



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

ANA PATRÍCIA SOUSA LOPES DE PÁDUA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE L-
ASPARAGINASE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Myracrodruon*
urundeuva ALLEMÃO (AROEIRA DO SERTÃO)**

Recife

2018

ANA PATRÍCIA SOUSA LOPES DE PÁDUA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE L-
ASPARAGINASE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Myracrodruon*
urundeuva ALLEMÃO (AROEIRA DO SERTÃO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta

Co-orientador: Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Pádua, Ana Patrícia Sousa Lopes de

Diversidade e potencial para produção de L- asparaginase de fungos endofíticos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira do sertão)/ Ana Patrícia Sousa Lopes de Pádua - 2018.

87 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Sousa-Motta

Coorientador: Jadson Diogo Pereira Bezerra

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

Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Fungos 2. Endófitos 3. Enzimas I. Souza-Motta, Cristina Maria de (orient.)

II. Bezerra, Jadson Diogo Pereira (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-170

ANA PATRÍCIA SOUSA LOPES DE PÁDUA

**DIVERSIDADE E POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE L-
ASPARAGINASE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Myracrodruon*
urundeuva ALLEMÃO (AROEIRA DO SERTÃO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 02/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Maria Souza-Motta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Laura Mesquita de Paiva – Examinador Interno
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Virginia Michelle Svedese (Examinador Externo)
Universidade do Vale do São Francisco

AGRADECIMENTOS

À UFPE, Departamento de Micologia e a Pós-graduação em Biologia de Fungos pelo suporte educacional e todas as oportunidades;

À Cnpq, pela bolsa de estudos concedida durante os dois anos de estudos;

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Virginia Svedese e Profa. Dra. Laura Mesquita de Paiva, pelas sugestões e contribuições para este trabalho.

À minha família, especialmente aos meus pais, José Lopes de Pádua e Isa Lopes de Pádua pelo amor incondicional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Souza-Motta, pela competência e ensinamentos valiosos transmitidos em sala de aula e no laboratório. Obrigado por acreditar em mim e por toda transmissão de calma em momentos desafiadores, sendo modelo de referência profissional, dentre os micologistas brasileiros.

Ao meu co-orientador, Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra pelos conhecimentos transmitidos no laboratório, me mostrando como superar minhas falhas e destacando meus saberes. Agradeço ainda pelos estímulos diários, cobranças e contribuições em todas as etapas desta pesquisa, pois, sem isso nada seria possível. Seu comprometimento como pesquisador me faz pensar... Ali está alguém que ama ciência, ali está alguém em que possa me espelhar!

Aos que me ajudaram nas coletas em Triunfo-PE e Serra Talhada-PE, Profa. Dra. Marlene Barbosa de Alencar, curadora do Herbário UFP da UFPE por todas as instruções sobre o material botânico, meu pai, José Lopes de Pádua com sua grande sabedoria sobre plantas e Crislayne Santos, estagiária em Botânica da UAST.

A todos os técnicos que integram a Pós-graduação em Biologia de Fungos da UFPE e à técnica da Plataforma de sequenciamento da UFPE: Heidi Lacerda pelo auxílio durante a pesquisa.

Aos professores da Pós-graduação em Biologia de Fungos pelo conhecimento transmitido em minha jornada científica.

Aos professores do laboratório de Micologia Ambiental: Prof. Dr. Alexandre Reis e Profa. Dra. Laura Mesquita de Paiva pela disponibilidade e sabedoria, demonstrando serem exemplos de profissionais.

Ao Prof. Dr. Gualberto Montalvo pelo auxílio nas análises estatísticas e à Dra. Iolanda da Silva pelo auxílio nas análises ecológicas.

À turma do mestrado e de doutorado de 2016 de Biologia de fungos pela convivência amigável e contribuições destes dois anos.

Aos colegas de laboratório que contribuíram na construção deste trabalho, demonstrando sempre parceria, respeito e integridade: Aline Barboza, Janiele Barbosa, Amanda Cupertino, Juliana Mello, Tamara Caldas, Marília Gomes, Roberto Santos, Anne Karoline França, Arthur Vinícius e Paula Guerra.

As colegas de laboratório quem em um dado momento na minha pesquisa tornaram-se minhas amigas e parceiras: Giane Magalhães e Letícia Silva “Parceria L-asparaginase”, Karla Freire e Thays Oliveira “Parceria Biologia Molecular”. Agradeço aos ensinamentos, inúmeros auxílios, todo carinho compartilhado. Vocês são parte integrante desta conquista!

A Athaline Diniz, minha conterrânea e colega de departamento pelo incentivo e toda ajuda quando cheguei ao Recife.

As amigas de apartamento que nesses dois anos dividiram comigo tristezas, alegrias e vitórias: Danielly Andrade, Laís Morais e Heloíza dos Santos.

Aos amigos que sempre estiveram comigo, me dando apoio e conforto, Thiago Lins, Jânio Silva e Lucikléia Britto.

Haverá prazer maior do que contemplar a terra adornada de plantas, qual manto bordado, enfeitado com pérolas do Oriente e guarnecido de miríades de jóias raras e caras? (GERARD, 1597, p. 9).

RESUMO

Fungos endofíticos vivem com seus hospedeiros sem lhes causar danos, fornecendo-lhes condições adequadas para sobreviverem aos estresses do meio ambiente. As interações entre plantas e fungos endofíticos vêm evoluindo há milhões de anos e podem tornar-se ainda mais complexas se o hospedeiro for uma planta medicinal, pois alguns destes fungos produzem os mesmos compostos que seus hospedeiros. O objetivo deste trabalho foi analisar a diversidade de fungos da planta medicinal *Myracrodruon urundeuva* em brejo de altitude e Caatinga, Pernambuco, Brasil, e avaliar seu potencial para produção de L-asparaginase. Amostras de folíolos de *M. urundeuva* (Anacardiaceae) foram coletadas em duas áreas na floresta tropical seca (Caatinga) no nordeste do Brasil nos municípios de Serra Talhada (7°57'21.38"S, 38°17'43.92"W) e Triunfo (7°49'32.99"S., 38°6'54.21"O), Pernambuco, na estação seca (julho, 2016). Dados ecológicos de riqueza e diversidade foram obtidos. E para a produção da L-asparaginase foram selecionados 20 fungos endofíticos pertencentes a nove gêneros (sete isolados da Caatinga e 13 de brejo de altitude). O teste foi realizado através da fermentação submersa. Dos 672 fragmentos de folíolos analisados, foram isolados 187 fungos endofíticos (35 de Caatinga e 152 de brejo de altitude). A taxa de colonização para a Caatinga ficou em 10.41% e para brejo de altitude 39.58%. Com base nas sequências de ITS e resultados BLASTn, foram identificados 12 gêneros (*Diaporthe* foi o mais frequente). As análises filogenéticas indicaram a relação com sete ordens: Ascomycota (Botryosphaerales, Chaetothyriales, Diaporthales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, and Pleosporales) e uma ordem em Basidiomycota (Polyporales). Os resultados ecológicos apontaram o gênero *Talaromyces* (IndVal = 1; $p < 0,001$) indicador da Caatinga, e *Phyllosticta* (IndVal = 1; $p < 0,001$), *Diaporthe* (IndVal = 90%; $p < 0,006$) e *Colletotrichum* (IndVal = 79% $p < 0,026$) indicadores de brejo de altitude. A riqueza (sete espécies) e a diversidade ($H' = 3.41$) dos fungos endofíticos de brejo de altitude foram significativamente altas. O maior produtor de L-asparaginase foi *Diaporthe* sp. URM 7793, produzindo (2.41 U/g). A planta medicinal *M. urundeuva* apresenta importante diversidade de fungos endofíticos influenciada pelos fatores climáticos do ecossistema em que se desenvolve e estes fungos apresentam potencial para produção da enzima L-asparaginase.

Palavras-chave: Ecossistemas brasileiros. Endófitos. Enzimas. Riqueza de fungos.

ABSTRACT

Endophytic fungi lives with their hosts without any damage, contributing with adequate conditions to survive with environmental stresses. The interactions between endophytic plants and fungi have been evolving for millions of years and can become even more complex if the host for a medicinal plant, because some of these fungi produce the same compounds as their hosts. The objective of this work was to analyze the fungal diversity of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in *brejo de altitude* (montane rainforest), and Caatinga, Pernambuco, Brazil, and its potential for the production of L-asparaginase. Samples of *M. urundeuva* (Anacardiaceae) were collected in two areas in the Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in northeastern Brazil in the municipalities of Serra Talhada (7°57'21.38"S, 38°17'43.92"W) and Triunfo (7°49'32.99"S, 38°6'54.21"O), Pernambuco state, in dry season (July 2016). Ecological data of richness and diversity were obtained. And for the production of L-asparaginase 20 endophytic fungi belonging to nine genera (seven Caatinga and 13 montane rainforest isolates) were selected. The test was performed by submerged fermentation. Of the 672 fragments of leaflets analyzed, 187 endophytic fungi (35 from Caatinga and 152 from highland marsh) were isolated. The colonization rate for Caatinga was 10.41% and for *brejo* 39.58%. Based on the ITS sequences and BLASTn results, 12 genera were identified (*Diaporthe* was the most frequent). The phylogenetic analyses which indicated the relationship with seven orders in Ascomycota (Botryosphaeriales, Chaetothyriales, Diaporthales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, and Pleosporales) and one order in Basidiomycota (Polyporales). The results are ecological, indicating the genus *Talaromyces* (IndVal = 1, $p < 0.001$) indicative of Caatinga, and *Phyllosticta* (IndVal = 1, $p < 0.001$), *Diaporthe* (IndVal = 90%, $p < 0.006$) and *Colletotrichum* ($p < 0.026$) indicators of altitude *brejo*. A richness (seven species) and a diversity ($H' = 3.41$) of the endemic *brejo* endophytic fungi, which are high. The largest producer of L-asparaginase for *Diaporthe* sp. URM 7793, yielding (2.41 U / g). The medicinal plant *M. urundeuva* presents important diversity of endophytic fungi influenced by the climatic factors of the ecosystem in which it develops and these fungi presented potential for the production of the enzyme L-asparaginase.

