade mais elevada da L-asparaginase foi observada em solução tampão Tris-HCl pH 8,6 (0,0116 U/mL) e obteve mais de 50% da sua atividade quando incubada por 30 min e 46,91% quando incubada a 1h. Apresentou a atividade máxima a 40 °C (0,092 U/ml) e foi estável por 1h, mantendo-se entre 10-13,5% de sua atividade. Já no tempo de 30 min a enzima não mostrou estabilidade. Endofíticos da *S. officinale* são produtores de metabólitos bioativos de potencial uso medicinal, e são indicados para futuros estudos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. Atividade antimicrobiana. Biotecnologia.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are defined as those who live inside plant tissues without causing apparent damage to the host. The endophytic fungi are important sources of new natural products with biological activity. The *Symphytum officinale* herbaceous L. (Boraginaceae), known as comfrey, has been used in various therapeutic methods. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential and the production of L-asparaginase by endophytic fungi from comfrey (*S. officinale* L.). The plant material was collected in the Center for Education and Training in Popular Medicine (CEFOMP), Paulista-PE and processed in the Department of Mycology. The identification of endophyte was performed by classical taxonomy and isolates that showed improved performance in the enzymatic and the antimicrobial tests were identified using molecular biology tools. The micro-organisms used in antimicrobial activity were *Enterobacter aerogenes* (UFPEDA 348), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Candida albicans* (URM 7095), *C. lusitaniae* (URM 2101) and *C. parapsilosis* (URM 5789), and run through agarose block technique. Regarding the production of the enzyme, was initially verified their production in a liquid medium and subsequently partially characterized. 117 endophytic 105 fragments and 11 genera identified were isolated, and many are grouped as Mycelia sterilia. The *Penicillium* isolates showed the best results in view of tests and had a certified morphological identification through DNA sequencing. The antimicrobial activity, the isolated *P. citrinum* R4.5 had the highest inhibition zone front bacteria *S. aureus* and *E. aureogenes* (1.3 cm). The isolated *P. citrinum* F2.12 obtained result in higher production of enzyme (0.175 U / ml) and was selected for further evaluation of effects and stability to pH and temperature. The highest activity of L-asparaginase was observed in solution pH 8.6 Tris-HCl buffer (0.0116 U / ml) and obtained more than 50% of its activity when incubated for 30 min and 46.91% when incubated with 1h. Showed the maximum activity at 40 ° C (0.092 U / ml) and was stable for 1h, keeping between 10 to 13.5% of its activity. In the 30-min showed the enzyme stability. Endophytic *S. officinale* are producers of bioactive metabolites of potential medical use and are suitable for future studies.

Key-words: Endophytic fungi. Antimicrobial activity. Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>S. officinale</i> : Aspecto geral (A) e aspecto da folha (B).....	17
Figura 2 -	Estrutura química do composto alantoina (A) e do alcaloide pirrolizidínico (B).....	18
Figura 3 -	Reação química catalisada pela enzima L-asparaginase.....	22
Figura 4 -	(A) Halo de inibição a <i>Mycobacterium smegmatis</i> pelo fungo endofítico <i>Colletotrichum</i> sp. 3; (B) Halo de inibição a <i>Enterobacter aerogenes</i> pelo fungo endofítico <i>Penicillium citrinum</i> R4.6.....	34
Figura 5 -	Efeito e estabilidade ao pH da L-asparaginase produzida por <i>P. citrinum</i> F2.12.....	38
Figura 6 -	Efeito e estabilidade a temperatura da L-asparaginase produzida por <i>P. citrinum</i> F2.12.....	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Fungos endofíticos isolados e identificados da planta <i>S. officinale</i>	29
Tabela 2 -	Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados da <i>S. officinale</i>	30
Tabela 3 -	Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana: <i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02); <i>Enterobacter aureogenes</i> (UFPEDA 348); <i>Mycobacterium smegmatis</i> (UFPEDA 71); <i>Candida parapsilosis</i> (URM 5789); <i>Candida albicans</i> (URM 7095); <i>Candida lusitaniae</i> (URM 2101).....	32
Tabela 4 -	Atividade L-asparaginolítica de fungos endofíticos da <i>S. officinale</i> ..	35

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Fundamentação teórica.....	15
2.1	Plantas medicinais.....	15
2.1.1	<i>Symphytum officinale</i> L.....	16
2.2	Fungos.....	18
2.2.1	Fungos endofíticos.....	20
2.3	Atividade antimicrobiana.....	21
2.4	L-asparaginase.....	22
3	Materiais e métodos.....	24
3.1	Coleta do material vegetal.....	24
3.2	Isolamento dos fungos endofíticos.....	24
3.3	Identificação dos fungos endofíticos.....	25
3.3.1	Identificação clássica.....	25
3.3.2	Identificação molecular.....	25
3.3.3	Análise de dados.....	26
3.4	Atividade antimicrobiana.....	26
3.4.1	Micro-organismos.....	26
3.4.2	Atividade antimicrobiana em meio sólido.....	27
3.5	Padronização do inóculo e produção de L-asparaginase.....	27
3.5.1	Atividade L-asparaginolítica.....	27
3.6	Caracterização parcial da L-asparaginase.....	28
3.6.1	Efeito e estabilidade pH e temperatura.....	28
4	Resultados e discussões.....	28
4.1	Isolamento e identificação de fungos endofíticos da <i>S. officinale</i>	28
4.2	Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos.....	31
4.3	Atividade da L-asparaginase.....	35
4.4	Caracterização parcial da L-asparaginase.....	38
4.4.1	Efeito e estabilidade ao pH e temperatura.....	38
5	Conclusão.....	40
6	Referências Bibliográficas.....	41

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos são definidos como aqueles que vivem no interior dos tecidos da planta sem causar danos aparente ao hospedeiro (Azevedo; Araújo, 2007; Bezerra et al., 2013). É um grupo especial de micro-organismos que passam a totalidade ou parte de seu ciclo de vida colonizando tecidos saudáveis da planta hospedeira de forma inter e/ou intracelular (Rodriguez et al., 2009).

A colonização da planta por esses micro-organismos pode desempenhar papel importante na sobrevivência das plantas, com melhoria na absorção de nutrientes (Gasoni; Gurfinkel, 1997; Malinowski et al., 1999), aumentar a resistência do hospedeiro à ação dos predadores e de algumas doenças (Pimentel et al., 2006), desenvolvimento e produção de metabólitos promotores de crescimento como giberelinas (Choi et al., 2005; Rim et al., 2005) e auxinas (Dai et al., 2008). Os endofíticos também auxiliam na adaptabilidade ecológica do hospedeiro por incrementar a tolerância aos estresses bióticos e abióticos (Strobel et al., 1996).

Os fungos endofíticos são importantes fontes de novos produtos naturais com atividade biológica e farmacológica de importância econômica (Debbab et al., 2012; Qui et al., 2012; Ola et al., 2014). Quando associados as plantas medicinais, além de produzir compostos antibacterianos, muitas outras substâncias farmacologicamente ativas com potencial para agir como agentes antitumorais, o taxol produzido por *Pestalotiopsis microspora* e antifúngicos como quercina produzido por *Cryptosporiopsis cryptocandina*. (Katoch et al., 2014). Ainda podem produzir metabólitos secundários, tais como alcaloides, esteroides, compostos fenólicos, terpenoides e peptídeos (Zhao et al., 2011; Kaul et al., 2012). Nos últimos anos, pesquisas sobre a biodiversidade de fungos endofíticos de plantas medicinais e suas funções têm sido amplamente exploradas.

A planta herbácea *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae), popularmente conhecida como confrei, consólide-maior e erva-do-cardeal é uma erva perene, de caule curto, com cerca de 90 cm de altura, sendo suas folhas e raízes usadas de diversas formas terapêuticas desde o século passado (Toledo et al., 2004; Gomes et al., 2007). Essa erva é originária da Europa e da Ásia temperada, naturalizada nos Estados Unidos e introduzida no Brasil (Toledo et al., 2004).

Na medicina popular é utilizada no tratamento de doenças musculoesqueléticas, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésica e atividades antiexsudativas. As folhas são usadas em chás, sucos e saladas no caso de doenças gastrointestinais,

disenterias, inflamações, reumatismo, hemorroidas, tosse, bronquite, irregularidades menstruais, entre outros. Já as raízes apresentam propriedades hemostáticas, podendo ser usada em ferimentos abertos, equimoses e fraturas de ossos (Smith e Jacobson, 2011).

Segundo Roman et al. (2008), a raiz do confrei apresenta propriedades cicatrizantes devido à produção do composto químico alantoína, que favorece a proliferação celular acelerando a regeneração da pele lesada. Também já foram isolados alguns ácidos fenólicos com ação antitumoral e antioxidante (Roman et al., 2008). Além alantoína e ácido carbônico, que são discutidos como princípios farmacologicamente ativos, a planta contém taninos, mucilagem e amido, bem como alcaloide pirrolizidínico (PAs) e os seus N-óxidos. Os últimos são conhecidos por serem hepatotóxico, e possuírem propriedades carcinogênicas e mutagênicas (Benedek et al., 2010). Como resultado dos riscos para a saúde colocados pelos alcaloides, organizações de saúde e alimentos, e as agências de segurança de medicamentos em vários países desenvolveram regulamentos e recomendações sobre a venda e a utilização do confrei (Brown et al., 2015).

Dentre as substâncias antitumorais produzidas por micro-organismos endofíticos pode ser citada a L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) que vem sendo utilizada como agente quimioterápico para o tratamento de câncer em humanos (Capizzi et al., 1984; Sarquis et al., 2004; Theantana et al., 2007, 2009; Lapmak et al., 2010; Soniyambi et al., 2011). A L-asparaginase está presente em vários organismos, incluindo animais, micro-organismos e plantas, no entanto, não é encontrada em seres humanos. Embora a L-asparaginase seja encontrada em várias espécies de plantas e animais, devido à dificuldade no processo de extração desta enzima, outras fontes potenciais, como fungos e bactérias têm-se apresentado como fontes eficazes e de baixo custo dessa enzima (Kumar et al., 2013).

Leveduras e fungos filamentosos têm sido relatados como grande potencial para a produção de L-asparaginase com menores efeitos colaterais ao ser humano (Sarquis et al., 2004; Elshafei et al., 2012; Shrivastava et al., 2012). Fungos endofíticos foram relatados como produtores de L-asparaginase por Theantana et al. (2007, 2009), ao estudarem plantas medicinais da Tailândia, e verificaram que *Colletotrichum*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram os principais gêneros produtores dessa enzima.

Atualmente, os fungos endofíticos são vistos como uma excelente fonte de novos produtos naturais com aplicações promissoras nas indústrias agroquímicas e

farmacêuticas (Siqueira et al., 2011; Kudalkar et al., 2012; Saxena et al., 2014). Sendo assim, pesquisas devem ser incentivadas, pois um número crescente de compostos tem sido isolado a partir de várias espécies de fungos endofíticos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais

Desde o início da história o homem sempre esteve ligado e dependente do vegetal e, por meio de vivências e experiências aprendeu a retirar seu próprio sustento, utilizando-o também para finalidades medicinais, empíricas e simbólicas (Lorenzi; Matos, 2002; Albuquerque, 2005). Utilizadas por grande parte da população mundial, atualmente as plantas medicinais são empregadas como recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas doenças, onde podem se torna mais acessível em relação a outros medicamentos alopáticos (Bevilacqua, 2010; Carneiro et al., 2015).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia que atua na área relacionada a produtos e serviços que possam afetar a saúde da população brasileira, planta medicinal é toda a planta ou partes dela que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). Assim, todos os medicamentos fitoterápicos são medicamentos obtidos exclusivamente de matéria-prima vegetal. Para regulamentação dos fitoterápicos no Brasil como medicamentos convencionais, a ANVISA exige que apresente critérios de qualidade, segurança e eficácia, através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas de estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (Carneiro et al., 2015).

O Brasil apresenta uma rica biodiversidade de espécies de plantas associadas com uma longa tradição fitoterápica, e muitas destas plantas são utilizadas sob a forma de extratos brutos, infusões ou emplastros para o tratamento de infecções comuns (Vieira et al., 2012). Detém uma larga diversidade genética, com mais de 41 mil espécies de flora catalogadas e milhares ainda desconhecidas pela ciência (Ministério do Meio Ambiente, 2014), contando com ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre gerações. Apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (Fonseca, 2012).

Intensificado nos anos 90, o uso de medicamento fitoterápico obteve um faturamento mundial de US\$ 12,4 bilhões em 1997. Em 2008 chegou a movimentar US\$ 21,7 bilhões, apresentando uma parcela significativa no mercado de medicamentos.

No Brasil, estima-se que os medicamentos fitoterápicos alcançaram em 2010, 15% da fatia do mercado, movimentando aproximadamente US\$ 2 bilhões em vendas ao ano (Saraiva et al., 2015). O crescimento de fitoterápico atrai atenção e investimentos, já que as vendas internas crescem mais de 15% ao ano, enquanto as vendas de medicamentos sintéticos crescem 4% ao ano. Em toda a cadeia produtiva, o setor de fitoterápicos movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão no Brasil (Carvalho, 2008).

2.1.1 *Symphytum officinale* L.

O gênero *Symphytum* é originário da Europa e Ásia e possui três espécies conhecidas: *Symphytum officinale* L. (Confrei), *S. asperum* Lepechin (Confrei selvagem) e *S. uplandicum* Nyman (Confrei russo). Assim, a palavra confrei faz referência à espécie *S. officinale*. Popularmente é conhecido como confrei, consolda-maior, consólida-maior, orelha-de-asno, erva-do-cardeal, língua-de-vaca e orelha-de-burro (Panizza, 2000; Ferrari et al., 2012). É classificado cientificamente como super-reino: eukaryota; reino: plantae; divisão: magnoliophyta; classe magnoliopsida; ordem: lamiales; família: boraginaceae; subfamília: boraginoideae; gênero: *Symphytum*; espécie: *Symphytum officinale* e nome binomial *Symphytum officinale* L. (Stickel e Seitz, 2000).

É considerada uma planta herbácea e perene que se concentra em uma pequena touceira, podendo atingir até 90 cm de altura. A raiz e o rizoma apresentam uma morfologia semelhante, fusiformes, de comprimento e espessura variáveis, com crescimento perpendicular à superfície, com aspecto mucilaginoso quando frescos, e frágeis e duros após secagem. Na parte externa, apresentam-se de cor amarelo claro a castanho ou negro, com fendas profundas no sentido longitudinal. As raízes apresentam pequenas cicatrizes circulares causadas pelas ramificações laterais. Em secção transversal, mostram-se de cor amarelo claro, podendo-se distinguir um anel central de coloração similar e externamente a este, uma região de tonalidade marrom (Toledo et al., 2006).

Suas folhas apresentam morfologia lanceoladas, de consistência áspera, com ápice agudo, base atenuada e margem levemente ondulada, chega a medir 15-40 cm de comprimento e 4-13 cm de largura. Sua face superior é verde e com nervuras deprimidas e de face inferior com coloração verde mais claro, com nervura principal fortemente desenvolvida e com nervuras secundárias bem aparentes, caracterizando nervação penínervia. O pecíolo é longo e áspero, chegando a medir 27 cm, do tipo

canaletado, de inserção lateral à margem foliar, de aspecto geral reto, e apresenta em toda sua extensão alas laterais (Figura 1). As folhas jovens são longamente pecioladas e as adultas apresentam pecíolos medianos a curtos (Toledo et al., 2004).



Figura 1 - *S. officinale*: Aspecto geral (A) e aspecto da folha (B).

O vegetal tem sido empregado em diversas finalidades medicinais há mais de 2000 anos, e continua a ser utilizado de diversas maneiras em muitos países (Brown *et al.*, 2015). Aproximadamente em 50 d.C., foi utilizado como medicamento para fechar feridas e no tratamento de inflamações. Posteriormente, estudos foram ampliados e a erva foi recomendada para outros fins terapêuticos, como: hemorroidas, gangrena, úlceras, fraturas, furúnculos, dor muscular e entorses (Frost et al., 2014). Na Alemanha, tem sido utilizado na medicina popular desde 1920 para o tratamento relacionado a lesões do sistema musculoesquelético (Smith e Jacobson, 2011). No Brasil, na década de 80, o confrei foi disseminado como planta para a cura de diversas doenças, inclusive o câncer (Oliveira, 2007).

O confrei contém carboidratos, mucilagem, taninos, triterpenos, alantoína e alcaloides (Barnes et al., 2002). A alantoína (Figura 2A) é um composto químico encontrado principalmente na raiz, sendo responsável por estimular a produção de células para regeneração de tecidos conectivos, ossos e cartilagosos, promovendo proliferação celular e cicatrização de feridas (Frost et al., 2014). Estudos realizados com animais em 2011 pela Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*) observaram uma redução do edema na pata quando utilizaram o extrato da raiz do confrei e um aumento no número de fibroblastos e fibras de colágeno ao utilizar o extrato da folha.

Além desses estudos, muitas pesquisas mostram outros efeitos benéficos, como hidratação e efeito queratolítico em tecidos epidérmicos, aumentando assim o teor de água da matriz extracelular e a descamação das camadas superiores de células mortas da pele (Draelos, 2001). Porém, algumas restrições são colocadas devido à presença de alcaloides pirrolizidínico (Figura 2B), os quais estão ligados a hepatotoxicidade e carcinogenicidade. Como resultado desses riscos à saúde, organizações de saúde e alimentos, e as agências de segurança de medicamentos em vários países desenvolveram regulamentos e recomendações sobre a comercialização e utilização do vegetal (Brown et al., 2015).

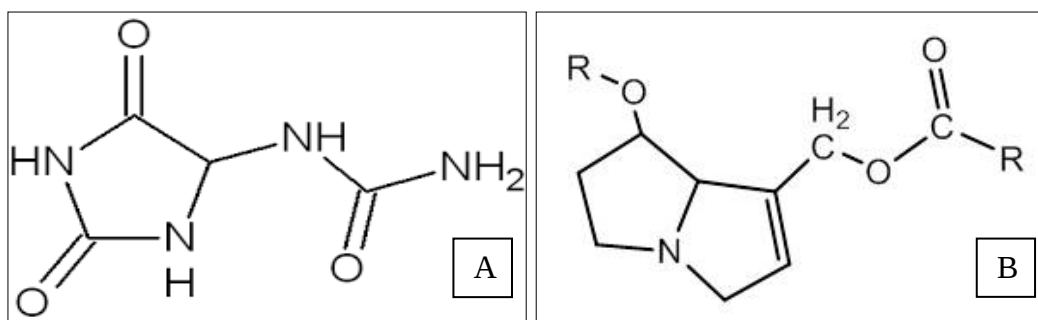


Figura 2 - Estrutura química do composto alantoina (A) e do alcaloide pirrolizidínico (B).

Pesquisas em diferentes países limitou o uso do confrei na alimentação. Em outros países, como foi o caso dos Estados Unidos, no ano de 2001, houve a necessidade da remoção no mercado. A *Food and Drug Administration* (FDA) (), órgão governamental responsável pelo controle de alimentos, solicitou aos fabricantes de suplementos dietéticos a remoção de todos os produtos relacionados ao confrei do mercado (FDA, 2001). Em 2001, a *Food (Standards Australia New Zealand)* (FSANZ) recomendou a ingestão tolerável de alcaloide de 1µg/kg por peso corporal por dia (FSANZ, 2001). Em contra partida, o Instituto Federal para Avaliação de Riscos (BfR) da Alemanha, realizou uma avaliação de risco e concluiu que a ingestão diária deve ser o mínimo possível, sendo tolerável a ingestão de apenas 0,007µg de alcaloide pirrolizidínico por kg de peso corporal.

2.2 Fungos

Os fungos são organismos heterotróficos, uni ou pluricelulares, sendo estes formados por estruturas tubulares e filamentosas, denominadas hifas, que constituem o micélio. As hifas podem ser septadas (presença de septo), ou cenocíticas (ausência de septo). Durante a reprodução, este micélio desenvolve estruturas sexuadas e/ou

assexuadas que dão origem aos esporos, principais agentes de reprodução e propagação das espécies. Nutrem-se por absorção, apresentam parede celular composta geralmente de quitina e possui substância de reserva o glicogênio. São imprescindíveis na manutenção dos ecossistemas devido à ampla distribuição nos ambientes e associação com substratos orgânicos e inorgânicos. Possui um eficiente aparato enzimático capaz de decompor grande parte das substâncias presentes na natureza, transformando-as em recursos para a sobrevivência promovendo a ciclagem de nutrientes do ambiente em que vivem (Webster e Weber 2007).

É estimado entre 1,5 a 5,1 milhões de espécies, das quais apenas 2% a 7% são conhecidas (Blackwell, 2011). Para acessar a diversidade pouco conhecida, recomenda-se investigar ambientes pouco explorados ou realizar o estudo de associações com outros organismos e revisão de coleções nomeadas erroneamente ou que potencialmente representem espécies ainda não descritas (Schimit e Mueller 2007).

Os fungos são cosmopolitas, pois podem viver numa grande variedade de habitats no ecossistema. Podem ser decompositores, sapróbios, parasitas, de interesse médico, entre outros. De acordo com Gomes (2007) e Guerra *et al.* (2009), existem fatores que influenciam no crescimento fúngico como a temperatura, pH, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, demanda de oxigênio e hidrogênio, salinidade e disponibilidade de substrato específico. Alguns são capazes de sobreviver em condições de pH e temperaturas extremas, é o caso dos fungos termofílicos que suportam temperaturas acima de 40 °C, e os psicrófilos que conseguem crescer em condições de temperatura abaixo do congelamento da água.