Keywords: Brazilian ecosystems. Endophytes. Enzymes. Fungal richness.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representando a dinâmica dos brejos de altitude no Nordeste do Brasil.....	23
Figura 2 – Mapa abrangendo as regiões da Caatinga.....	27
Figura 3 – Mapa detalhando informações das áreas onde ocorrem a <i>M. urundeuva</i> .	28
Figura 4 – Ilustração de <i>M. urundeuva</i> Allemão.....	29
Figura 5 – Exemplar de <i>M. urundeuva</i> Allemão (aroeira do sertão).....	30
Figura 6 – Esquema ilustrando o processo de reação da enzima L-asparaginase.....	34
Figura 7 – Brejo de altitude no município de Triunfo-PE.....	38
Figura 8 – Vista de duas áreas de coletas em áreas de brejo de altitude no município de Triunfo-PE. A: área 1 e B: área 2.....	38
Figura 9 – Vista de duas áreas de coletas em áreas de brejo de altitude no município de Triunfo-PE. A: área 1 e B: área 2.....	38
Figura 10 – Vista do açude Saco, localizado na fazenda Saco, no município de Serra Talhada-PE.....	39
Figura 11 – Vista de duas áreas de coletas nas proximidades do açude Saco no município de Serra Talhada-PE. A: área 1 A e B: área 2.....	39
Figura 12 – Vista de duas áreas de coletas nas proximidades do açude Saco no município de Serra Talhada-PE. A: área 1 A e B: área 2.....	39
Figura 13 – Exemplar de galho de <i>M. urundeuva</i> coletado em brejo de altitude.....	40
Figura 14 – Esquema representando o isolamento dos fungos endofíticos dos folíolos de <i>M. urundeuva</i>	40
Figura 15 – Fragmentos colonizados por fungos em meio BDA de brejo de altitude (B, C), em meio BDA de Caatinga (A, D, E) e de meio CDM - brejo de altitude (F) após 15 dias de encubamento das placas.....	46
Figura 16 – Morfologia de representantes dos gêneros identificados no presente estudo. A: <i>Earlliella</i> sp., B: <i>Talaromyces</i> sp, C: <i>Phyllosticta</i> sp., D: <i>Diaporthe</i> sp. E: <i>Colletotrichum</i> sp. F: <i>Sarocladium</i> sp., G: <i>Neofusicoccum</i> sp., H: <i>Alternaria</i> sp. I: <i>Rinocladiella</i> J: <i>Incertai sedis</i> (Diaporthale), K: <i>Exserohilum</i> , L: <i>Penicillium</i>	48
Figura 17 – Percentual dos fungos dos gêneros de brejo de altitude e Caatinga.....	49
Figura 18 – Gráfico apresentando a frequência absoluta de fungos em brejo de altitude e Caatinga.....	50

Figura 19 – Árvore de máxima verossimilhança (ML) obtida de sequências de rDNA de ITS de 158 fungos endofíticos isolados de folíolos da planta medicinal <i>M. urundeuva</i> crescendo em uma floresta seca tropical brasileira (Caatinga). <i>Earliella scabrosa</i> (Basidiomycota, URM 7788 e MUCL 45097) foi utilizado como grupo de saída. Os valores de suporte do ML bootstrap acima de 50% e as probabilidades posteriores do BI acima de 0,80 são mostradas nos nós.....	54
Figura 20 – Diagrama de Venn mostrando números de fungos endofíticos únicos e compartilhados entre as áreas de Caatinga e brejo de altitude.....	56
Figura 21 – Escala multidimensional não métrica (NMDS) dos conjuntos de fungos endofíticos de folíolos de <i>M. urundeuva</i> em áreas de Caatinga e brejo de altitude.....	56
Figura 22 – (a,b). Curvas de acumulação de espécies de fungos endofíticos dos folíolos de <i>M. urundeuva</i> , mostrando a riqueza registrada (Rich.obs) e estimado (Chao1) nas áreas de Caatinga (a) e de brejo de altitude (b).....	57
Figura 23 – (a,b,c). Boxplot indicando a riqueza (a) e a diversidade baseada nos índices de Shannon-Wiener (b) e Fisher (c) de fungos endofíticos de folíolos de <i>M. urundeuva</i> em áreas de Caatinga e brejo de altitude, no Brasil. Os asteriscos (*) indicam valores significativamente maiores do ANOVA de sentido único baseado em atributo avaliado. Mediano (ponto central), quartil (caixa), máximo e mínimo (bigodes) são mostrados.....	56
Figura 24 – Aumento da biomassa fúngica no meio CDM de pré-fermentação no teste de L-asparaginase.....	59
Figura 25 – Produção da enzima L-asparaginase pelos fungos endofíticos da <i>M. urundeuva</i> nos dois ambientes analisados.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos endofíticos isolados de importantes plantas medicinais.....	22
Tabela 2 – brejos de altitude de Pernambuco até a década de 1970.....	25
Tabela 3 – Substâncias químicas encontradas nas folhas e cascas da <i>M. urundeuva</i>	31
Tabela 4 – Diversidade, Riqueza e Frequência relativa dos fungos endofíticos isolados de folíolos de <i>M. urundeuva</i> , coletados em brejo de altitude e Caatinga.....	55
Tabela 5 – Atividade de L-asparaginase obtida por fungos endofíticos isolados de folíolos da planta medicinal <i>M. urundeuva</i> nos ecossistemas de Caatinga e brejo de altitude.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	Ácido L-aspartil-B-Hidroxiâmico
ASNase	L-asparaginase
BDA	Ágar Batata Dextrose
CDM	Czapek Dox modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCl	Ácido clorídrico
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
ITS	Internal transcript Spacer
LLA	Leucemia linfóide aguda
LSU	Large Subunit
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio numa solução
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDTFs	Seasonally Dry Tropical Forests
U	Unidade de atividade enzimática
U/g ⁻¹	Unidade de atividade enzimática por grama
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS – HISTÓRICO, DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE.....	17
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	19
2.3 OS BREJOS DE ALTITUDE.....	23
2.4 CAATINGA: UMA FLORESTA SECA BRASILEIRA.....	26
2.5 <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> ALLEMÃO.....	28
2.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ANACARDEACEAE.....	31
2.7 RELAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFITICOS COM ENZIMAS ANTICANCERÍGENAS.	32
2.8 CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA L-ASPARAGINASE.....	33
2.9 PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO.....	37
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	39
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	41
3.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	42
3.5 ANÁLISES ECOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS.....	42
3.6 SELEÇÃO DE FUNGOS QUANTO À PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE (ASNASE).....	43
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA L- ASPARAGINASE.....	45
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE.....	45
3.9 LISTA DOS MEIOS DE CULTURA E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 ISOLAMENTO A PARTIR DOS FOLÍOLOS DE <i>M. URUNDEUVA</i>	46
4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>M.</i> <i>URUNDEUVA</i>	47
4.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	53
4.4 ANÁLISES ECOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS.....	54
4.5 PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE.....	58

5 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A - LISTA DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	85
APÊNDICE B - LISTA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS.....	86
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO (ICMBIO).....	87

1 INTRODUÇÃO

Os fungos que se abrigam no interior de tecidos vegetais são conhecidos como fungos endofíticos (AZEVEDO et al., 2000), já tendo sido encontrados em uma ampla diversidade de espécies de plantas, desde as algas até as imponentes angiospermas (FELÍCIO et al. 2015; ARNOLD & LUTZONI 2007; ARNOLD et al. 2000).

Os fungos endofíticos habitam seus hospedeiros sem lhes causar qualquer dano, contribuindo com condições adequadas para estes hospedeiros sobreviverem em condições de estresses, como altas temperaturas e escassez de nutrientes em ambientes áridos (PETRINI, 1991; KHIDIR et al. 2010; HARDOIM et al. 2015). Estas interações ecológicas entre fungos e plantas ao que parece vinheram evoluindo há milhões de anos com as plantas terrestres superiores, como mostram registros de fungos em fósseis de vegetais (KRINGS et al. 2007).

A relação entre os fungos endofíticos e as plantas pode tornar-se ainda mais complexa se os hospedeiros forem plantas medicinais, pois, neste caso alguns fungos podem produzir os mesmos compostos que seus hospedeiros (STIERLE et al. 1993; ZHAO et al. 2011; VENIERAKI et al. 2017). O fungo endofítico *Taxomyces andreanae* foi o primeiro a ser relatado produzindo o mesmo metabólito secundário (taxol/paclitaxel) que seu hospedeiro, a planta medicinal *Taxus brevifolia* (STIERLE et al. 1993). A partir daí, inúmeros estudos foram realizados e novos fungos relatados como produtores de compostos, produzidos também por seus hospedeiros (KUMAR et al. 2013; SEETHARAMAN et al. 2017).

Em países em desenvolvimento, 80% das pessoas utilizam na medicina popular produtos oriundos de plantas medicinais. E devido à elevada demanda por estes vegetais em todo o mundo, as populações de espécies nativas que apresentam grande importância biológica e potencial biotecnológico podem entrar em declínio (CHEN et al. 2016). Uma dessas plantas é *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardeaceae), conhecida popularmente como aroeira do sertão, que tem distribuição geográfica na América Central e do Sul (MONTEIRO et al. 2012). Esta espécie, nativa do Brasil saiu recentemente da lista de plantas ameaçadas de extinção, porém, seu uso indiscriminado, principalmente na indústria madeireira pode novamente colocá-la em perigo (IUCN, 2017). A *M. urundeuva* apresenta uma vasta finalidade para uso da medicinal popular, sendo alvo de estudos de vários pesquisadores. Suas cascas e folhas têm inúmeras propriedades com atividade anti-inflamatória, antiulcerogênica, cicatrizante e algumas

pesquisas científicas investigaram essas potencialidades (VIANA et al. 1995; MORAIS et al. 1999; MAHMOUD et al. 2011). No Brasil, a *M. urundeuva* além de estar presente no Cerrado, abrange grande área da Caatinga, e trechos de brejos de altitude, que são fragmentos da floresta atlântica dentro da Caatinga, em áreas de grande altitude (PEREIRA FILHO & MONTINGELLI 2011).

A floresta seca tropical do Brasil, a Caatinga, vem demonstrando ter uma alta diversidade de fungos endofíticos com potencial biotecnológico que precisa ser melhor estudada (SANTOS et al. 2015; BEZERRA et al. 2013; CAVALCANTI et al. 2017). Esses ecossistemas frequentemente vêm sofrendo uma série de pressões antrópicas o que pode ocasionar a perda de sua biodiversidade em grande escala, inclusive da comunidade de fungos endofíticos que habita a sua flora medicinal, pois quando se perde uma espécie vegetal importante, perde-se a oportunidade de isolar um fungo endofítico produtor de substâncias valiosas para a ciência, como as enzimas.

A enzima L-asparaginase vem sendo amplamente estudada por pesquisadores por ser utilizada principalmente no tratamento da leucemia linfóide aguda, um câncer que afeta, sobretudo crianças e adolescentes (PIETERS et al. 2011). O fármaco atual utilizado no tratamento da doença é originado de bactérias, o que pode ocasionar nos pacientes efeitos colaterais. Por outro lado, a enzima produzida a partir de fungos é mais viável por não apresentar tais efeitos (SARQUIS et al. 2004).

Portanto, torna-se de suma importância o estudo da diversidade fúngica da espécie vegetal *M. urundeuva* e seu potencial para produção da enzima L-asparaginase, sendo este o primeiro estudo sobre a capacidade de produção desta enzima por fungos isolados desta espécie de planta.

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e identificar por ferramentas morfológicas e moleculares os fungos da planta medicinal *M. urundeuva* em áreas de brejo de altitude e de Caatinga e avaliar seu potencial para produção de L-asparaginase. E os específicos foram:

- Enriquecer as bases de dados genéticos de micro-organismos de áreas de brejo de altitude e Caatinga.
- Apresentar dados ecológicos da estimativa da riqueza, diversidade, abundância relativa e similaridade dos fungos isolados;
- Selecionar isolados de fungos com potencial para produção de L- asparaginase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS – HISTÓRICO, DISTRIBUIÇÃO E DIVERSIDADE

O termo endófito é derivado do grego (éndon significa interior e phytón que significa planta), que quer dizer ‘no interior da planta’. A retrospectiva da história dos fungos endofíticos mostra que existem várias controvérsias em torno de seu conhecimento, porém, diante do avanço dos estudos, as pesquisas vêm cada vez mais decifrando e relatando a vida inédita desses micro-organismos (BARY, 1866 apud GAMBOA GAITAN, 2006).

As primeiras definições sobre fungos endofíticos são de Carroll (1986, p. 205) “Mutualísticos, estes fungos colonizam partes de tecidos de plantas vivas e não causam sintomas de doenças”. Os fungos endofíticos foram citados pela primeira vez no início do século XIX, e por muito tempo suas características ecológicas e fisiológicas permaneceram obscuras, pelo fato de terem sido estudadas aprofundadamente somente no fim da década de 70. Desde então, os fungos endofíticos passaram a ganhar destaque por ser constatado que desempenhavam relações simbióticas importantes com seus hospedeiros, protegendo as plantas contra o ataque de insetos, das doenças e herbívoros (CARROLL et al. 1977; PETRINI & CARROLL, 1981; CARROLL, 1986).

Este interessante grupo de fungos pode habitar o interior de vários tecidos vegetais, incluindo raízes, caule e especialmente suas partes aéreas como folhas, ramos, flores, frutos e sementes durante todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar-lhes danos visíveis e não desenvolvendo estruturas externas (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al. 2000; AZEVEDO & ARAÚJO, 2007). O que vai delimitar a diferença dos fungos endofíticos com outros que também mantêm um vínculo com as plantas (os epifíticos que habitam a superfície das plantas e os fitopatógenos que causam doenças em plantas) é o estágio que a interação “planta-microrganismo” ocorre, sendo estes termos meramente conceituais (AZEVEDO et al. 2000).

As interações existentes entre o endófito e o hospedeiro são de mútuo benefício, onde o microrganismo se beneficia com proteção e nutrientes, enquanto a planta se beneficia das condições favoráveis para um bom crescimento e resistência aos estresses ambientais (SAIKKONEM et al. 2004). Essas interações parecem estar bastante intrincadas, pois, em estudos de tecidos fossilizados, foi constatado que as relações

“planta-microrganismo” evoluíram há mais de 400 milhões de anos, e nesse processo os fungos desencadearam a passagem das plantas para a Terra (PIROZYNSKI & MALLOCH, 1975; TAYLOR & TAYLOR, 2000; KRINGS et al. 2007).

Segundo Cannon & Simmons (2002) as plantas tropicais são um dos ambientes mais favoráveis à colonização de fungos endofíticos, assim como estudos de Arnold et al. (2001) que relataram 418 morfoespécies de fungos endofíticos de espécies vegetais de florestas no Panamá. Entretanto, as florestas tropicais secas não acompanham esses números, apresentando uma diversidade menor, como em estudos de Suryanarayanan et al. (2003) que relataram uma diversidade inferior de fungos na floresta tropical seca da Índia, o que pode estar relacionado as condições climáticas desfavoráveis como as precipitações escassas, o que reflete em uma menor densidade dos vegetais dessas áreas. Por outro lado, alguns estudos nos ambientes de florestas tropicais secas mostram dados diferentes, onde há uma hiper diversidade de fungos endofíticos, sugerindo que esses ecossistemas devem ser melhor estudados (BEZERRA et al. 2012). As pesquisas existentes sugerem que em locais semiáridos há uma frequência maior de fungos pigmentados, seja em áreas de menor ou maior latitude (LORO et al. 2012). Nestes casos, nota-se que provavelmente esses micro-organismos oferecem proteção à planta contra os efeitos da radiação e das adversidades do clima seco (KHIDIR et al. 2010). Além disto, o clima e as estações do ano nesses ambientes são cruciais no número e na diversidade da comunidade de fungos (SANTOS et al. 2014), assim como a fase de desenvolvimento da planta e o ponto onde eles se alojam.

Segundo Petrini et al. (1992) os fungos endofíticos não apresentam especificidade por hospedeiros, podendo colonizar diferentes partes da planta e são vários os fatores que podem influenciar na colonização desses tecidos. Entre eles o intemperismo da cutícula, textura do tecido, modificações na fisiologia e propriedades químicas do vegetal (PETRINI & CARROLL, 1981; PHOTITA et al. 2001). Além disto, Carroll (1988) e Nascimento et al. (2015) citam outros fatores como idade da planta, fatores climáticos e distribuição geográfica. Por outro lado, outros autores mostram que os vegetais podem ser colonizados por fungos endofíticos mediante um nível de especificidade e uma relação co-evolucionária entre o endófito e o hospedeiro (CROUS, 2000).

As partes superiores dos vegetais normalmente são as mais habitadas pelos fungos endofíticos, como as folhas, galhos, cascas, pecíolos e estruturas reprodutivas. Siqueira et al. (2011) constatou um maior número de fungos habitando folhas de *Lippia*

sidoides e uma menor quantidade no caule. As folhas parecem ser um ambiente propício à colonização dos fungos endofíticos, sobretudo as folhas mais velhas. Neste caso ocorre uma distinção na relação de desenvolvimento desses micro-organismos entre folhas adultas e jovens. Trabalhos mostram que as folhas adultas apresentam maior quantidade de fungos habitando seu interior, enquanto nas folhas jovens é relatada uma quantidade menor e isso pode estar vinculado ao fato do maior tempo de exposição das folhas ao ambiente o que acarreta a maior colonização dos endófitos nas folhas adultas (ARNOLD & HERRE 2003; PIMENTEL et al. 2006). Além disto, segundo Coley & Barone (1996) substâncias antifúngicas presentes nas folhas jovens podem estar envolvidas na menor taxa de colonização desses substratos.

O conhecimento a respeito da diversidade de fungos endofíticos e, sobretudo de suas relações com seus hospedeiros é ainda uma rede de complexidade que a ciência vem descobrindo lentamente. Os estudos dos fungos endofíticos vêm demonstrando que existe uma grande quantidade desses microrganismos habitando vegetais, revelando que possam existir pelo menos um milhão de espécies residindo em plantas (DREYFUSS & CHAPELA, 1994). Os fungos endofíticos mais frequentemente isolados de plantas correspondem a espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Phomopsis*, *Fusarium* e *Xylaria* (ARAÚJO et al. 2001; PEREIRA et al. 1999; PHOTITA et al. 2001; BEZERRA et al. 2012). Estes fungos podem habitar os mais variados grupos de plantas existentes no planeta. Exemplos: algas marinhas (FELÍCIO et al. 2015), plantas herbáceas (TAECHOWISAN et al. 2003), plantas frutíferas (RODRIGUES & SAMUELS, 1999; ARAÚJO et al. 2001; LUZ et al, 2006), plantas ornamentais (SALAZAR & GARCIA, 2005; BEZERRA et al. 2017), plantas medicinais (HUANG et al. 2008; MUSSI-DIAS et al. 2012; BEZERRA et al. 2013; 2015) e tantas outras.

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são aquelas que apresentam propriedades terapêuticas quando administradas ao homem ou animal, por diversas vias (LOPES ET AL. 2005), podendo ser utilizadas de diversas formas: consumidas *in natura* por meio das partes inteiras, por chás, infusões, utilizadas em rituais religiosos, extratos brutos ou enriquecidos, tinturas, pós, comprimidos, cápsulas, etc. Antes de serem usadas, podem ainda passar por processos de purificação para a extração de substâncias mais

elaboradas (RATES, 2001). Seu uso é regulamentado pelo órgão do Ministério da Saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2006).

Existe uma relação complexa das plantas medicinais com os fungos endofíticos. Sabe-se que algumas propriedades que esses vegetais apresentam estão associadas ao potencial de produção de metabólitos secundários dos fungos endofíticos, podendo ocorrer também transferência de informações genéticas dos fungos para suas plantas hospedeiras, mediante mecanismos evolutivos (STROBEL, 2002).

Na literatura há inúmeros registros de fungos endofíticos habitando plantas medicinais, como a planta *Ginko biloba*, uma das espécies vegetais mais antigas do mundo, conhecida por suas valiosas propriedades medicinais (DEFEUDIS, 1991). Desta espécie já foram relatados gêneros de fungos endofíticos produtores de compostos metabólicos (QIN et al. 2009). Outros estudos de Huang et al. (2008) também na China, relataram fungos de 39 gêneros diferentes em 29 tradicionais plantas medicinais chinesas, entre eles, *Colletotrichum*, *Phoma* e *Alternaria*. Mussi Dias et al. (2012) isolaram fungos de 11 espécies de plantas medicinais no Brasil, incluindo *Vernonia condensata* (boldo-do-chile), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Cymbopogon nardus* (citronela), *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Punica granatum* (romã), *Morus nigra* (amora-negra) e *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca), onde os gêneros de fungos mais frequentes foram: *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Nigrospora*. Há também relatos de fungos endofíticos em outras ervas mundialmente utilizadas na medicina popular, como *Foeniculum vulgare* (erva-doce) de onde foi isolado *Trichoderma* sp. e *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), isolados *Alternaria alternata* e *Drechslera dematioidea*, sendo que este último fungo apresentou potencial antimicrobiano (MUSSI-DIAS et al. 2012; SIQUEIRA et al. 2011).

Das fruteiras medicinais como *Punica granatum* (romã) foi encontrado com abundância o gênero *Colletotrichum* por Gomes (2008) e em estudos de Silva et al. (2006) foram isolados de *Annona squamosa* (pinha) os gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Nigrospora*, *Penicillium* e *Phomopsis*, onde alguns isolados demonstraram ser bons produtores das enzimas protease e lipase. De *Anacardium occidentale* (cajuero) foi relatada uma alta frequência da espécie *C. gloeosporioides* em estudos de Freire & Bezerra (2001). Esses autores também encontraram *Phomopsis* sp. em *Syzygium jambolanum* (azeitona), porém em baixa frequência.

As plantas medicinais de ambientes secos apresentam vantagens fisiológicas por suas características xerófitas, destacando-se como resistentes às adversidades do ambiente. São plantas que suportam longos períodos hostis de seca, o que permite um equilíbrio ambiental, que conseqüentemente diminui as constantes degradações no ecossistema (ARRIEL et al. 2004). Deste ambiente há relatos de uma diversidade fúngica ainda pouco conhecida e explorada.

Prathyusha (2015) isolou 24 espécies de fungos endofíticos de uma floresta seca de Bhadrachalam, na Índia a partir de plantas medicinais, sendo encontradas com maior frequência espécies como *Acremonium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Alternaria* e *Colletotrichum*. E em regiões áridas do norte da Austrália foram isolados fungos endofíticos de plantas medicinais do gênero *Nicotiana*, onde os gêneros de fungos mais frequentemente isolados foram *Aspergillus*, *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Lecythophora*, *Penicillium*, *Setophom* e *Trichoderma* (DASTOGEER et al. 2018).

A floresta seca brasileira, a Caatinga, apresenta espécies vegetais medicinais de extrema importância, sendo altamente utilizadas na medicina popular (SILVA & ALBUQUERQUE 2005), porém existem várias lacunas sobre a comunidade endofítica que habita estas plantas. Freire & Gonçalves (2012) isolaram *Paecilomyces* sp. de *Spondias tuberosa* (umbuzeiro), uma importante planta medicinal nativa do semiárido brasileiro. Magalhães et al. (2017) também isolaram este fungo na *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira) e de *Hyptis suaveolens* (bamburral). De *Jatropha molíssima* (pinhão) foram isolados fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*. De *Cnidoscopus phyllacanthus* (faveleira), estes mesmos autores e Freire & Gonçalves (2012) encontraram os seguintes gêneros de fungos: *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Aspergillus* e *Curvularia*. Outros estudos mostram a diversidade de fungos endofíticos de cactáceas. Em *Cereus jamacaru* (mandacaru) já foram isolados *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* e *Cladosporium cladosporioides* (BEZERRA et al. 2013) e da *Opuntia ficus indica* (palma forrageira) já foram relatados 46 fungos endofíticos de tecidos saudáveis, a maioria identificada como *Chrysonilia sitophila* (FREIRE et al. 2015). A tabela 1 apresenta exemplos de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais.

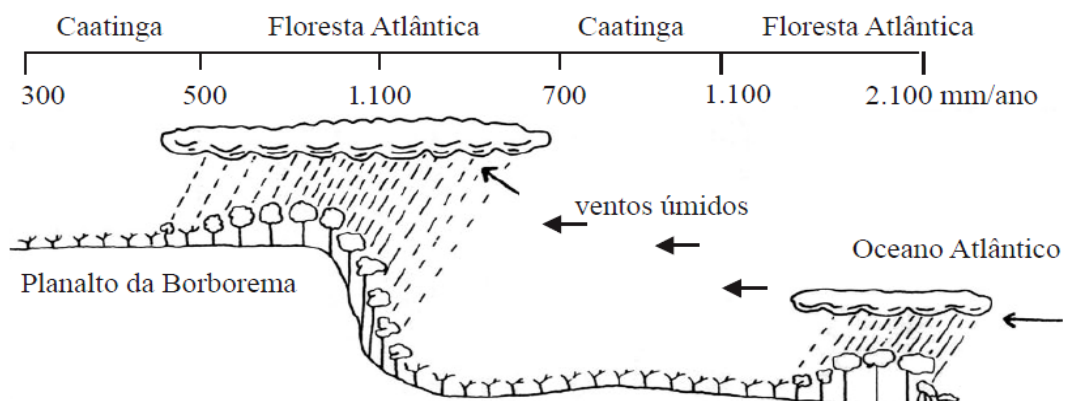
Tabela 1. Fungos endofíticos isolados de importantes plantas medicinais.