Estes organismos compõem o Reino *Fungi* e ocorrem em uma vasta gama de ambientes e substratos em todo planeta. Grande parte das espécies é microscópica, enquanto outras formam estruturas macroscópicas e são popularmente conhecidas como cogumelos, orelhas-de-pau, estrelas-da-terra, ninhos-de-passarinhos, boletos, orelhas de burro entre outros (Alexopoulos et al., 1996; Kendrick 2000; Webster e Weber 2007). A classificação mais recente dos fungos é baseada em estudos filogenéticos (Hibbett et al., 2007). De acordo com a literatura, o Reino *Fungi* está subdividido em sete filos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia* e *Neocallimastigomycota*.

2.2.1 Fungos endofíticos

As plantas medicinais em todo o mundo parecem abrigar uma elevada biodiversidade de micro-organismos endofíticos, incluindo muitas espécies de fungos, que possuem a capacidade de produzir moléculas bioativas (Ferreira et al., 2015). O termo "endófito", introduzido por De Bary em 1866, foi designado primeiramente a qualquer organismo encontrado no interior dos tecidos vegetais provocando infecções assintomáticas (Wilson, 1995). Os endófitos vivem de forma simbiótica com o vegetal em forma de micélio. Assim, para se denominar fungo endofítico deve haver presença das hifas no tecido vivo (Kaul et al., 2012). Os endofíticos vêm se tornando eficaz na produção de produtos naturais e provaram ser importantes fontes de novos metabólitos com grande potencial farmacológico (Debbab et al., 2012).

Os fungos endofíticos colonizam os tecidos vegetais de forma inter ou intracelular durante uma parte ou todo o seu ciclo de vida. Consideram-se como uma relação simbiótica com o vegetal, mas, dependendo das condições, podem reverter a alguma forma de patogenicidade (Patil et al., 2015). Apresentam várias formas de adaptações que tenham desenvolvido em ambientes especiais e anormais, tornando-os uma grande fonte de estudo e pesquisa de novos produtos químicos para usos medicinais, industriais e agrícolas (Dos Santos et al., 2015).

Estão relacionados com diversos tipos de vegetais, como plantas herbáceas (Taechowisan et al., 2003), plantas de florestas tropicais (Strobel, 2002), plantas cultivadas (Melnroy; Kloepper, 1995) e plantas medicinais (Huang et al., 2001). Normalmente são obtidos vários isolados de um único vegetal e, a partir deste único hospedeiro, pelo menos uma espécie endofítica se mostra específica, confirmando o fato que os endofíticos são componentes importantes da diversidade microbiana (Tan e Zou, 2001; Strobel e Dayse, 2003).

Os endofíticos podem se propagar verticalmente quando penetram pelas sementes ou pela raiz, horizontalmente quando penetram através dos estômatos ou diretamente na parede celular utilizando apressórios e haustórios (Saikkonem et al., 2004). A colonização endofítica pode ser intracelular e limitada a poucas células, intercelular e localizada, ou ainda inter e intracelular sistêmica e pode se desenvolver em qualquer tecido ou órgão do vegetal, como a raiz, caule, ramos, folhas, flores e frutos (Marinho et al., 2005; Johri, 2006). A identificação dos endofíticos podem ser realizados a partir do seu isolamento em meios de cultura sob observação de seu aspecto, diretamente a partir

de técnicas de microscopia ótica ou pela sua detecção através de técnicas de biologia molecular através da amplificação de DNA (Schulz e Boyle, 2005).

São responsáveis pela produção de compostos secundários, tais como alcaloides, terpenos, esteroides e compostos aromáticos, no qual auxilia o vegetal em sua defesa contra predadores (Porras-Alfaro e Bayman, 2011; Dos Santos et al., 2015). Estudo realizado por Clarke et al. (2006), evidenciou que vegetais colonizados por fungos endofíticos apresentam uma maior resistência em comparação aos não colonizados. Por outro lado, alguns fungos endofíticos são motivos de preocupação na agricultura, pois podem produzir outros metabólitos secundários, micotoxinas, que representam uma ameaça para a saúde humana (Munkvold et al., 1997).

2.3 Atividade antimicrobiana

Os fungos são uns dos principais recursos para a exploração de metabólitos bioativos. Dentre eles, destacam-se os fungos endofíticos por possuir importantes metabólitos biologicamente ativos (Nisa et al., 2015). Com a crescente resistência de medicamentos contra micro-organismo e a existência de novos patógenos, é necessário à busca de novas moléculas bioativas. Os fungos endofíticos isolados de plantas medicinais têm sido adotados como importantes fontes de metabólitos de medicamentos e produtos farmacêuticos (Strobel et al., 2004). Vários estudos levaram à descoberta de importantes plantas produtoras de metabólitos secundários a partir de fungos endofíticos elevando a perspectiva de utilização destes micro-organismos como fontes alternativas (Priti et al., 2009).

Ao longo de 12 anos, um grande número de metabólitos bioativos de fungos endofíticos foram extraído e caracterizado, pertencente a diversos grupos estruturais como: alcaloides, esteroides, terpenoides, peptídeos, policetonas, flavonóides, quinonas, fenóis, xantonas, entre outros. Alguns destes representam grupos estruturais novos, por exemplo, os palmarumycins e um novo benzopyrone (Tan et al., 2001), sendo sintetizados através de diversas vias metabólicas. Lu et al. (2014), caracterizaram um novo composto de palmarumycins produzidos a partir do fungo endofítico *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Borges et al. (2009), propuseram que micro-organismos endofíticos adquiriram a capacidade de biossintetizar através de anos de coevolução e recombinação genética com sua planta hospedeira. Além disso, sua relação simbiótica adaptou-se com vários compostos tóxicos produzidos pela planta, usado como defesa contra outros

organismos. Com isso, a existência de processos de biodegradação e biotransformação por certas enzimas específicas permitiu que os endofíticos sobrevivessem no vegetal (Huang et al., 2015). Extratos de cultura de fungos endofíticos apresentam atividade antimicrobiana contra fungos patogênicos, bactérias e leveduras, atividade citotóxica e atividade antimalárica contra protozoário *Plasmodium falciparum* (Rodrigues et al., 2006).

Ratnaweera et al. (2015), realizaram teste de atividade antimicrobiana a partir da fermentação dos fungos endofíticos isolados da planta *Opuntia dillenii* localizada no sudeste do Sri Lanka. Mostraram que dentre as espécies isoladas, *Fusarium* sp. obteve maior produção do metabólito. Os autores sugerem que é provável que as populações de fungos endofíticos ajudem o vegetal na superação de estresses biótico e abióticos através da produção de metabólitos biologicamente ativos. Com isso, pode fornecer informações úteis na descoberta de novos fármacos.

2.4 L-Asparaginase

A L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) é uma enzima utilizada como catalisador na reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia (Theantana et al., 2009) (Figura 3). Esta enzima é utilizada como agente anticancerígeno para o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) (Verma et al., 2007). No tratamento quimioterápico, a enzima age na remoção da L-asparagina do sangue, privando as células tumorais, controlando, assim, o crescimento do tumor de forma eficaz, uma vez que é um aminoácido essencial para proliferação de células malignas (Chow e Ting, 2014). A L-asparaginase é encontrada em vários organismos, como: plantas, animais, leveduras, fungos, bactérias e arqueobactérias (Shaohua et al., 2014).

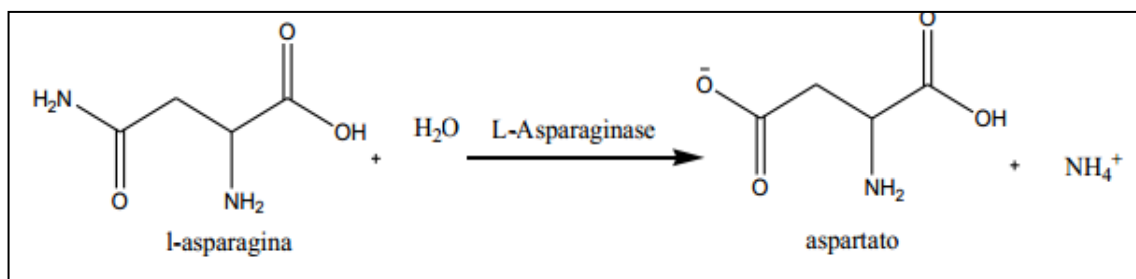


Figura 3 - Reação química catalisada pela enzima L-asparaginase.

A L-asparaginase pode ser produzida a partir de diferentes micro-organismos, no entanto, a enzima produzida a partir das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são consideradas como as melhores para a aplicação médica, visto que exibem uma elevada atividade específica para asparagina e baixo custo (Maloney, 2010). Embora a produção da enzima venha de procariontes e possuem mecanismos de ação e efeitos tóxicos idênticos, as suas propriedades farmacocinéticas são diferentes, gerando resistência a diferentes tipos de pacientes. Apesar da terapia do câncer ser importante, a utilidade médica da L-asparaginase é muitas vezes limitada por dois fatores: a grande variedade de efeitos colaterais associados com a administração da enzima, incluindo imunossupressão e pancreatite, e os efeitos tóxicos que caem em duas principais categorias, aqueles relacionados a sensibilização imunológica de uma proteína estranha e as relacionadas com a inibição da síntese de proteínas (Wang et al., 2003). Assim, com a produção da enzima a partir de fontes biológicas, os efeitos colaterais pode ser diminuído.

Asparagina é um requisito nutricional de células normais bem como as células cancerígenas. Nas cancerígenas apresentam-se em baixos níveis (Theantana et al., 2007). Por esta razão, a enzima é injetada por via intravenosa a fim de diminuir a concentração de L-asparagina no sangue e, desse modo, selecionando as células cancerígenas (Sarquis et al., 2004). Para além do seu uso médico, a L-asparaginase também têm sido caracterizado na formação de acrilamida em alimentos, que é classificada como um provável carcinógeno humano pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1994). Esse tipo de reação resultante na formação de acrilamida acontece geralmente em alimentos à base de amido, particularmente de batatas. Sugerindo assim, que a L-asparaginase tem grande potencial para a utilização na indústria alimentícia (Kornbrust et al., 2009)

Sarquis et al. (2004) relataram que a L-asparaginase de fontes bacteriana podem provocar muitos efeitos colaterais quando utilizada a longo prazo, como anafilaxia e hipersensibilidade, conduzindo reações alérgicas. A busca por outras fontes de L-asparaginase pode levar a uma enzima com menos efeitos adversos. Assim, nos últimos anos, os fungos têm sido investigados como fonte alternativa (Patil et al., 2012). Trabalho realizado por Theantana et al. (2007) com fungos endofíticos de plantas medicinais, afirmaram que 23 isolados exibiram atividades enzimática da L-asparaginase. Theantana et al., (2009), realizaram outros estudos e relataram que espécies de *Colletotrichum* são promissores para produção de L-asparaginase. Santos et

al. (2015) relataram que as espécies de fungos endofíticos *Aspergillus flavus* URM 6887, *A. japonicus* URM 6872, *A. parasiticus* URM 6868, *A. sydowii* URM 6866, *Fusarium oxysporum* URM 6815, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 e *Penicillium brevicompactum* URM 6833 isolados da *Cereus jamacaru* produziram uma quantidade significativa da enzima.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

A coleta do material foi realizada no Centro de Educação e Formação em Medicina Popular (CEFOMP), localizado no município de Paulista, Pernambuco. A região está localizada a 18 km do Recife, situada na zona litorânea norte do estado de Pernambuco. Apresenta clima tropical quente e úmido com chuvas de inverno (março-agosto). Folhas e raízes de cinco exemplares de confrei assintomáticas foram coletadas aleatoriamente. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetados e conduzidas ao Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e processadas no prazo de 24 horas.

3.2 Isolamento dos fungos endofíticos

O material coletado foi previamente lavado em água corrente para remoção de resíduos de poeira e de solo. O material botânico foi processado como descrito por Pereira et al. (1993) e Araújo et al. (2001), as amostras foram cortadas em fragmentos de 5 cm² para raiz e de 1 cm² para folhas. Posteriormente, esterilizadas superficialmente pela sequência de lavagem em etanol 70% durante 90 segundos, hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) durante 120 segundos para folha e 240 segundos para raiz, etanol 70% durante 30 segundos, e em seguida lavados três vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, os fragmentos foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL) para restringir o crescimento bacteriano, e posteriormente as placas foram incubadas a 30 °C por até 30 dias. O crescimento fúngico foi observado diariamente e qualquer colônia de fungo encontrada foi isolada, purificada e mantida em tubos de ensaio com BDA para posterior identificação. Para verificar a eficácia da esterilização da superfície das folhas e raízes, 1 mL da água da última lavagem foi inoculada em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, e as mesmas condições de incubação.

3.3 Identificação dos fungos endofíticos

3.3.1 Identificação Clássica

A identificação foi realizada pela equipe da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), observando-se características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento e diâmetro da colônia) e características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas), utilizando metodologia e literatura específica (Morton e Smith, 1963; Ellis, 1971; Ellis, 1976; Sutton, 1980; Barnett; Hunter, 1987; Hanlin 1990; Samson; Frisvad, 2004; Domsch et al., 2007).

3.3.2 Identificação Molecular

Os isolados que apresentaram melhor desempenho nos testes de atividade antimicrobiana e para produção de L-asparaginase foram selecionados para identificação a nível específico utilizando ferramentas da biologia molecular.

Para identificação molecular, realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Micologia da UFPE, fragmentos do micélio com três dias de crescimento em meio Czapek líquido, foram transferidos para microtubos de extração contendo 800 µL do tampão de lise CTAB 2% (hexadecyltrimethylammonium bromid). Os tubos foram levados ao FastPrep® e agitados a velocidade de 5,5 m/s por 40 seg, para lise mecânica das células. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 40 min e centrifugados a 13.000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL e adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) ao sobrenadante recuperado, homogeneizados e centrifugados a 18.982 RCF por 10 min. Novamente os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos e adicionados volumes iguais de isopropanol gelado aos sobrenadantes recuperados e mantidos a -20 °C por 1h. Em seguida os microtubos foram centrifugados a 18.982 RCF por 10 min. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e acrescentados 50µL de água ultrapura. A concentração final foi determinada usando NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo scientific®) e o material armazenado a -20°C até uso.

A reação de PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA foi realizada em volume total de 50 µL, utilizando tampão da Taq DNA polimerase 1X, 1,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada primer ITS1 (5' –TCCGTAGGTGAACCTGCGG–3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0,2 mM de dNTPs, e 0,2 U de Taq DNA

polimerase e 25ng de DNA. A amplificação foi conduzida em termociclador (Axygen maxygene®) programado para uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação 95 °C por 30s; anelamento a 62 °C por 1min; extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72 °C por 5 min. Para β -tubulina os primers utilizados foram Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT TTC 3') e Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') e a temperatura de anelamento de 55 °C. Os produto da PCR (fragmento de aproximadamente 950 pb) foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% a 4V.cm⁻¹, em tampão de corrida TAE (pH 8,0), corado com *GelRed*TM, e fotodocumentado sob luz UV. Foi utilizado o marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas®). O produto de amplificação foi purificado com GeneJet TM (PCR Purification Kit – Fermentas) e sequenciado no Laboratório Central da UFPE. Os eletroferogramas foram editados utilizando-se o software Staden package para obtenção manual da sequência consenso. Após a edição, a sequência obtida foi utilizada para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Os acessos que apresentaram a maior porcentagem de similaridade com a sequência em estudo, considerando a melhor combinação de “score” e “e-value” foram analisados.

3.3.3 Análise de dados

As frequências absoluta e relativa de fungos endofíticos isolados da *S. officinale* foram calculadas. A frequência absoluta foi calculada como o número total de isolados endofíticos e a frequência relativa foi o número de isolados de cada espécie, dividido pelo número total de isolados. (Larran et al., 2002).

3.4 Atividade antimicrobiana

3.4.1 Micro-organismos

As bactérias utilizadas para os testes de atividade antimicrobiana foram *Enterobacter aerogenes* UFPEDA 348, *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02. As linhagens foram obtidas na Coleção de Cultura UFPDEA, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); e as leveduras *Candida albicans* URM 7095, *Candida lusitaniae* URM 2101 e *Candida parapsilosis* URM 5789 obtidas na coleção de culturas Micoteca URM – Profa. Maria Auxiliadora Cavalcanti.

3.4.2 Atividade antimicrobiana em meio sólido

Fungos endofíticos isolados foram cultivados em meio BDA contidos em placas de Petri e incubados a 25 °C por sete dias. Após esse período foi realizada a suspensão de esporos dos endofíticos em Tween 80 (0,02%) e cultivados em forma de “tapete” em placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura BDA, seguindo da incubação em BOD a uma temperatura de 28 ± 2 °C. Com a ajuda de um furado foram retirados fragmentos de 6mm de diâmetro dos fungos (micélio e ágar) e inoculados em placas Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (AN) para as bactérias e Sabouraud acrescido de extrato de levedura para os fungos.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo tamanho (diâmetro em mm) da zona de inibição de crescimento. As bactérias-teste foram suspensas em solução fisiológica correspondendo ao tubo de nº 5 da escala MacFarland. De cada suspensão foram retiradas 100 µL e semeados nas placas Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente (Schmourlo et al., 2005). As placas foram incubadas por um período de 24 horas a 37 °C para bactérias e 48 horas a 30 °C para fungos (Siqueira et al., 2011).

3.5 Padronização do inóculo e produção de L-asparaginase

Para padronização do inóculo, esporos dos fungos endofíticos foram suspensos em 10 mL de solução Tween 80 (0,02%) e a contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, e a concentração ajustada para 10^6 esporos/mL. A L-asparaginase foi produzida em meio Czapek Dox's modificado (CDM), composto por glicose (2,0 g/L), L-asparagina (10,0 g/L), KH_2PO_4 (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,52 g/L), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), pH 6,2. Foi utilizado 5 mL do meio na etapa de pré-fermentação, onde foram inoculados 3 discos de 5 mm de micélio, incubados a 37 °C, 120 rpm por 96 horas e na fermentação, com a utilização do micélio coletado da pré-fermentação como inóculo e incubados nas mesmas condições, e tempo anteriormente mencionados. Em seguida, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e centrifugadas a 4032 RCF por 15 minutos.

3.5.1 Atividade L-asparaginolítica

A atividade da enzima foi determinada de acordo com Drainas e Pateman (1977), Loureiro et al. (2012) modificado. A solução para determinação da atividade foi composta de 0,6 mL Tris-HCl pH 8,6 (20 mM), 0,2 mL L-asparagina (100 mM), 0,2 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M), acrescida de 1,0 mL do extrato enzimático bruto. A

solução foi incubada a 37 °C por 30 minutos, em seguida, 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl na concentração de 0,66 M adicionada a mistura e centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase foi considerada como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de amônia ou ácido aspártico por minuto a 37 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.6 Caracterização parcial da L-asparaginase

3.6.1 Efeito e estabilidade do pH e temperatura

O efeito e estabilidade da L-asparaginase ao pH e temperatura foram verificados de acordo com Kumar et al. (2013) modificado. O efeito do pH sobre a atividade da enzima foi determinada por ensaio enzimático a diferentes valores de pH variando de 4 a 9,2, utilizando os seguintes tampões a 100mM: acetato de sódio (pH 4,0-5,0), fosfato de sódio (pH 6,0-8,0), Tris HCl (pH 8,6) e carbonato (pH 9,2) a 37 °C. Para estabilidade ao pH, a atividade residual foi mensurada em pH ótimo e depois de 30 e 60 minutos, a 37°C nos tampões a 100mM (acetato pH 4,0 e 5,0, fosfato pH 6,0-8,0, Tris-HCl pH 8,6 e carbonato pH 9,2).

O efeito da temperatura sobre a atividade da L-asparaginase foi realizado em diferentes temperaturas (20-70 °C) utilizando o substrato em pH ótimo. Para estabilidade da temperatura, a atividade residual foi determinada na temperatura ótima depois de 30 e 60 min de incubação em diferentes temperaturas em pH ótimo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *S. officinale*

Foram analisados 105 fragmentos, sendo 35 fragmentos do pecíolo, 35 da folha e 35 da raiz, foram isolados 109 fungos endofíticos de *S. officinale*. Morfologicamente os isolados foram agrupados como pertencentes aos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phylosticta*, *Phoma*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Xylaria*, *Scytalidium*, *Trichoderma* e *Cladosporium*, além de muitos serem agrupados como *Mycelia sterilia*. Observando o maior número de isolado no pecíolo com 53 isolados, seguido da folha com 41 e da raiz com 15 isolados (Tabela 1).

As espécies dos gêneros que obtiveram os maiores números de isolados foram *Colletotrichum* (48 isolados), *Penicillium* (6), *Fusarium* (5), *Phylosticta* (5) e

Acremonium (4). Outros gêneros mostraram uma baixa frequência como *Aspergillus*, *Xylaria*, *Scytalidium*, *Trichoderma* e *Cladosporium* (Tabela 2).

Os isolados de *Penicillium* apresentaram os melhores resultados na atividade antimicrobiana e na produção da L-asparaginase e tiveram sua identificação morfológica autenticada por meio do sequenciamento da região ITS e de fragmento da β -tubulina. Após utilização da ferramenta BLASTn (NCBI), foi verificada uma similaridade de 99% com o espécime *Penicillium citrinum* o que nos permitiu confirmação do status taxonômico do isolado analisado.

Tabela 1 - Fungos endofíticos isolados e identificados da planta *S. officinale*.