Planta medicinal hospedeira	País	Gênero de fungo endofítico mais frequente	Autores e ano de publicação
<i>Aegle marmelos</i> , <i>Aristolochia indica</i> e <i>Mitragyna parvifolia</i>	Índia	<i>Mycelia sterilia</i>	Prathyusha, 2015
<i>Anacardium occidentale</i> (cajuzeiro)	Brasil	<i>Phoma</i>	Oliveira, 1999
<i>Artemisia lactiflora</i> (artemísia-branca)	China	<i>Coletotrichum</i>	Huang et al. 2008
<i>Artemisia mongolica</i>	China	<i>Colletotrichum</i>	Zou et al. 2000
<i>Bauhinia forficata</i> (pata de vaca)	Brasil	<i>Myrothecium</i>	Bezerra et al. 2015
<i>Camellia sinensis</i> (chá-da-índia)	Indonésia	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Schizophyllum</i> sp., <i>Diaporthe</i> sp.	Agusta, 2006
<i>Camptotheca cuminata</i>	China	<i>Colletotrichum</i>	Liu et al. 2013
<i>Baccharis trimera</i> (carqueja)	Brasil	<i>Diaporthe</i>	Vieira et al. 2014
<i>Cereus jamacuru</i> (mandacaru)	Brasil	<i>Cladosporium</i> e <i>Fusarium</i>	Bezerra et al. 2013
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	Austrália	<i>Muscodor</i>	Worapong et al. 2001
<i>Citrus</i> spp. (citrinos)	Brasil	<i>Cryptococcus</i>	Gai et al. 2009
<i>Coffea arabica</i> (cafezeiro)	-	<i>Colletotrichum</i>	Tejesvi et al. 2006
Espécies do gênero <i>Nicotiana</i>	Austrália	<i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> e <i>Chaetomium</i>	Dastogeer, 2018
<i>Eucalyptus</i> (eucalipto)	Uruguai	<i>Plectosphaera</i>	Bettucci & Saravay 1993
<i>Euterpe oleracea</i> (açazeiro)	Brasil	<i>Xylaria</i> e <i>Letendraeopsis</i>	Rodrigues, 1994
<i>Ginkgo biloba</i>	China	<i>Colletotrichum</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Phomopsis</i>	Zheng et al. 2013
<i>Glycine max</i> (soja)	Brasil	<i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Mycelia sterilia</i>	Pimentel et al. 2006
<i>Heterosmilax japonica</i>	China	<i>Phomopsis</i> e <i>Glomerella</i>	Gao et al. 2005
<i>Ilex paraguariensis</i> (erva-mate)	Brasil	<i>Penicillium</i> sp.	Pimentel et al. 2006
<i>Lipia sidoides</i> (alecrim- pimenta)	Brasil	<i>Colletotrichum</i>	Siqueira et al. 2011
<i>Morus nigra</i> (amoreira), <i>Vernonia condensata</i> (boldo)	Brasil	<i>Phomopsis</i> sp.	Mussi-dias et al. 2012
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira do sertão)	Brasil	<i>Guignardia</i>	Rodrigues et al. 2004
<i>Olea europaea</i> (árvore oliveira)	Portugal	<i>Epicoccum</i> , <i>Alternaria</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp.	Landum et al. 2015
<i>Oppunia ficus indica</i> (figueira-da-Índia)	Brasil	<i>Chrysonilia</i>	Bezerra et al. 2013
<i>Salvia multiorrhiza</i> (sálvia)	China	<i>Alternaria</i> sp.	Lou et al. 2013
<i>Spondias mombin</i> (cajazeira)	Brasil	<i>Guignardia</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp. e <i>Pestalotiopsis</i>	Rodrigues et al. 2000
<i>Taxus mairei</i>	China	<i>Mucor</i> sp.	Huang et al. 2008
<i>Thitonia diversifolia</i> (girassol silvestre)	Brasil	<i>Phoma</i>	Borges et al. 2008
<i>Thymus</i> sp.	Iran	<i>Alternaria</i> , <i>Phoma</i> e <i>Fusarium</i>	Masumi et al. 2015
<i>Withania somnifera</i> (ginseng indiano)	Índia	<i>Alternaria</i>	Tenguria et al. 2015
<i>Zenziber officinale</i> (gengibre)	Índia	<i>Pomopsis</i> sp.	Anisha & Radhakrishnan 2017

2.3 OS BREJOS DE ALTITUDE

Os brejos de altitude fazem parte de trechos da composição da floresta Atlântica do Nordeste, sendo áreas com condições climáticas diferenciadas das áreas semiáridas circunvizinhas (ANDRADE-LIMA, 1982; MEDEIROS et al. 2017). As chamadas “ilhas” de floresta úmida, estes ambientes apresentam um elevado índice de precipitação devido aos planaltos e chapadas existentes (e.g., Borborema, Chapada do Araripe, Chapada de Ibiapaba) com altitude de 500 a 1100 m (Figura 1) (ANDRADE-LIMA, 1966; PORTO et al. 2004). Os brejos apresentam valiosos dados históricos referentes à antiga distribuição da diversidade em épocas passadas. O recuo das florestas ocasionado por modificações climáticas fez com que algumas espécies sobrevivessem como “refugiadas” em uma área de microclima favorável, o que acarretou diferenciações genéticas dentro dos táxons animais e vegetais nestas áreas. (BIGARELLA et al. 1975).

Figura 1. Esquema representando a dinâmica dos brejos de altitude no Nordeste do Brasil.



Fonte: Adaptado de Mayo & Fevereiro (1982).

A grande maioria dos brejos são fragmentos de floresta Subperenifolia Tropical Plúvio-Nebular (ANDRADE-LIMA, 1982), composição da floresta Atlântica brasileira. Provavelmente a origem vegetacional dos brejos de altitude está relacionada às mudanças climáticas que ocorreram no pleistoceno (últimos 2 milhões - 10.000 anos). Neste tempo a floresta Atlântica penetrou nos domínios da Caatinga, e após períodos interglaciais permaneceu em áreas de microclima favorável. Desta forma, as espécies da floresta Atlântica ali presentes podem ser consideradas “refugiadas” nos enclaves da Caatinga. Ali, habitam também espécies de plantas da Amazônia, de florestas serranas

do sul e do sudeste do Brasil (ANDRADE-LIMA, 1982; PORTO et al. 2004). Devido as regiões de altitude do Nordeste brasileiro apresentarem um padrão ambiental com peculiaridades à cerca de seus fatores climáticos, a biodiversidade nesta área de transição torna-se mais alta que nas outras áreas de entorno (CABRAL et al., 2004), incluindo espécies endêmicas de plantas e animais (TABARELLI et al. 2001, SIQUEIRA-FILHO et al. 2008).

As atividades de agricultura como o cultivo de culturas de subsistência e a retirada seletiva de plantas, incluindo as medicinais, assim como também a caça de subsistência têm se tornado grandes ameaças para os brejos de altitude que além de perderem parte da biodiversidade estão fragmentando-se cada vez mais, tornando-se áreas ameaçadas (VASCONCELOS SOBRINHO, 1971; SILVA & TABARELLI, 2000). Pernambuco é o estado do Nordeste que apresenta a maior quantidade de brejos de altitude, tendo sido registrados 23 até a década de 70 (TABARELLI & SANTOS, 2004), como pode ser observado na Tabela 2.

Com base em dados de composição vegetal, riqueza brioflorística, predominância de táxons, vulnerabilidade de espécies, estudos mostram que a maioria dos brejos de altitude da Paraíba e de Pernambuco necessita de proteção, pois apresentam características exclusivas relacionadas à sua biodiversidade. Um desses ambientes é o brejo de Triunfo (BT) que vem sofrendo um alto nível de pressão antrópica, estando na categoria de prioridade extremamente alta para conservação. Esse setor exhibe alguns remanescentes de mata serrana em áreas particulares. Lá já foram realizados estudos florísticos e fitossociológicos de fanerógamas, de acordo com gradientes altitudinais (TABARELLI & SANTOS, 2004). Estudos de Ferraz et al. (1998) em ambiente de brejo de altitude e em Caatinga relataram a presença principalmente de espécies pertencentes as famílias Cactaceae, Euphorbiaceae e Anacardiaceae. As plantas de brejo de altitude são de grande porte, possivelmente devido às boas condições hídricas proporcionadas pela altitude.

Tabela 2. Brejos de altitude de Pernambuco até a década de 1970

Brejos	Município	Localização (Lat. S, Long. W)
Agrestina	Agrestina	8° 27', 35° 56'
Bezerros	Bezerros	8° 19', 36° 25'
Brejo dos Cavalos	Caruaru	8° 16', 35° 58'
Camocim de São Felix	Camocim de São Félix	8° 21', 35° 45'
Catimbau	Buíque	8° 37', 37° 8'
Gravatá	Gravatá	8° 12', 35° 32'
Mimoso	Arcoverde	8° 25', 37° 2'
Poçoões	Poçoão	8° 11', 36° 42'
São José	Moxotó	8° 43', 37° 31'
São Miguel	São Miguel	7° 20', 38° 39'
Serra de Ororubá	Pesqueira	8° 19', 36° 46'
Serra do Arapuã	Floresta	8° 36', 38° 34'
Serra do Araripe	Exu	7° 30', 39° 43'
Serra do Comunati	Águas Belas	9° 5', 37° 7'
Serra do Genipapo	Sanharó	8° 21', 36° 32'
Serra do Olho d'Água	Belo Jardim	8° 19', 36° 25'
Serra do Vento	Belo Jardim	8° 19', 36° 25'
Serra Negra	Bezerros	8° 13', 35° 46'
Serra Negra	Floresta	8° 36', 38° 34'
Tacaratu	Tacaratu	9° 05', 38° 7'
Taquaritinga	Taquaritinga	7° 54', 36° 1'
Triunfo	Triunfo	7° 49', 38° 6'
Varas	Arcoverde	8° 25', 37° 2'

Fonte: Adaptado de dados de Vasconcelos Sobrinho (1971)

Segundo trabalhos a respeito da diversidade em gradientes altitudinais, podem ocorrer três tipos de padrões de variação de diversidade e distribuição de espécies: 1) padrão “monotônico decrescente” – o número de espécies diminui conforme a altitude aumenta; 2) padrão constante decrescente – o número de espécies é constante em baixas altitudes e menor em altas altitudes; 3) padrão unimodal parabólico – a riqueza de espécies é mais alta no meio do gradiente, ou seja, a maior diversidade permanece em altitudes intermediárias, sendo este o padrão mais frequente na natureza (RAHBK et al. 2007).

A comunidade de fungos que habitam os brejos de altitude nordestinos ainda é pouco conhecida. Há relatos de Myxomycetes (SILVA & CAVALCANTI, 1988), de fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota) (SILVA et al. 2014) e de fungos do gênero *Mucorales* isolados do solo (SANTIAGO et al. 2013). Já foram encontrados também fungos endofíticos habitando folhas de bananeira (ASSUNÇÃO, 2010). Entretanto, apesar da ampla variedade de vegetais existentes nesse ambiente, os fungos endofíticos que se abrigam nessas plantas são pouco conhecidos e explorados.

2.4 CAATINGA: UMA FLORESTA SECA BRASILEIRA

As florestas secas, segundo Holdridge (1967) estão em áreas com as seguintes características: temperatura que ultrapassa 17° C, precipitação média de 250 a 2000 mm e a evapotranspiração sob precipitação é maior que 1. Outros autores, como Murphy & Lugo (1986), apresentam as florestas secas com uma estação seca bem definida e consideram o padrão de 500 a 2000 mm de precipitação como média anual.

Áreas da vegetação do México do Sul e da América Central, assim como do Caribe e grande parte da vegetação de florestas intratropicais do planeta é considerada floresta seca tropical (MURPHY & LUGO, 1995). No Brasil, essas formações vegetacionais fazem parte de um complexo chamado Caatinga, sendo áreas que apresentam uma vegetação predominantemente xerófito (ANDRADE-LIMA, 1981; SANTOS et al. 2014). A Caatinga faz parte do domínio das florestas tropicais sazonalmente secas, nomeadas de *Seasonally Dry Tropical Forests* (SDTFs) (ESPÍRITO SANTO, 2009), que sofrem gradativamente processos de degradação alarmantes.

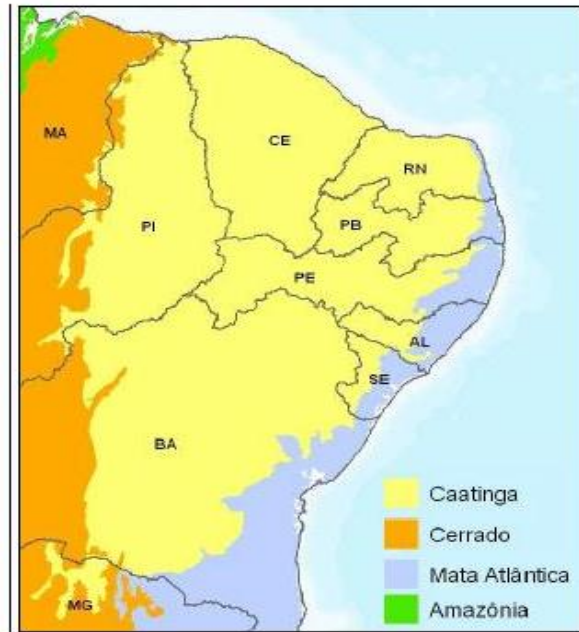
O termo “caatinga” significa “floresta branca” em tupi-guarani, pois esta vegetação é marcada pela perda das folhas na estação seca, sendo possível ver troncos opacos, quase sem vida (ALBUQUERQUE & BANDEIRA, 1995). Trata-se de um ecossistema exclusivo do país que possui uma vegetação influenciada por um período chuvoso curto e um período seco prolongado. E devido a esta característica de deficiência hídrica, as plantas nessas áreas apresentam-se decíduas (MURPHY & LUGO, 1986; RODAL, 1992).

A Caatinga abrange vários estados do Nordeste, incluindo grande parte de Pernambuco (GIULIETTI et al., 2006). No Nordeste sua vegetação cobre uma área de 800.000 Km² (70% da região) (Figura 2), e deste percentual 50% possuem água subterrânea (MARACAJÁ & BENEVIDES, 2006). Sua vegetação permanece como a mais degradada da América do Sul e de sua área protegida, apenas 1% encontra-se em reservas (GIULIETTI et al. 2006).

As áreas da Caatinga, apesar de serem muito heterogêneas, possuindo ampla diversidade de espécies e endemismo, vêm passando por processos de pressões antrópicas (MMA, 2002; SANTOS et al. 2014). Além disto, sua biodiversidade ainda pouco conhecida tem sido subestimada (SILVA & TABARELLI, 2000). A vegetação de caatinga do município de Serra Talhada é um exemplo de área que vêm sofrendo

processos de degradação. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) este sítio é apontado como um local de alta importância biológica, sendo prioridade para pesquisas científicas.

Figura 2. Mapa abrangendo as regiões da Caatinga.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2004).

As condições extremas de habitat existentes na Caatinga, como salinidade do solo, pouca quantidade de nutrientes e escassez de água são fatores que contribuem para as adaptações fisiológicas e reprodutivas das espécies deste ambiente (BEGON et al. 2009). Os variados metabolismos que estas espécies apresentam, mediante as condições de estresse, podem representar recursos biotecnológicos importantes nas pesquisas científicas (SANTOS et al. 2015). Neste sentido, a comunidade de fungos que habita a Caatinga pode representar uma fonte promissora. Há dados que mostram que os fungos colonizadores de solos com alta salinidade, déficit de água e altas temperaturas formam uma rede de interações complexas neste ambiente. Sua genética e metabolismo diferenciado lhes permite sobreviver nessas áreas, desencadeando também para as plantas que habitam o mesmo ambiente um fator de resistência em condições extremas. E isto pode representar a descoberta de proteínas, genes ou metabólitos essenciais em processos biotecnológicos (HAWKSWORTH, 1991; BEZERRA et al. 2012, 2015; SANTOS et al. 2015).

Os frutos da aroeira do sertão são do tipo drupa globosa, sendo um frutosemente (FIGUEIRÔA et al. 2004) e as folhas são compostas imparipinadas, de inserção alterna (Figura 4). A floração ocorre entre julho e setembro e a maturação dos frutos entre setembro a outubro.

Figura 4. Ilustração de *M. urundeuva* Allemão



Fonte: Martius, C., Eichler, A.G., Urban, I., Flora Brasiliensis, vol. 12(2): fascicle 71, t. 85 (1876). In: http://botanicalillustrations.org/illustration.php?id_illustration=12459&SID=0&mobile=0&code_category_taxon=9&size=1.

Myracrodruon urundeuva Classificação (Cronquist)

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Ordem: Sapindales

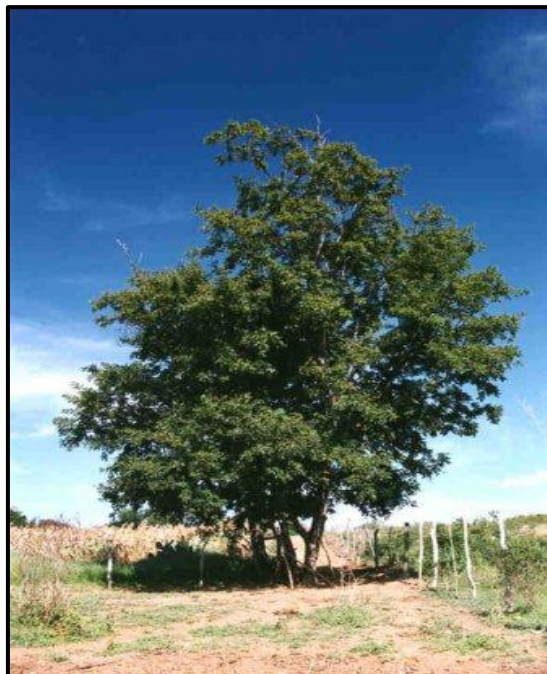
Família: Anacardiaceae

Espécie: *Myracrodruon urundeuva* Allemão

A Caatinga torna-se uma área bastante vulnerável diante do desmatamento de suas espécies vegetais, pois é um ambiente com a maioria dos trechos ocupados pela agricultura, o que pede uma ação imediata de medidas de restauração (CASTELLETI et al. 2004; LEAL et al. 2005). A aroeira do sertão saiu recentemente da lista das espécies ameaçadas de extinção, estando atualmente na escala de levemente preocupante, porém, por ser uma árvore muito versátil, sendo apreciada por madeireiros, deve ser conservada a fim de se garantir sua proteção (IUCN, 2017; MONTEIRO et al. 2012).

M. urundeuva (Figura 5) pode atingir de 5 a 20 m de altura e o DAP (diâmetro a altura do peito 1,30 m do solo) de 30 a 60 cm (CARVALHO, 2003). Sua preferência é pelos solos calcários e férteis e sua madeira constitui-se de alta resistência contra fungos xilófagos, não apodrecendo facilmente ao entrar em contato com a água (PAES et al., 2009). Segundo Lorenzi (2008) esta espécie é heliófita e também seletiva xerófila, perdendo suas folhas na estação seca. Sua madeira é bastante utilizada por ser muito pesada, sendo resistente e durável, apresentando um alto valor econômico (MEDINA, 1966) e sua casca contém grandes quantidades de tanino, fazendo com que seja útil para o processo do curtimento do couro (SOUZA et al. 2007).

Figura 5. Exemplar de *M. urundeuva* Allemão (aroeira do sertão).



Fonte: APNE/CNIP

O Brasil é o país que tem a maior diversidade genética de plantas no mundo, mas apenas 10% teve suas características biológicas analisadas. Ainda há poucas pesquisas em torno do substrato natural de alto valor dessas plantas (DO AMARANTE et al. 2011). A aroeira do sertão apresenta importantes propriedades químicas e medicinais (Tabela 3), tendo um amplo uso farmacológico, sendo frequentemente usada por pessoas, principalmente de zonas rurais do sertão do Nordeste do Brasil para diversas finalidades, como o óleo para limpeza de pele, infecções e para combater micoses (BALBACH, 1995; OLIVEIRA et al. 2010). Esta planta também é utilizada por populações de países da América do Sul, como a Bolívia na medicina popular (DEHARO et al. 2004). A casca de sua madeira possui substâncias fenólicas como flavonóides e chalconas diméricas, as urundeuvinas (VIANA et al. 1995; BERNARDES et al. 2011), sendo utilizada para fins anti-inflamatórios, anti-alérgicos, adstringentes e cicatrizantes, além disto, as folhas são usadas para o tratamento de úlceras, e já há pesquisas relacionadas ao tratamento do câncer (ALMEIDA et al. 1998; VIANA et al. 1995; MAHMOUD et al. 2011). Outros estudos relataram o potencial da enzima lectina isolada das folhas desta planta contra larvas do mosquito *Aedes aegypt* (SÁ et al. 2009).

Tabela 3. Substâncias químicas encontradas nas folhas e cascas da *M. urundeuva*.

Substâncias químicas das folhas de <i>M. urundeuva</i>	Substâncias químicas da casca da madeira de <i>M. urundeuva</i>
Galotaninos	Lectina
Ácido gálico	Chalconas diméricas (urundeuvinas)
Galato de metila	Tanino
Galato de etila	Ácido gálico
Ácido clorogênico	Galato de metila
Ácido protocatecuico	Galato de etila
	Ácido clorogênico
	Ácido protocatecuico

Fonte: Tabela adaptada de dados de Viana et al. (1995); Souza (2007); Sá (2009); Souza (2012).

2.6 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ANACARDEACEAE

Uma das principais características das espécies da família Anacardeaceae é a presença de resina em seus troncos lenhosos e um sabor característico de terebintina nas partes em desenvolvimento da planta que lembra o sabor do fruto verde da mangueira (*Mangifera indica*), uma das mais conhecidas espécies dentro da família. Outros exemplos são: *Anacardium occidentale*, (cajueiro), *Espondia tuberosa arruda* (umbuzeiro), *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia), e a *M. urundeuva* (aroeira do sertão) com um amplo uso na medicina popular (SOUZA & LORENZI, 2005).

De espécies vegetais medicinais da família Anacardeaceae já foram isolados fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius* (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Colletotrichum* e o actinomiceto *Streptomyces*) (GOMES, 2008; TONIAL, 2014) e de *Anacardium occidentale* isolou-se espécies do gênero *Fusarium*, assim como em *Mangifera indica* (FREIRE & BEZERRA, 2001). Existem poucos estudos da comunidade endofítica da espécie *M. urundeuva*, já tendo sido registrados fungos no Brasil, isolados do caule, como *Aspergillus niger*, das folhas e cascas *Pestalotiopsis guepinii*, *Guignardia mangiferae*, *Phomopsis* sp. e *Pseudofusicocum stromaticum* (SOUSA et al. 2013; RODRIGUES et al., 2004; RODRIGUES et al. 2005; GONÇALVES, 2014).