Fungos endofíticos	Folha	Pecíolo	Raiz
<i>Colletotrichum</i> sp.	30	18	
<i>Aspergillus</i> sp.	2		
<i>Penicillium</i> sp.	1	1	4
<i>Trichoderma</i> sp.			1
<i>Xylaria</i> sp.		1	
<i>Fusarium</i> sp.		4	1
<i>Cladosporium</i> sp.			1
<i>Phoma</i> sp.		4	
<i>Scytalidium</i> sp.	1		
<i>Phomopsis</i> sp.		1	
<i>Acremonium</i> sp.			4
<i>Phylosticta</i> sp.		5	
<i>Mycelia sterilia</i>	7	19	4
Total	41	53	15

Tabela 2 - Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados da *S. officinale*.

Fungo endofítico	F	Fr (%)
<i>Colletotrichum</i> sp.	48	44,03
<i>Aspergillus</i> sp.	2	1,83
<i>Penicillium</i> sp.	6	5,50
<i>Trichoderma</i> sp.	1	0,92
<i>Xylaria</i> sp.	1	0,92
<i>Fusarium</i> sp.	5	4,6
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0,92
<i>Phoma</i> sp.	4	3,66
<i>Scytalidium</i> sp.	1	0,92
<i>Phomopsis</i> sp.	1	0,92
<i>Acremonium</i> sp.	4	3,66
<i>Phylosticta</i> sp.	5	4,6
<i>Mycelia sterilia</i>	30	27,52
Total	109	100

Huang et al. (2015) realizaram isolamento de fungos endofíticos da planta medicinal *Kadsura angustifolia* (Schisandraceae) na China e foi observado um total de 426 fungos isolados a partir de 100 fragmentos do caule e de 200 da raiz. Os fungos foram agrupados em 41 gêneros, dentre eles *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Xylaria*, *Phomopsis* que também ocorreram no presente estudo. Destes isolados, foram classificados em 41 gêneros (*Asterophora*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Ceratocystis*, *Chromosporium*, *Coccospora*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Diaporthe*, *Didymostilbe*, *Dipodascus*, *Eremascus*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Glomerularia*, *Gonatorrhodiella*, *Harknessia*, *Hormiactella*, *Hormodendrum*, *Hypoxylon*, *Melanconium*, *Monilia*, *Oospora*, *Paepalopsis*, *Paraspora*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Pleococcum*, *Pseudogymnoascus*, *Pullularia*, *Spicaria*, *Sporonema*, *Stachybotrys*, *Syzygites*, *Torula*, *Trametes*, *Trichoderma*, *Umbelopsis*, *Verticillium*, *Xylaria* e *Zythia*). Além de 21 isolados não apresentaram estruturas reprodutivas e foram identificados

como *Mycelia sterilia*. Supõe-se que a diversidade de gênero encontrado neste trabalho foi inferior devido ao número de fragmentos foi substancialmente menor. Entre os gêneros observados, *Verticillium* foi o gênero dominante com frequência relativa de 16,09%, seguido por *Penicillium*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Botrytis* e *Ceratocystis* com frequências relativas 11,49%, 6,61%, 6,61%, 4,60% e 3,05%, respectivamente. Semelhante aos resultados encontrados no presente trabalho, o gênero *Penicillium* foi observado entres os mais frequentes.

Estudo realizado por Jiang et al. (2013) isolaram fungos endofíticos de raízes, caules e folhas da planta medicinal *Angelica sinensis*, coletadas em três locais distintos (Min, província de Gansu; Heqing, província Yunnan; e Baoxing, província de Sichuan, China). Um total de 113 isolados de fungos endofíticos representantes de seis gêneros foram obtidos a partir Min, província de Gansu, 59 isolados de fungos endofíticos representando quatro gêneros de Heqing, província de Yunnan, e 34 fungos endofíticos representando quatro gêneros isolados da província de Sichuan. Entre todos os isolados, os fungos dominantes foram *Myxormia* sp., *Fusella* sp., *Ozonium* sp. *Coniosporium arundinis*, *Phacodium* sp., *Sphaceloma batatas*, *Pestalotia macrotricha*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Melanconium oblongum*. Foi observado também que a comunidade endofítica de *Aspergillus sinensis* diferenciou de acordo com cada região.

Em um primeiro estudo realizado com fungos endofíticos do Mandacaru (*Cereus jamacaru*) Bezerra et al., (2013) obteve um total de 560 fungos isolados, a partir de 1215 fragmentos. As espécies mais frequentemente isoladas foram membros de *Cladosporium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Trichoderma*, *Chrysonilia* e *Aspergillus*. No presente trabalho os endofíticos do gênero *Acremonium* e *Fusarium* também foram isolados com maior frequência. Outros gêneros mostraram baixa frequência (um ou dois isolados) e foram considerados como isolamentos acidentais e/ou raros. Estas espécies foram dos gêneros *Boeremia*, *Candida*, *Cochliobolus*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Purpureocillium*, *Redaellia*, *Sporobolomyces* e *Syncephalastrum*. A taxa de colonização dos fragmentos por fungos endofíticos foi de 42,22%.

4.2 Atividade antimicrobiana de fungo endofítico

A partir de 105 fragmentos foram isolados 109 fungos endofíticos. Dentre todos isolados ao menos um representante de cada gênero foi selecionado aleatoriamente e submetido ao ensaio antimicrobiano. Destes apenas cinco apresentaram atividade contra

ao menos uma bactéria-teste com halos de inibição variando de 0,4 a 1,4 cm (Figura 4). Para as leveduras, nenhum fungo endofítico inibiu o crescimento do fungo-teste (Tabela 3). Os fungos endofíticos com atividade antimicrobiana foram distribuídos entre os gêneros *Colletotrichum* e *Penicillium*, além de um *Mycelia sterilia*.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana por fungos endofíticos da *S. officinale* frente a micro-organismos testes. *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02; *Enterobacter aureogenes* UFPEDA 348; *Mycobacterium smegmatis*; URM 5789; *Candida parapsilosis*; URM 7095; *Candida albicans*; URM 2101; *Candida lusitanae*.

Fungo Endofítico			Bactérias			Leveduras		
		Parte do vegetal	UFPEDA 02	UFPEDA 348	UFPEDA 71	URM 5789	URM 7095	URM 2101
<i>Colletotrichum</i>	sp.1	a	-	-	-	-	-	-
	sp.2	a	-	-	-	-	-	-
	sp.3	a	-	-	-	-	-	-
	sp.4	b	0,8	-	0,4	-	-	-
	sp.5	a	-	-	-	-	-	-
	sp.6	b	-	-	-	-	-	-
	sp.7	a	-	-	-	-	-	-
	sp.8	a	-	-	-	-	-	-
	sp.9	b	-	-	-	-	-	-
	sp.10	b	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> R4.5	c	1,3	1,3	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> R4.6	c	1,0	1,0	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> P1.6	b	1,4	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> F2.12	a	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i>	sp.1	b	-	-	-	-	-	-
	sp.2	c	-	-	-	-	-	-
	sp.3	b	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	sp.1	c	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i>	sp.1	a	-	-	-	-	-	-
	sp.2	a	-	-	-	-	-	-
<i>Phylosticta</i>	sp.1	b	-	-	-	-	-	-
	sp.2	b	-	-	-	-	-	-

<i>Phomopsis</i>	sp.1	b	-	-	-	-	-	-
<i>Phoma</i>	sp.1	b	-	-	-	-	-	-
	sp.2	a	-	-	-	-	-	-
	sp.3	b	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i>	sp.1	c	-	-	-	-	-	-
<i>Scytalidium</i>	sp.1	a	-	-	-	-	-	-
<i>Xylaria</i>	sp.1	b	-	-	-	-	-	-
<i>Acremonium</i>	sp.1	c	-	-	-	-	-	-
<i>Mycelia</i>	sp.1	b	-	-	-	-	-	-
sterilia								
	sp.2	b	-	-	-	-	-	-
	sp.3	a	-	-	-	-	-	-
	sp.4	b	-	-	-	-	-	-
	sp.5	b	-	-	-	-	-	-
	sp.6	b	-	-	-	-	-	-
	sp.7	a	-	-	-	-	-	-
	sp.8	b	1,2	-	-	-	-	-
	sp.9	a	-	-	-	-	-	-
	sp.10	a	-	-	-	-	-	-

(-) sem atividade antimicrobiana; (a) folha; (b) pecíolo; (c) raiz

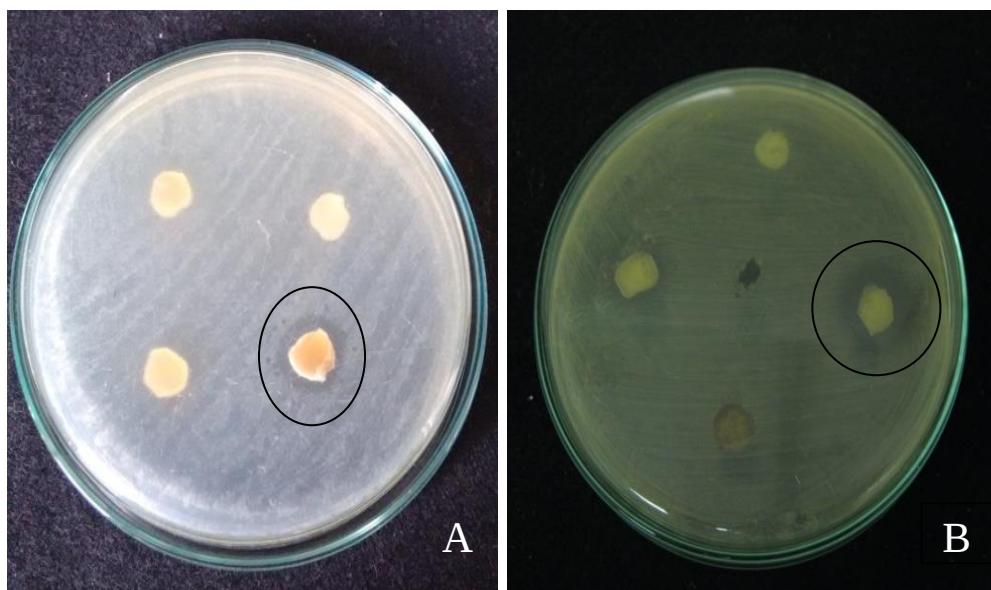


Figura 4 - (A) Halo de inibição a *Mycobacterium smegmatis* pelo fungo endofítico *Colletotrichum* sp. 3; (B) Halo de inibição a *Enterobacter aerogenes* pelo fungo endofítico *Penicillium citrinum* R4.6.