2.7 RELAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS COM ENZIMAS ANTICANCERÍGENAS

Os fungos endofíticos formam um grupo seletivo, apresentando características peculiares e habitando uma diversidade de nichos ecológicos, sendo, portanto excelentes para os processos biotecnológicos. Muitas espécies são capazes de produzir enzimas (amilase, lipase, pectinase, renina e protease) (ALVES et al. 2002; BEZERRA et al., 2012) e outras são fontes de aplicação de compostos anticancerígenos (STROBEL & DAISY 2003; KHARWAR et al. 2008).

A maioria dos fungos endofíticos que habitam o interior das plantas medicinais mantêm uma relação ainda desconhecida com estes vegetais, podendo beneficiar seus hospedeiros, como mostram estudos de Yang et al. (1994) ao relatar *Phoma* sp. como um endófito mutualista, obtendo nutrientes e proteção da planta e sendo capaz de produzir o altersolanol, um antibiótico que confere ao seu hospedeiro proteção contra doenças bacterianas.

Já se sabe que alguns compostos isolados de plantas medicinais foram posteriormente isolados de fungos endofíticos que as habitavam (VENIERAKI et al. 2017), o que indica uma possível relação ecológica entre ambos. Este fator pode representar um benefício, pois reisolamento de compostos de vegetais são processos limitados e dependentes de fatores geográficos, climáticos e da preservação de habitats (KHARWAR et al. 2011). Dessa forma, o uso dos compostos advindos de fungos endofíticos pode vir a suprir a demanda de extração de produtos naturais a partir de

vegetais, minimizando a ameaça que algumas espécies enfrentam de se extinguir (PEIXOTO NETO et al. 2002).

O progresso das pesquisas de produtos naturais isolados a partir de microrganismos teve muitos avanços para os estudos oncológicos (COSTA-LOTUFO et al. 2010). Estudos de Wiyakrutta et al. (2004) constataram que fungos endofíticos isolados de plantas medicinais de florestas da Tailândia apresentaram atividade contra células de carcinoma epidermóide oral humano e também contra células de câncer de mama. O fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado a partir da planta medicinal *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) foi um dos fungos pioneiros nos estudos para o tratamento do câncer por sua capacidade de produzir o taxol. Este composto diterpenóide terapêutico (STIERLE et al. 1993) também já foi isolado de outras plantas do gênero *Taxus* (PEIXOTO NETO et al. 2002). Outro exemplo de fungo produtor do taxol é o *Stegolerium kukenani*, isolado a partir da espécie tropical *Stegolepis guianensis* (Rapateaceae), uma planta nativa de Roraima (Brasil) e da Venezuela (STROBEL et al. 2001). Relatos também mostram a atividade anticancerígena do fungo *Tubercularia* sp, isolado da planta medicinal *T. marei* (Taxaceae) (WANG et al. 2000). Outras substâncias também já foram encontradas em fungos endofíticos, como a vickicristina ou leurocristina, importante alcalóide no tratamento da leucemia, isolada do fungo *Fusarium oxysporum*, endófito da planta medicinal *Catharanthus roseus* (Apocinaceae) (KUMAR et al. 2013).

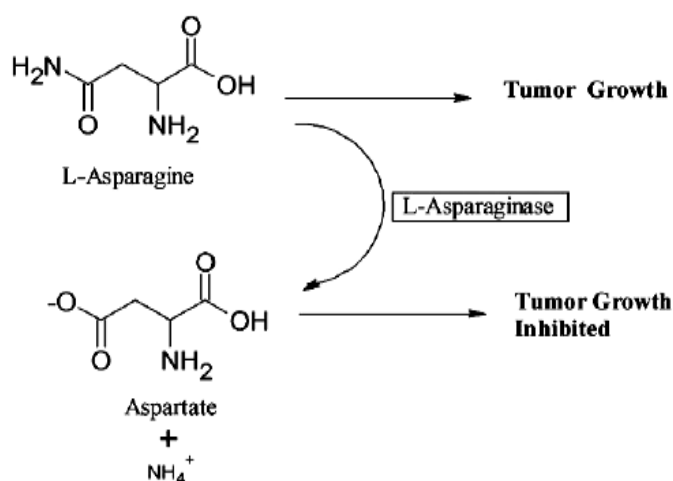
Desde a década de 60, os estudos da atividade antitumoral da enzima L-asparaginase produzida por microrganismos vem sendo divulgados (MASHBURN & WRISTON 1964; VERMA et al. 2007; WINK et al. 2010; LOPES et al. 2015). As bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são os micro-organismos modelos de produção da L-asparaginase terapêutica. Entretanto, a enzima isolada de bactérias pode apresentar efeitos colaterais nos pacientes (KUMAR et al, 2013). Por outro lado, pesquisas apontam os fungos como alternativas na produção da enzima, pois, há menor efeito colateral e menor imunogenicidade, sendo mais viáveis para o uso terapêutico (SARQUIS et al. 2004; SANTOS et al. 2015).

2.8 CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA L-ASPARAGINASE

A partir de estudos de Broome (1965), mediante experimentos envolvendo cobaias de ratos, houve um grande progresso nas pesquisas com a enzima L-

asparaginase (SARQUIS et al. 2004; LOPES et al. 2015; SANTOS et al. 2015; KRISHNAPURA & BELUR 2016; DORIYA & KUMAR, 2016). A L-asparaginase amino-hidrolase (EC 3.5.1.1), abreviada por L-ASNase é a enzima capaz de converter o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia durante o tratamento de diversos tipos de câncer (Figura 6), como a leucemia linfoblástica aguda (LLA), doenças malignas do sistema linfoide e linfomas de Hodgkin, sendo alvo de inúmeras pesquisas nos últimos anos (BROOME, 1965; APPEL et al. 2007; DUVAL, 2002). Além disto, ela é utilizada na indústria de alimentos para prevenção da formação de acrilamida nos alimentos processados a altas temperaturas. A acrilamida possui efeito neurotóxico, apresentando-se como carcinogênica para humanos (MOHAN KUMAR et al. 2013). A L-asparaginase pode ser encontrada em vários organismos como animais, inclusive no soro de alguns roedores, também em plantas e microrganismos, porém ela é ausente em seres humanos (EL-BESSOUMY et al. 2004).

Figura 6. Esquema ilustrando o processo de reação da enzima L-asparaginase



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/271316401_fig1_Fig-1-Schematic-illustration-of-the-reaction-mechanism-of-L-asparaginase.

2.9 PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Nos últimos anos, os estudos avançaram no desenvolvimento de medicamentos obtidos a partir de fontes naturais. Em 2003, aproximadamente 40% dos medicamentos terapêuticos eram de fontes naturais (25% obtidos de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais) (CALIXTO, 2008). Esse valor aumentou e em 2011 o valor de 40% passou para 50% (SACCARO JÚNIOR, 2011).

No Brasil, a primeira causa de morte por doença entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos continua sendo o câncer. O Brasil importa o fármaco L-asparaginase de uma empresa chinesa, porém, o país já esteve desabastecido do medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; INCA, 2017). Atualmente, a produção de L-asparaginase terapêutica é realizada por dois micro-organismos modelos: a *Escherichia coli* e a *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, a produção da enzima através destas bactérias pode desencadear efeitos colaterais nos pacientes por sua origem procariótica. Uma alternativa seria a utilização dos fungos para produção da L-asparaginase, como mostra estudos de Sarquis et al. (2004) com esta enzima. A literatura mostra que vários estudos já foram realizados com fungos para a produção da enzima L-asparaginase. As espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são reconhecidas como as principais produtoras. Exemplos: *Aspergillus acolumnaris*, *A. alliaceus*, *A. amstelodami*, *A. awamori*, *A. flavus*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. oryzae*, *A. penicilliformis*, *A. puniceus*, *A. striatus*, *A. sunderbani*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. wentii*, de *Fusarium anguioides*, *F. caucasicum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. roseum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. tricinctum*, *Penicillium aculeatum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. claviforme*, *P. crustosum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. granulatum*, *P. nelicum*, *P. nigricans*. Também já foram relatados *Cladosporium* sp., *Tilachlidium humicola* e *Verticillium malthoasei* produzindo L-asparaginase (SCHEETZ et al. 1971; NAKAHAMA et al. 1973; GULATI; et al. 1997; SARQUIS et al. 2004; RANI et al. 2012; TIPPANI & SIVADEVUNI, 2012; MOHAN KUMAR & MANONMANI, 2013; IMADA et al. 1973; NIHARIKA et al. 2014).

O estudo da produção da enzima vem focando cada vez mais na produção a partir de fungos endofíticos, como fungos isolados de cactos da Caatinga (SANTOS et al. 2015). Os fungos endofíticos isolados de tecidos internos de plantas medicinais pode representar um benefício, já que essas plantas possuem substâncias específicas terapêuticas e compostos bioativos que podem estar presentes na sua comunidade de fungos (STROBEL et al. 2001). De plantas medicinais já foram isolados os seguintes gêneros de fungos endofíticos produtores de L-asparaginase: da *Withania somnifera*: *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Petromyces* e *Pleospora* (MOHARRAM et al., 2016), fungos do gênero *Colletrothichum* da planta medicinal *Pereskia bleo* (CHOW & TING, 2014). De *Tabernaemontana heyneana* foram isoladas espécies de *Fusarium* spp. que apresentaram uma alta atividade da enzima (MANASA & NALINI, 2014) e

Theantana et al. (2009) relataram *Fusarium*, *Penicillium* e *Collethotrichum* de plantas medicinais da Tailândia como produtoras de L- asparaginase.

Diante da abordagem literária, o presente trabalho contribuirá para fornecer dados importantes para o conhecimento da diversidade de fungos endofíticos da planta medicinal *M. urundeuva* em áreas de brejo de altitude e de Caatinga. Além disto, devido a crescente busca por microrganismos que produzam a enzima L-asparaginase, torna-se importante o conhecimento sobre o potencial de fungos de plantas de ambientes ainda não explorados, visando colaborar nos estudos desta enzima tão solicitada atualmente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

As amostras foram coletadas em áreas de brejo de altitude, no município de Triunfo- PE e de Caatinga no município de Serra Talhada-PE. O município de Triunfo-PE está inserido geologicamente na província da Borborema. Segundo classificação de Köppen (1948), o clima nessa região de maciço montanhoso é do tipo CW, mesotérmico, apresentando inverno seco e verão chuvoso e temperatura média anual de 25° C, podendo ter mínima de 12° C e máxima de 30° C. No estado de Pernambuco, Triunfo (Figura 7) é a mais elevada cidade do estado (altitude na área urbana varia entre 950 a 1095 m). Neste município está situado o segundo pico mais elevado do estado, o Pico do Papagaio, com 1165m (IBGE, 2014). A vegetação deste setor apresenta composição arbórea, com floresta estacional subcaducifólia tropical plúvio-nebular - brejo de altitude (ANDRADE-LIMA, 1966; PORTO et al. 2004).

O município de Serra Talhada- PE, (altitude: 429m) está localizado no Vale do Pajeú. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima é do tipo BSwH, ou seja, clima semiárido, com precipitações escassas e mal distribuídas durante o ano, com temperatura média anual de aproximadamente 25° C, podendo ultrapassar os 30° C em períodos quentes. A vegetação deste setor apresenta-se de arbórea a arbustiva-arbórea, com característica de floresta estacional caducifólia espinhosa - caatinga arbórea (ANDRADE-LIMA, 1966; LEAL et al. 2005).

Em áreas de brejo de altitude, assim como em áreas de caatinga há inúmeros locais onde a espécie vegetal *M. urundeuva* pode ser encontrada, já tendo sido relatada por Ferraz et al. (1998), tanto em trechos de Triunfo como em Serra Talhada, sendo comum nos dois ambientes, possuindo distribuição na grande floresta atlântica (RIZZINI, 1963). As amostras de áreas de brejo de altitude foram coletadas em uma propriedade rural, no sítio Mata redonda, situado no município de Triunfo-PE, aproximadamente quatro quilômetros, afastando-se do centro da cidade, coordenadas 7°49'32.99"S. 38°6'54. 21" O (Figuras 8 e 9). E as amostras de áreas de Caatinga foram coletadas na Fazenda Saco, pertencente a uma propriedade do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), município de Serra Talhada-PE, coordenadas 7°57'21.38"S 38°17'43.92" O (Figuras 10; 11 e 12). A Fazenda Saco possui 3.200 hectares dos quais 887,24 fazem parte o Parque Estadual Mata da Pimenteira, uma unidade de

Conservação Estadual. As coletas do material vegetal das duas áreas ocorreram na estação seca, no mês de julho de 2016.