Nascimento et al., (2015) realizaram teste de atividade antimicrobiana com fungos endofíticos de *Calotropis procera* contra bactérias, fungos patógenos a humano e fungos fitopatogênico. Dos 35 fungos endofíticos testados, *Curvularia pallescens* (URM 6048) produziu zona de inibição aos micro-organismos *S. aureus* e *S. pyogenes*; e *Hyphomycetes* contra *M. smegmatis* e o fungo fitopatogênico *C. dematium*. Esses mesmos micro-organismos teste também foi inibido por alguns dos fungos endofíticos testados no presente trabalho. *Cladosporium cladosporioides* (URM 6084) foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *M. smegmatis* e do fungo *E. floccosum*. Contudo, o gênero *Colletotrichum* isolado do confrei não causou inibição contra a bactéria *M. smegmatis*. Nenhum dos fungos endófitos testados foram capazes de inibir os micro-organismos *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *C. albicans*, *M. furfur*, *T. cutaneum*, *F. solani* ou *F. oxysporum*.

Em seu trabalho, Yang et al., (2015) realizaram atividade antimicrobiana com fungos endofíticos da planta medicinal *Cephalotaxus hainanensis* através do método de difusão em disco. Os micro-organismos testes utilizados foram três agentes patogênicos bacterianos, incluindo *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC51650 e *B. subtilis* ATCC6633, três fungos patogênicos de plantas, incluindo *R. solani* ZLL101, *Sclerotinia sclerotiorum* XJS01 e *Fusarium oxysporum* cubense RKY102, e uma bactéria patógena a peixe *Streptococcus agalactiae* HYXY08. A atividade antimicrobiana dos 21 fungos endofíticos foram testados e a espécie *Aspergillus niger*

exibiu atividade contra todos os patógenos, porém o endofítico *Neonectria macroconidialis* apresentou o maior halo de inibição contra *S. aureus*. Resultado similar ao presente trabalho foi observado com a espécie do gênero *Colletotrichum* que não apresentou halo na bactéria-teste *S. aureus*.

Colletotrichum gloeosporioides, endofítico isolado de caule de *Artemisia mongolica* também é conhecido por produzir um novo metabólito antimicrobiano denominado “ácido coletotrico” o qual é capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* atuando também em fungos fitopatógenos (Zou et al, 2000). Trabalho realizado por Natch et al., (2015) esclarece a eficiência de fungos endofíticos da planta *Rauwolfia serpentina* Benth com atividade antimicrobiana e antioxidantes. Destacando-se os endofíticos *Aspergillus awamori*, *Penicillium* sp. e *C. gloeosporioides*, favorecendo um estudo mais aprofundado para caracterização dos metabólitos ativos que podem oferecer espaço para bioprospecção de moléculas de uso na medicina.

4.3 Atividade da L-Asparaginase

Dos isolados utilizados na atividade antimicrobiana, estes foram submetidos a atividade L-asparaginolítica. Dos 40 testados, 19 apresentaram atividade enzimática: *Colletotrichum* sp., *Penicillium citrinum*, *Aspergillus* sp., *Phylosticta* sp., *Phomopsis* sp., *Phoma* sp., *Xylaria* sp. e Mycelia sterilia. O isolado de *P. citrinum* F2.12 foi que apresentou a maior atividade L-asparaginolítica sendo selecionado para posterior avaliação de efeito e estabilidade ao pH e a temperatura (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade L-asparaginolítica de fungos endofíticos de *S. officinale*.

Fungos endofíticos		Atividade L-asparaginolítica (U/mL)
<i>Colletotrichum</i>	sp.1	0
	sp.2	0,055
	sp.3	0
	sp.4	0
	sp.5	0
	sp.6	0
	sp.7	0
	sp.8	0

	sp.9	0,026
	sp.10	0
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> R4.5	0
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> R4.6	0
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> P1.6	0,094
<i>Penicillium</i>	<i>citrinum</i> F2.12	0,157
<i>Fusarium</i>	sp.1	0
	sp.2	0
	sp.3	0
<i>Trichoderma</i>	sp.1	0
<i>Aspergillus</i>	sp.1	0,057
	sp.2	0,064
<i>Phylosticta</i>	sp.1	0,038
	sp.2	0
<i>Phomopsis</i>	sp.1	0,015
<i>Phoma</i>	sp.1	0,013
	sp.2	0,023
	sp.3	0,016
<i>Cladosporium</i>	sp.1	0
<i>Scytalidium</i>	sp.1	0
<i>Xylaria</i>	sp.1	0,073
<i>Acremonium</i>	sp.1	0
<i>Mycelia sterilia</i>	sp.1	0,023
	sp.2	0,035
	sp.3	0,050
	sp.4	0,027
	sp.5	0,042
	sp.6	0
	sp.7	0,032
	sp.8	0
	sp.9	0,025
	sp.10	0

Em um estudo realizado por Dhale e Mohan-Kumari (2014) para detecção da produção da enzima L-asparaginase, foram utilizados os fungos *Penicillium* sp. CFRM 01 e CFRM 02, e *Monascus purpureus* MTCC 410, CFR 410-11 e CFR 410-22. Em seus resultados foram encontradas atividades semelhantes ao presente estudo, onde para *Penicillium* sp. CFRM 01 obteve uma atividade enzimática de 0,259 U/ml, seguido pelo *Penicillium* sp. CFRM 02 com 0,019 U/mL. Masumi et al. (2014), estudando fungos endofíticos de *Thymus* verificaram que isolados de *Curvularia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma* e *Aspergillus* produziram esta enzima. Destacando-se as espécies de *Fusarium* e *Colletotrichum*. Kumar e Manonmani (2013), sugerem em seu estudo que a espécie de *Cladosporium* sp. pode apresentar uma fonte para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento do câncer.

No trabalho realizado por Santos et al. (2015), os autores verificaram a capacidade de produção de L-asparaginase a partir de fungos endofíticos de Cactaceae (*Cereus jamacaru*). As espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gibberella* e *Penicillium* tiveram a maior capacidade de sintetizar a L-asparaginase. Diferente do resultado encontrado neste trabalho, os gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* não apresentaram atividade enzimática.

Chow e Ting (2014) em seu trabalho, estudaram a atividade da enzima L-asparaginase a partir de fungos endofíticos isolados de tecidos da folha e do tronco de plantas com propriedades anticancerígenas. Os endófitos que apresentaram boas atividades pertencem aos gêneros *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Phoma*, com destaque para as espécies de *Penicillium simplicissimum* e *Fusarium oxysporum*. Em contrapartida, o gênero *Fusarium* e *Phoma* encontrado neste trabalho não obtiveram resultados relevantes.

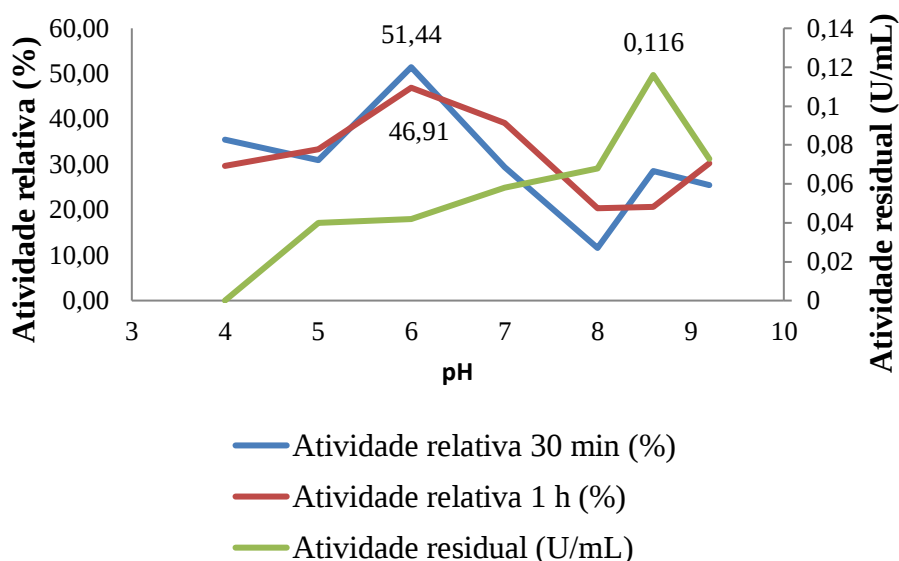
Kalyanasundaram et al. (2015) isolaram fungos endofíticos da *Sueada monoica* e verificaram a produção da enzima L-asparaginase através da análise qualitativa seguida da análise quantitativa. Dos 17 fungos isolados, oito mostraram resultado positivo para atividade da enzima, onde sua produção variou de 5,32 a 35,28 U/ml. Observou-se maior produção por *Aspergillus terreus*. Os resultados obtidos no presente estudo a atividade enzimática variou entre 0,013 a 0,175 U/ml.

4.4 Caracterização parcial da L-asparaginase

4.4.1 Efeito e estabilidade ao pH e a temperatura

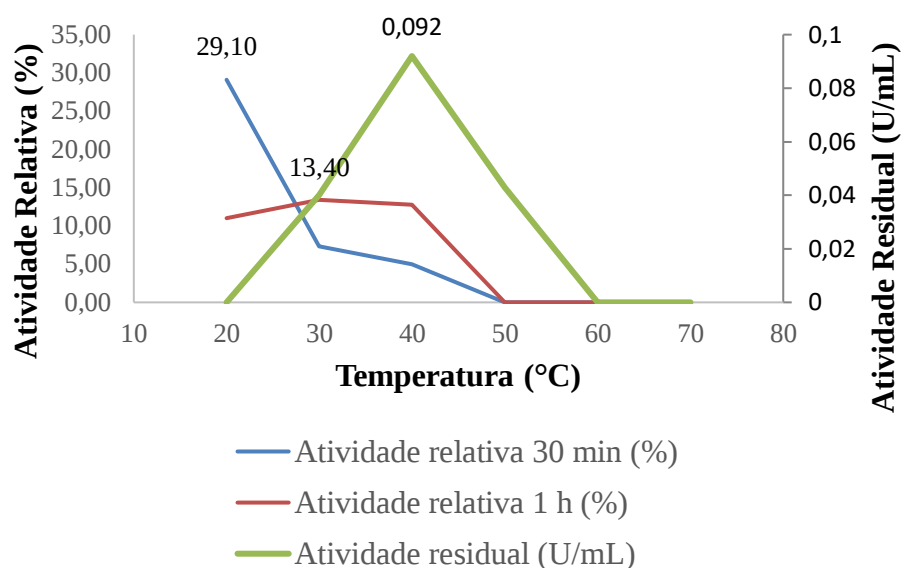
Para realizar o efeito e a estabilidade ao pH foi considerado o fungo endofítico que apresentou maior atividade L-asparaginolítica, *P. citrinum* F2.12. A atividade mais elevada da L-asparaginase foi observada na solução tampão Tris-HCl pH 8,6. A enzima apresentou estabilidade a pH ligeiramente ácido e obteve mais de 50% da sua atividade quando incubada a pH 8,6 durante 30 min de incubação, e 46,91% quando incubada a 60 minutos (Figura 5).

Figura 5 - Efeito e estabilidade ao pH da L-asparaginase produzida por *P. citrinum* F2.12.