Figura 7. Brejo de altitude no município de Triunfo-PE.



Fonte: <https://www.bloggertriunfope.blogspot.com.br>

Figuras 8 e 9. Vista de duas áreas de coletas em áreas de brejo de altitude no município de Triunfo-PE. A: área 1 e B: área 2.



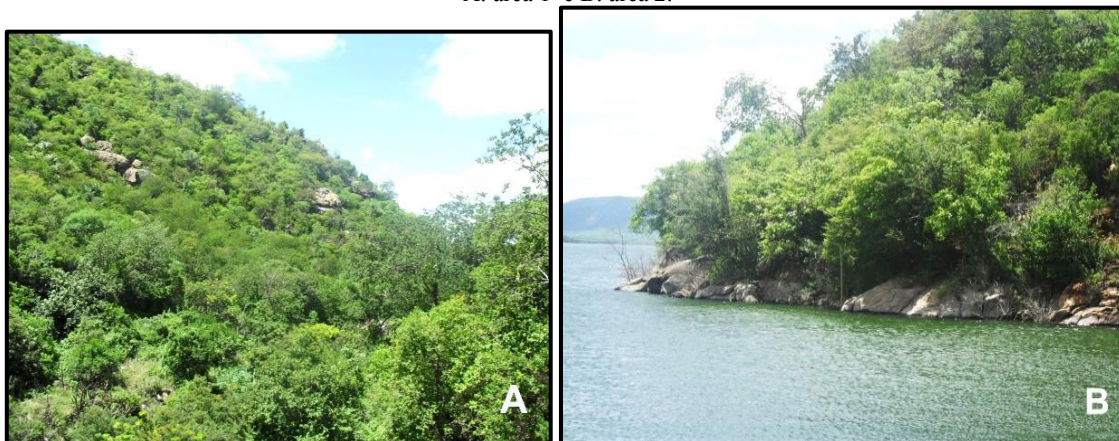
Fonte: Pádua, A. P. S. L.

Figura 10. Vista do açude Saco, localizado na fazenda Saco, no município de Serra Talhada-PE



Fonte: Edinilza Maranhão

Figuras 11 e 12. Vista de duas áreas de coletas nas proximidades do açude Saco no município de Serra Talhada-PE. A: área 1 e B: área 2.



Fonte: Pádua, A. P. S. L.

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Foram coletados folíolos (Figura 13) sadios de oito exemplares diferentes de *M. urundeuva* em brejo de altitude e oito em Caatinga, sendo obtidas 48 amostras em cada área, totalizando 96 amostras. É importante destacar que os folíolos de brejo de altitude encontrados foram de plantas mais velhas e os de Caatinga de plantas mais jovens, não sendo este um critério determinante no estudo. O material vegetal foi acondicionado individualmente (seis folíolos por exemplar) em sacos plásticos, transportado para o laboratório, e processado dentro de 48 h. O processamento dos folíolos para o isolamento de fungos endofíticos seguiu procedimentos de Bezerra et al. (2013; 2015), que envolve assepsia e fragmentação do tecido vegetal. Os folíolos foram lavados superficialmente com água e detergente para remoção de impurezas e logo em seguida

enxaguados com água destilada. Na sequência, foram mergulhados em álcool 70% por um minuto, retirados e mergulhados em hipoclorito de sódio (2 – 2,5%) por três minutos. Em seguida foram mergulhados novamente no álcool 70% por um minuto, e por fim passaram por três lavagens seguidas de água destilada em recipientes diferentes. A fragmentação do tecido vegetal ocorreu com auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada. Foram trinta fragmentos por planta, totalizando 672 fragmentos vegetais distribuídos em sete fragmentos por placa, totalizando 104 placas. Destas, 48 placas da área brejo de altitude e 48 placas da área Caatinga com meio BDA com clorafenicol (100mgL⁻¹) e das oito placas restantes, quatro da área brejo de altitude e quatro da área Caatinga com meio CDM (Czapeck- Dox modificado) com o aminoácido L-asparagina para um teste inicial de seleção de fungos com potencial para produzir a enzima L-asparaginase.

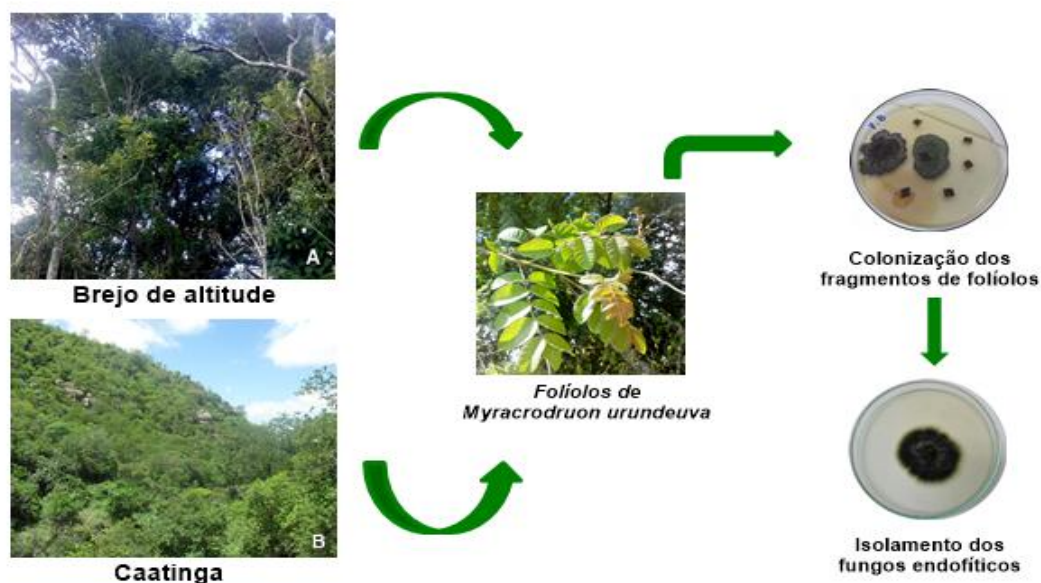
Figura 13. Exemplar de galho de *M. urundeuva* coletado em brejo de altitude



Fonte: Pádua, A. P. S. L.

Na sequência, todas as placas de Petri foram incubadas em uma BOD na temperatura de 25°C e o crescimento dos fungos acompanhado por até 30 dias (Figura 14). Os fungos isolados foram purificados e mantidos nos meios de cultura adequados para identificação morfológica e/ou molecular (para aqueles que não foi possível a identificação por análises morfológicas). Para o controle de desinfestação superficial dos folíolos, foi retirado 0,1ml da última água da lavagem da desinfestação e semeado em placas com meio BDA com clorafenicol (100mgL⁻¹).

Figura 14. Esquema representando o isolamento dos fungos endofíticos dos folíolos de *M. urundeuva*.



Fonte: Pádua, A. P. S. L.

Foi obtido um comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico expedido pelo (ICMBio) Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. As coleções de plantas foram registradas sob o número 61879-1 e pelo código de autenticação 89369941 (Anexo A). As culturas representativas dos fungos endofíticos isolados foram depositadas na coleção de cultura URM (Micoteca URM Profa. Maria Auxiliadora Cavalcanti ISO 9001: 2015) na Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Para a identificação dos fungos, primeiramente todas as culturas foram inoculadas em placas com meio BDA e transferidas para BOD com temperatura de 25°C, onde o crescimento foi acompanhado por até sete dias. A partir daí foram observadas as características macromorfológicas das culturas e os fungos foram agrupados em possíveis gêneros diferentes. Para uma análise mais precisa todas as culturas foram identificadas por meio do sequenciamento da região ITS e do domínio D1/D2 do LSU. A extração do DNA genômico foi realizada conforme instruções do fabricante do kit de extração de DNA "Wizard Genomic DNA Purification Kit" com

algumas modificações de Bezerra et al. (2017). Todo o procedimento foi realizado utilizando luvas apropriadas. Para amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al. 1990; O'DONNELL,1993). As análises de PCR foram realizadas conforme descrito por Bezerra et al. (2017). Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados na Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Centro de Biociências (CB) da UFPE.

3.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Pesquisas usando a ferramenta BLASTn no banco de dados GenBank no NCBI foram usadas para verificar a relação de todas as sequências de rDNA de ITS. Após este primeiro resultado, as sequências selecionadas foram depositadas no GenBank e alinhadas com as sequências obtidas neste estudo para verificar sua relação com base nas análises de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI). A interface MAFFT on-line (KATO & STANDLEY 2013) foi usada para realizar o alinhamento e o programa MEGA v. 7.0 (KUMAR et al. 2016) foi usado para ajustes de sequências. A análise ML foi realizada usando o MEGA v. 7.0 com 1000 reamostragens de bootstraps. O BI foi conduzido por MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) lançado a partir de Topali 2.5 (MILNE et al., 2004), utilizando duas corridas ao longo de 1×10^6 gerações com um valor de 25%. O modelo de substituição de nucleotídeos foi estimado pela ferramenta on-line Findmodel (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>), que sugeriu o modelo Jukes-Cantor (JC). A árvore obtida foi impressa com TreeView v. 1.6.6 (PAGE, 1996). As sequências ITS geradas foram depositadas no GenBank (XX9999-YY9999).

3.5 ANÁLISES ECOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS

A taxa de colonização (TC) foi obtida através da razão entre o número de fragmentos colonizados (Nf) e o número total de fragmentos (Nt) isolados do tecido vegetal, multiplicado por 100 ($TC = Nf/Nt \times 100$) (ARAÚJO et al. 2002).

Foi calculado o índice de diversidade de riqueza (S) e Shannon-Wiener (H') de endófitos fúngicos para todas as amostras. A riqueza foi definida como o número de espécies em cada amostra e o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') calculado com base na equação $H' = -\sum (P_i \ln (P_i))$, onde $P_i = n_i / N$, n_i = número de isolados

endofíticos da espécie i , N = número total de isolados endofíticos de todas as espécies (SHANNON-WEAVER, 1949) e para fins estatísticos, os valores de H' foram convertidos em $\text{Exp}(H')$. O valor alfa de Fisher foi calculado com base na equação $S = \alpha * \ln(1 + n / \alpha)$, onde S é o número de taxa, n é o número de isolados e α é o alfa de Fisher (FISHER et al. 1943). As curvas de acumulação de espécies foram determinadas e a riqueza total (observada) foi comparada com a estimativa usando o índice Chao de primeira ordem (Chao 1) para avaliar a suficiência do esforço de amostragem.

A permutação de análise de variância multivariada (PerMANOVA), com base na distância de Bray-Curtis, foi aplicada para testar se os conjuntos de fungos endofíticos diferiram entre os ecossistemas e a escala multidimensional não-métrica (NMDS) aplicada para visualizar graficamente a organização de amostras em espaços bidimensionais empregando o Funciona metaMDS e ordiplot. Essas análises foram realizadas utilizando dados de abundância relativa.

Os diagramas de Venn foram construídos usando a ferramenta DrawVenn disponível on-line (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). A análise de indicadores de espécies (ISA) foi realizada para detectar possíveis associações entre espécies de fungos e ambientes AM. Os valores de indicação (IndVal) foram calculados para cada espécie e o significado determinado pelo teste de Monte Carlo usando 9999 permutações (DUFRENE & LEGENDRE, 1997). Uma espécie foi considerada um indicador para cada área quando apresentou $p < 0,05$ e $\text{IndVal} \geq 25\%$.