Para efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, o endofítico *P. citrinum* F2.12 apresentou atividade na faixa entre 30-50 °C, em temperaturas acima e abaixo a enzima foi desnaturada. O efeito da temperatura sobre a atividade L-asparaginolítica apresentou que a atividade máxima foi obtida a 40 ° C. No experimento de estabilidade, no tempo de 1 hora, a enzima mostrou ser estável entre 20-40 °C, mantendo-se entre 10-13,5% de sua atividade. Sua atividade máxima foi observada a 30 °C, com 13,40% de sua eficiência. No tempo de 30 min a enzima não mostrou estabilidade, porém na temperatura de 20 °C foi observado maior eficiência (29,10%) (Figura 6).

Figura 6 - Efeito e estabilidade a temperatura da L-asparaginase produzida por *P. citrinum* F2.12.



Através da técnica de recombinação gênica de *Saccharomyces cerevisiae* com *Pichia pastoris*, Girão et al. (2016) observou em seu trabalho que a atividade em pH alcalino (7,2 e 9,0) e a temperatura ótima de 46 °C obteve maior produção da enzima. Resultado semelhante foi encontrado neste trabalho onde a enzima apresentou maior eficiência em pH alcalino (8,6) a uma temperatura de 40 °C. Husain et al. (2016) purificaram e a caracterizam a L-asparaginase produzidas por *Pseudomonas otitidis* e observaram que a enzima purificada foi mais ativa na faixa de pH 6 e 9, alcançando atividade máxima em pH 7,5. Apresentou atividade máxima a 40 °C, diminuindo bruscamente sua atividade a temperatura de 45 °C. Na estabilidade térmica, não houve atividade significativa.

Kumar e Manonmani (2013), realizando a caracterização de L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp. relataram máxima atividade em pH 6,3 e temperatura de 30 °C, a enzima demonstrou estabilidade durante 3 h a temperatura e pH ótimo, quando a mesma foi incubada durante 1h em diferentes temperaturas e imediatamente ensaiado quanto a atividade enzimática, demonstrou perda progressiva da atividade com o aumento da temperatura. Saranya et al. (2012), otimizando os isolados de manguezais, *Aspergillus terreus* e *A. flavus* através de fermentação em estado sólido com as diferentes faixas de pH e temperatura, verificaram que a máxima atividade para ambas as espécies foi a 35°C e pH 7, obtendo máxima produção 8,3 U/ml em *A. terreus*.

Krishnapura e Belur (2016) otimizaram e caracterizaram a L-asparaginase produzida pelo endofítico *Talaromyces pinophilus* e observaram maior atividade a 28 °C e pH 8,0. Na faixa de pH 7,4-8,5 e temperatura 26 °C a 37 °C, a atividade da enzima foi superior

a 95%. A enzima produzida por *T. pinophilus*, mostrou-se ser altamente estável de 25 °C a 37 °C e pH 8 em até 8 horas. No presente trabalho, a enzima produzida por *P. citrinum* F2.12 apresentou maior atividade a 40 °C e pH 8,6, mostrando estabilidade ao longo das temperaturas (20 °C a 40 °C) e mantendo 10-13% de atividade. Meghavarname Janakiraman (2015), caracterizaram a L-asparaginase produzida por *Fusarium culmorum* ASP-87 observaram que a enzima reteve 100% de sua atividade em pH 8,0 no tempo de 24 horas de incubação, mostrou-se estável a temperatura de 30°C a 40°C durante 120 min e manteve 50% de atividade por 1 hora a 60°C.

Estudo realizado por Ahmed et al. (2015), foi identificado e caracterizado dois tipos de L-asparaginase (AYA-1 e AYA-2) obtidas a partir da cultura de *Aspergillus* sp. Alaa-2000, verificaram que em AYA-1 a enzima foi estável em pH 6,0 a 8,0 e em AYA-2 a enzima foi estável em pH 10,0-11,0. Quanto à estabilidade térmica as duas enzimas apresentaram a mesma variação, entre 30 e 60 °C no tempo de 60 min. No mesmo tempo, o presente trabalho mostrou ser estável entre 20 e 40 °C.

5 CONCLUSÕES

- ✓ Isolados pertencentes ao gênero *Colletotricum* foram isolados com maior frequência. Crescendo apenas nos fragmentos das folhas e dos pecíolos;
- ✓ Fungos endofíticos da *S. officinale* apresentam capacidade de produzir metabólitos bioativos de potencial antimicrobiano de uso medicinal contra bactérias patogênicas ao homem;
- ✓ Isolados do gênero *Penicillium* é capaz de produzir metabólitos bioativos que inibem o crescimento das bactérias patogênicas e produzem a enzima L-asparaginase, com destaque para a espécie *P. citrinum* R4.6 e F2.12 respectivamente;
- ✓ A espécie *P. citrinum* F2.12, maior produtora da enzima L-asparaginase, apresentou maior atividade na solução tampão Tris-HCl pH 8,6. Quanto à estabilidade ao pH, obteve maior resultado quando incubada em 30 min. Para efeito da temperatura, a enzima apresentou maior atividade a 40 °C e mostrou ser estável entre 20-40 °C, mantendo-se entre 10-13,5% de sua atividade;

- ✓ Fungos endofíticos da *S. officinale* podem ser indicados para futuros estudos com intuito de melhorar e aumentar a produção da enzima anticancerígena L-asparaginase.

6 REFERÊNCIAS

- Albuquerque, U.P. 2005. Introdução à etnobotânica. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- Ahmed, M.M.A. 2015. Production, Purification and Characterization of L-Asparaginase from Marine Endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under Submerged and Solid State Fermentation. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7: 165-172.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.N., Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology, John Wiley & Sons Inc. 868.
- Araújo, W.L., Maccheroni, W. Jr., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O., Azevedo, J.L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 229–236
- Azevedo, J.L., Araújo, W.L. 2007. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. *Fungi: multifaceted microbes* 189–207.
- Barnes, J., Anderson, A.L., Phillipson, J.D. 2002. Herbal Medicines, Barnes J, Anderson AL, Phillipson JD (eds). *Pharmaceutical Press: London, Chicago*. 118.
- Benedek, B., Ziegler, A., Ottersbach, P. 2010. Absence of mutagenic effects of a particular *Symphytum officinale* L. liquid extract in the bacterial reverse mutation assay. *Phytotherapy Research*. 24: 466-468.
- Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Barbosa, R.N., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Gomes, B.S., Paiva, L.M., Almeida-Cortez, J.S., Souza-Motta, C.M. 2013. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis*. 60: 53–63
- Blackwell, M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American journal of botany*. 98:426-438.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brown, A.W., Stegelmeier, B.L., Colegate, S.M., Gardner, D.R., Panter, K.E., Knoppel, E.L., Hall, J.O. 2015. The comparative toxicity of a reduced, crude comfrey (*Symphytum officinale*) alkaloid extract and the pure, comfrey-derived pyrrolizidine alkaloids, lycopsamine and intermedine in chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Applied Toxicology*.
- Capizzi, R.L., Poole, M., Cooper, M.R., Richards, F., Stuart, J.J., Jakson, D.V., White, D.R., Spurr, C.L., Hopkins, J.O., Muss, H.B. 1984. Treatment of poor risk acute leukaemia with sequential hlgdne ARA-C and asparaginase. *Blood* 63: 649-700.

- Carneiro, F.M., Silva, M.J.P., Borges, L.L., Albernaz, L.C., Costa, J.D.P. 2015. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais*. 3:44-75.
- Carvalho, A.C.B., Balbino, E.E., Maciel, A., Perfeito, J.P.S. 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 18: 314-319.
- Choi, W.Y., Rim, S.O., Lee, J.H., Lee, J.M., Lee, I.J., Cho, K.J., Rhee, I.K., Kwon, J.B., Kim, J.G. 2005. Isolation of gibberellins producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 22–28.
- Chow, Y., Ting, A.S.Y. 2014. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *Journal of Advanced Research*. 6: 869-876.
- Dai, C.C., Yu, B.Y., Li, X. 2008 Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. *African Journal of Biotechnology* 7, 19, 3505–3510.
- Dhale, M. A., Mohan-Kumari, H. 2014. A comparative rapid and sensitive method to screen L-asparaginase producing fungi. *Journal of microbiological methods*. 102: 66-68.
- Debbab, A., Aly, A. H., Proksch, P. 2012. *Fungal Diversity* 57: 45–83.
- Debbab, A., Aly, A.H., Proksch, P. 2012. Endophytes and associated marine derived fungi - ecological and chemical perspectives. *Fungal Diversity*. 57: 45-83.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 2007. Compendium of soil fungi. *IHW-Verlag*, Eching.
- Dos Santos, I.P., Bezerra, J.D.P., Souza-Motta, C.M., Cavalcanti, M.S., Lima, V.L.M. 2015. Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. *African Journal of Microbiology Research*. 9: 1227-1235.
- Drainas, C., Kinghorn, J.R., Pateman, J.A. 1977. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. 98: 493-501.
- Elshafei, A.M., Hassan, M.M., Haroun, B.M., Elsayed, M.A., Othman, A.M. 2012. Optimization of laccase production from *Penicillium martensii* NRC345. *Advanc in Life Sci*. 2: 31- 37
- European Medicines Agency. 2011. Assessment report on *Symphitum officinale* L., radix. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2011/08/WC500110648.pdf.
- Ferrari, R., Barbosa, A.M., Ornelas, S.S., Del Lano, M.E., Barbosa, A.C.L. 2012. Confrei (*Symphitum officinale*). Aspectos botânicos, fitoquímicos e terapêuticos. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 16: 227-237.
- Ferreira, M.C. Ferreira, M.C., Vieira, M.L.A., Zanib, C.L., Alves, T.M.A., Sales Jr., P.A., Murta, S.M.F., Romanha, A.J., Gil, L.H.V.G., Carvalho, A.G.O., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Rosa, C.A., Rosa, L.H. 2015. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated

- with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 59: 36-44.
- Frost, R., O'meara, S., Macpherson, H. 2014. The external use of comfrey: A practitioner survey. *Complementary therapies in clinical practice*. 20: 347-355.
- Gasoni, L. Gurfinkel, B.S. 1997. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research* 101: 867-870.
- Girão, L.F.C., da Rocha, S.L.G., Sobral, R.S., Bom, A.P.D.A., Sampaio, A.L.F., da Silva, J.G., Perales, J. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 120: 118-125.
- Gomes, D.N.F. 2007. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco*. Tese (Dissertação em Biologia) - Programa de Pós-graduação em Biologia dos Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- Gomes, M.F.P.L., Massoco, C.J.O., Xavier, J.G., Bonamin L.V. 2007. Comfrey (*Symphytum Officinale* L.) and Experimental Hepatic Carcinogenesis: A Short-term Carcinogenesis Model Study. *Advance Access Publication*. 2: 197-202.
- Guerra, D.M.S., Pires, A.P.D., Lima, E.A.L.A. 2009. Persistência de *Metarhizium anisopliae* spp no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade. *Revista Caatinga*. 22: 50-54.
- Gulati, R., Saxena, R.K., Gupta, R. 1997. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 24: 23-26.
- Huang, Q., An, H., Song, H., Mao, H., Shen, W., Dong, J. 2015. Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. *Research in microbiology*. 166:45-55.
- Huang, Y.; Wang, J.; Li, G.; Zheng, Z.; Su, W. 2001. Tumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 31:163-167.
- Husain, I., Sharma, A., Kumar, S., Malik, F. 2016. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Pseudomonas otitidis*: Induce apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells. *Biochimie* 121: 38-51.
- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M. 1973. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms, *SGM* 76: 85-99.
- Jiang, S., Qian, D., Yang, N., Tao, J., Duan, J. 2013. Biodiversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis*. *Chinese Herbal Medicines*. 5: 264-271.
- Johri, B.N. 2006. Endophytes to the rescue of plants!. *Current Ccience-Bangalore*. 90: 1315.
- Kalyanasundaram, I., Nagamuthu, J., Srinivasan, B., Pachayappan, A., Muthukumarasamy, S. 2015. Production, Purification and Characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 4: 663-677.

- Kaul, S., Gupta, S., Ahmed, M., Dhar, M.K. 2012. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochem Rev.* 11: 487-505.
- Kendrick, B. 2000. *The fifth kingdom* 3rd edition. City name The USA. Focus Publishing.
- Krishnapura, P.R., Belur, P.D. 2016. Partial purification and characterization of L-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 124: 83-91.
- Kudalkar, P., Strobel, G., Riyaz Ul Hasan, S., Geary, G., Sears, J. 2012. Muscodor sutura, A Novel Endophytic Fungus With Volatile Antibiotic Activities. *Mycoscience* 53: 319–325.
- Kumar, N. S. M., Manonmani, H. K. 2013. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular l-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29: 577-587.
- Kumar, S., Kaushik, N., 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS One* 8: e56202.
- Lapmak, K., Lumyong, S., Thongkuntha, S., Wongputtisin, P., Sardud, U. 2010. L-Asparaginase Production by *Bipolaris* sp. BR438 Isolated from Brown Rice in Thailand. *Chiang Mai J. Sci.* 37: 160-164
- Larran, S., Perelló, A., Simón, M.R., Moreno, V. 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 683-686.
- Lorenzi, H., De Abreu Matos, F.J. 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. *Instituto Plantarum de Estudos da Flora*.
- Loureiro, C.B., Borges, K.S., Andrade, A.F., Tone, L.G., Said, S. 2012. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of l-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. 2
- Malinowski, D.P., Brauer, D.K., Belesky, D.P. 1999. Neotyphodium coenophialum-endophyte affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183: 53–60
- Maloney, K.W. Erwinia asparaginase: coming closer to an understanding of its use in pediatric acute lymphoblastic leukemia? *Pediatric blood e cancer*. 54: 189-190, 2010.
- Masumi, S., Mirzaei, S., Kalvandi, R., Zafari, D. 2014. Asparaginase and amylase activity of thyme endophytic fungi. *Journal of Crop Protection*. 3: 655-662.
- Melnroy, J.A., Kloepper, J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*. 173:337-342.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos; Departamentos de Assistências Farmacêuticas e Insumos Estratégicos – Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – Brasília: Ministério da Saúde, 2009, 136 p. Il. (Série C. Projetos, Programas e Rel.)
- Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.
- Ministério do Meio Ambiente. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/biodiversidade-flora>> Último acesso em: 30/10/2015.

- Nascimento, T.L., Oki, Y., Lima, D.M.M., Almeida-Cortez, J.S., Fernandes, G.W., Souza-Motta, C.M. 2015. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecology*. 14, 79-86.
- Nath, A., Chattopadhyay, A., Joshi, S.R. Biological activity of endophytic fungi of *Rauwolfia serpentina* Benth: an ethnomedicinal plant used in folk medicines in Northeast India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 85: 233-240, 2015.
- Nisa, H., Kamili, A.N., Nawchoo, I.A., Shafi, S., Shameem, N., Bandh, S.A. 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial pathogenesis*. 82: 50-59.
- Oliveira, F.Q. 2007. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista eletrônica de Farmácia*. 3: 36-41.
- Panizza, S. 2000. *Plantas que curam*. Ibrasa.
- Patil, M.P., Patil, R.H., Maheshwari, V.L. 2015. Biological Activities and Identification of Bioactive Metabolite from Endophytic *Aspergillus flavus* L7 Isolated from *Aegle marmelos*. *Current microbiology*. 71: 1-10.
- Patil, M.P., Patil, R.H., Mahjeshwari, V.L. 2012. A novel and sensitive agar plug assay for screening of asparagine-producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*. *Acta Biol Szeged*. 52: 157-155.
- Pereira, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. 1993. Endophytic fungi from stylosantes: a preliminary report. *Mycologia* 85: 362-364.
- Pimentel, I.C., Kuczkowski, F.R., Chime, M.A., Auer, C.G., Grigoletti Junior, A. 2006. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta* 36: 1.
- Porras-Alfaro, A., Bayman, P. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Phytopathology*. 49: 291.
- Qui, F., Zhan, Y., Zeng, F., Jing, T. 2012. Effect of endophytic fungi on the growth situation in cell suspension cultures of *Acer Ginnala* Maxim. *AMR* 343-344, 384-390.
- Rim, S.O., Lee, J.H., Choi, W.Y., Hwang, S.K., Suh, S.J., Lee, I.J., Rhee, I.K., Kim, J.G., 2005. *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellins-producing fungus. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 809-814
- Rodrigues, R.A.F. Foglio, M.A., Boaventura Júnior, S., Santos, A.S., Rehder, Vera, L.G. 2006. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. *Química Nova*. 29: 368.
- Rodriguez, R.J., White, J.F.Jr., Arnold, A.E., Redman, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 182: 314-330.
- Roman, G. P., Neagu, E., Moroeanu, V., Radu, G. L. 2008. Concentration of *Symphytum officinale* extracts with cytostatic activity by tangential flow ultrafiltration. *Roumanian Biotechnological Letters*. 13: 4008-4013.
- Santos, M.G.S.; Bezerra, J.D.P.; Svedese, V.M.; Sousa, M.A. ; Silva, D.C.V. ; Maciel, M.H.C.; Paiva, L.M. ; Porto, A.L.F.; Souza-Motta, C.M. 2015. Production of L-asparaginase by endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest. *Sydowia*. 67: 147-156.

- Saraiva, S.R.G.L., Costa Saraiva, H.C., Oliveira-Júnior, R.G., Silva, J.C., Damasceno, C.M.D., Silva Almeida, J.R.G., Amorim, E.L.C. 2015. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura. *Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação*. 1: 1.
- Sarquis, M.I.M., Oliveira, E.M.M., Santos, A.S., Costa, G.L. 2004. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 489-492.
- Saxena, S., Meshram, V., & Kapoor, N. 2014. *Muscodor tigerii* sp. nov.-Volatile antibiotic producing endophytic fungus from the Northeastern Himalayas. *Annals of Microbiology* pp 1-11
- Schourlo, G., Mendonça-Filho, R.R., Alviano, C.S., Costa, S.S. 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medical and food plants. *Journal of Ethanopharmacology*, v.96, p. 563-568.
- Schulz, B., Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological research*. 109: 661-686.
- Shen, X. Y., Cheng, Y. L., Cai, C. J., Fan, L., Gao, J., & Hou, C. L. 2014. Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Endophytic Fungi Isolated from Moso Bamboo Seeds. *PloS one* 9: 95838.
- Shifrin, S., Parrott, C.L., Luborsky, S.W. 1974. In vitro assembly of L-asparaginase subunits. *J Biol Chem* 249: 1335-1340
- Shrivastava, A., Rhodes, R.G., Pochiraju, S., Nakane, D., McBride, M.J. 2012. *Flavobacterium johnsoniae* RemA is a mobile cell-surface lectin involved in gliding. *J Bacteriol* 194: 3678-3688.
- Siqueira, V.M., Conti, R., Araújo, J. M., Souza-Motta, C.M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89-95
- Smith, D.B., Jacobson, B.H. 2011. Effect of a blend of comfrey root extract (*Symphytum officinale* L.) and tannic acid creams in the treatment of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo-controlled, double-blind, multiclinical trials. *Journal of Chiropractic Medicine* 10: 147-156.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*. 67: 257-268.
- Strobel, G.A. 2002. Microbial gifts from rain forests1. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 24: 14-20.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*. 5: 535-544.
- Swett, C.L., Gordon, T.R. 2015. Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). *Fungal Ecology*. 13: 120-129.
- Taechowisan, T., John F.P., Saisamorn Lumyong. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19.4: 381-385.
- Tan, R.X., Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*. 18: 448-459.
- Theantana, T., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2009. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: citotoxicity properties. *IJIB* 7: 1

- Theantana, T., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2007. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. *KMITL Sci. Tech. J.* 7: S1, 13-18.
- Theantana, T., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2009. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. *International Journal of Integrative Biology.* 7: 1-8.
- Toledo, A.C.O., Duarte, M.R., Nakashima, T. 2004. Análise farmacognóstica da droga e do extrato fluido das folhas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13: 1-2
- Toledo, A.C.O., Duarte, M.R., Nakashima, T. 2006. Caracterização morfoanatômica de raiz e rizoma de *Symphytum officinale* L.(Boraginaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 16: 185-191.
- Vieira, M.L.A., Hughes, A.F.S., Gil, V.B., Vaz, A.B.M., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H. 2011. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell.(Solanaceae). *Canadian journal of microbiology.* 58: 54-66.
- Wakil, S.S., Adelegan, A.A. 2015. Screening, Production and Optimization of L-Asparaginase From Soil Bacteria Isolated in Ibadan, South-western Nigeria. *Journal of Basic and Applied Sciences* 11: 39-51.
- Wang, B., Relling, M.V., Storm, M.C., Woo, M.H., Ribeiro, R., Pui, C-H., Hak, L.J. 2003. Evaluation of immunologic crossreaction of antiasparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia.* 17: 1583-1588.
- Webster, J., Weber, R. 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.
- Wilson, D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos.* 73: 274-276.
- Yang, H.R., Hu, X.P., Jiang, C.J., Qi, J., Wu, Y.C., Li, W., Zeng, Y.J., Liu, S.X. 2015. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Cephalotaxus hainanensis* Li, a well-known medicinal plant in China. *Letters in applied microbiology.* 61: 484-490.
- Yates, I.E., Bacon, C.W., Hinton, D.M. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Disease.* 81: 723-728.
- Zhao, J., Shan, T., Mou, Y., Zhou, L. 2011. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini-Rev Med Chem.* 11: 159-168.
- Zou, W.X., Meng, J.C., Lu, H.; Chen, G.X., Shi, G.X., Zhang, T.Y., Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. *J Nat Prod.*