Todas as análises foram realizadas com o software R v.3.4.3 (R Development Core Team, 2017). O PerMANOVA foi conduzido usando a função `adonis`, NMDS, riqueza (observada e estimada) e a diversidade de fungos endofíticos em cada amostra foi calculada usando o pacote "vegan" (OKSANEN et al. 2017). A ISA foi realizada utilizando "indícios de índices" com 9999 permutações (DE CACERES E LEGENDRE 2009). As diferenças de riqueza e diversidade de fungos endofíticos entre as áreas foram avaliadas utilizando uma análise de variância unidirecional (ANOVA) implementada no pacote `agricolae` (DE MENDIBURU, 2017).

3.6 SELEÇÃO DE FUNGOS QUANTO À PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE (ASNASE)

Foram selecionados 20 fungos para a etapa da produção da enzima L-asparaginase, onde utilizou-se dez isolados correspondentes a nove gêneros de fungos

identificados previamente no primeiro teste de produção da enzima (primeiro *screening*) e outros dez fungos isolados do meio CDM modificado no teste inicial de fungos com potencial para produzir L-asparaginase para o segundo *screening*. Os dois ensaios tiveram a metodologia padronizada. Segue a lista dos códigos dos fungos selecionados:

Primeiro *screening*:

- C1 (URM 7780); C9 (URM 7786); C18 (URM 7779); C22 (URM 7785); C20 (URM 7778); (Isolados de Caatinga)
- B7 (URM 7787); B18 (URM 7797); B61(URM 7788); B104 (URM 7796); B109 (URM 7789); (Isolados de brejo de altitude)

Segundo *screening*:

- CDM 1B (URM 7781); CDM 2B (URM 7790); CDM 3B (URM 7782); CDM 5B (URM 7783); CDM 6B (URM 7792); CDM 8B(URM 7784); CDM 9B (URM 7794); CDM 10B (URM 7795); (Isolados de meio CDM de brejo de altitude)
- CDM 4C (URM 7791); CDM 7C (URM 7793); (Isolados de meio CDM de Caatinga)

Para a preparação do inóculo, os isolados de fungos selecionados, previamente armazenados em água e glicerol em freezer foram reativados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), em placas, durante sete dias ou até seu completo desenvolvimento. Duas etapas foram realizadas para o primeiro passo da produção da enzima, utilizando procedimentos de Loureiro et al. (2012) com adaptações.

A) Etapa pré-fermentativa: primeiramente foi preparado o meio Czapek Dox's modificado (CDM) (SAXENA & SINHA, 1981), 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. Na etapa de pré-fermentação foram utilizados 50 mL do meio CDM contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), onde cinco discos de 5 mm de micélio das culturas foram inoculados e incubados a 37°C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período, as culturas foram filtradas com auxílio de bomba de vácuo, Kitassato e funil de Büchner, utilizando papel de filtro Whatman nº 1.

B) Etapa fermentativa: na etapa da fermentação, todo o micélio coletado na pré-fermentação foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio CDM (sem glicose) e incubados a 37°C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse

período, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e a biomassa obtida foi utilizada para determinar a atividade enzimática.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA L-ASPARAGINASE

A determinação da atividade da enzima foi feita de acordo com Loureiro et al. (2012) em que 0,6 mL Tris-HCl (20 mM, pH 8,6), 0,2 mL L-asparagina (100 mM), 0,2 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M) e 1g do micélio de cada cultura obtido da etapa da fermentação foram incubados a 37°C por 30 minutos, sendo adicionado na sequência a essa mistura 0,5 ml de solução de cloreto férrico/TCA/HCl para interromper a reação. Para o preparo do branco foi adicionado 0,5ml de cloreto férrico e, posteriormente, 1g de micélio. Em seguida a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos, 2ml de sobrenadante foi retirado com o auxílio do pipetador e transferido para as cubetas de vidro, onde as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm. A partir daí, para a leitura, uma unidade de L-asparaginase valerá como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de β -hidroxâmico aspártico por minuto por mililitro (U/mL). As análises foram realizadas em triplicata e comparadas ao branco da amostra. O melhor produtor foi definido como o fungo capaz de produzir a maior quantidade de U/g^{-1} para a atividade intracelular dentre as cepas testadas neste estudo.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar se houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os resultados da produção de L-asparaginase pelos fungos endofíticos testados. Este teste permite comparar duas ou mais amostras independentes de tamanhos iguais ou diferentes e não assume normalidade para os resíduos correspondentes. Todos os cálculos foram feitos usando o software R development Core Team (2015).

3.9 LISTA DOS MEIOS DE CULTURA E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO

No apêndice A (Apêndice) e no apêndice B (Apêndice) são apresentados em duas listas os meios de cultura e os equipamentos, respectivamente que foram utilizados no

presente estudo.

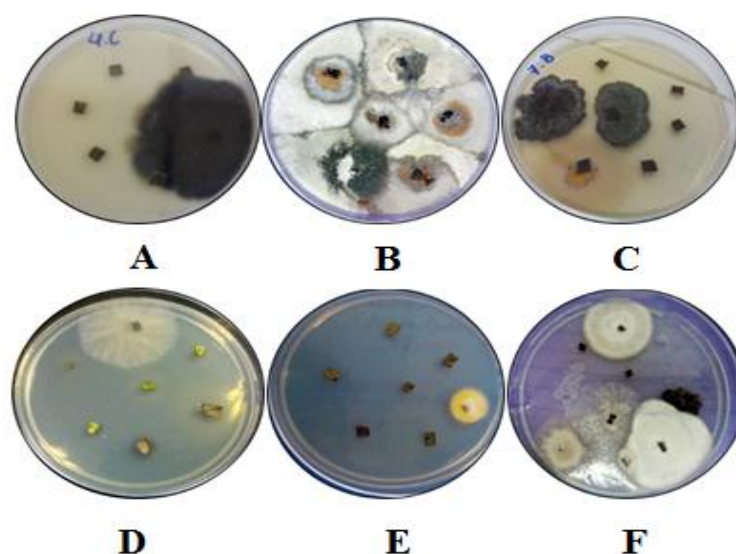
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO A PARTIR DOS FOLÍOLOS DE *M. URUNDEUVA*

Dos 672 fragmentos vegetais utilizados dos folíolos das duas áreas foram obtidos 187 fungos endofíticos da planta *M. urundeuva*, sendo 152 de brejo de altitude e 35 de Caatinga (Figura 15). Foram isolados apenas fungos filamentosos, onde uma vez purificados, os isolados foram designados, adotando-se as iniciais do nome das áreas de coleta (B- brejo de altitude e C- Caatinga) seguido de um número que designa o isolado (B1, B2... B141/ C1, C2... C30) e para os isolados do meio CDM, usou-se a sigla do meio, o número que designa o isolado e as iniciais do nome das áreas de coleta: C- Caatinga e B-brejo de altitude (CDM 1B... CDM 10B; CDM 1C... CDM 7C).

A riqueza dos fungos endofíticos observados neste estudo foi semelhante a outras pesquisas realizadas em ambientes secos (FISHER et al. 1994; KHIDIR et al. 2010; LORO et al. 2012; BEZERRA et al. 2012, 2013; SILVA-HUGHES et al. 2015), exceto o registrado para o brejo de altitude, que tem maior semelhança com a riqueza registrada em florestas úmidas.

Figura 15. Fragmentos colonizados por fungos em meio BDA de brejo de altitude (B, C), em meio BDA de Caatinga (A, D, E) e de meio CDM - brejo de altitude (F) após 15 dias de encubamento das placas.



Fonte: Pádua, A. P S. L.

A diferença na riqueza de fungos de ambientes diferentes pode estar relacionada a diversos fatores ambientais, como o perfil heterogêneo dos micro-habitats, relações ecológicas entre fungos e substratos, mudanças climáticas e vegetacionais e tipo de tecido da planta hospedeira, como tem demonstrado vários relatos na literatura (ARNOLD & LUTZONI 2007; NASCIMENTO et al. 2015; KOIDE et al. 2017). Um fator importante é a radiação solar mais intensa na área de Caatinga o que pode ter interferido no número de fungos. Segundo Petrini (1986) a diferença de intensidade e exposição solar é um fator determinante para a população de fungos endofíticos, pois estes microorganismos são sensíveis à intensa radiação solar. Outro fator, segundo Pimentel et al. (2006) é a presença de maior umidade nas matas, o que desencadeia maior sobrevivência dos fungos endofíticos, e em ambientes de maior incidência de radiação solar as folhas tendem a ressecar com mais facilidade.

É importante ressaltar que comparar dados de estudos de fungos endofíticos é complexo devido às diferenças encontradas nas metodologias utilizadas, como o tratamento das amostras de tecidos da planta e o esforço amostral (CANNON & SIMMONS, 2002; ARNOLD et al. 2001). Dadas às informações, este é o primeiro estudo que relata uma grande amostragem de fragmentos analisados da planta *M. urundeuva*.

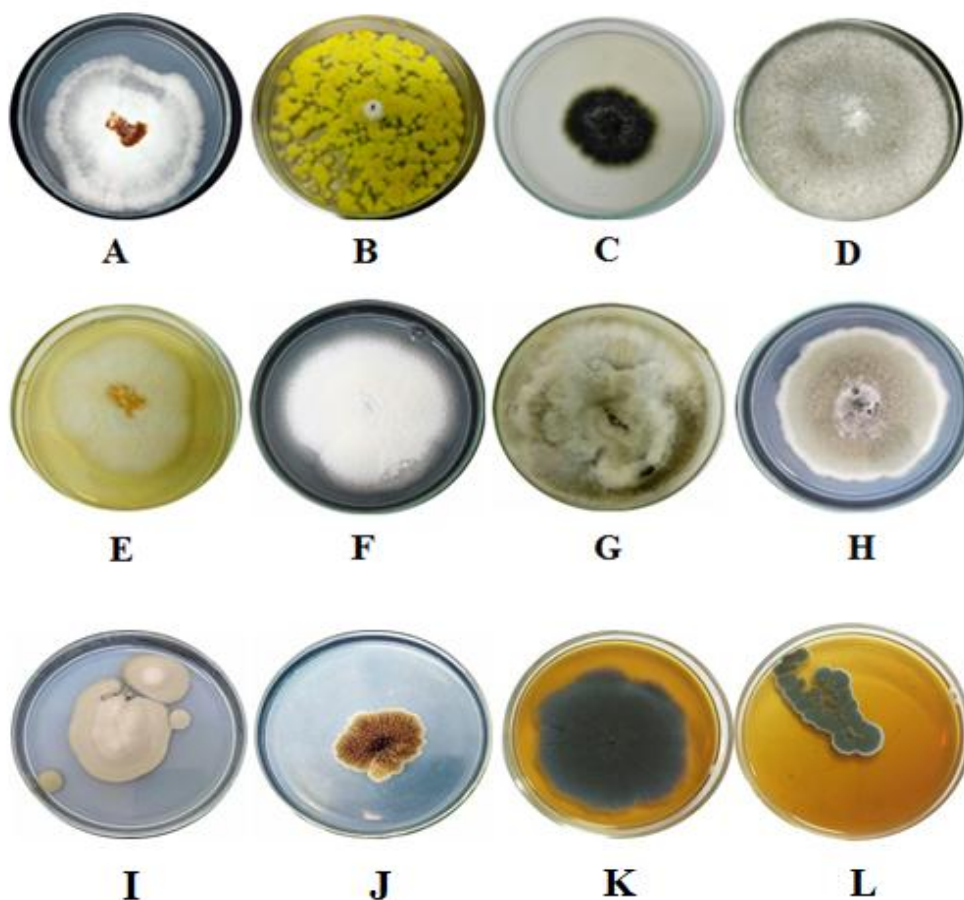
O maior número de isolados encontrados foi nas folhas mais velhas de ambiente de brejo de altitude. Este fato pode estar relacionado à maturação das folhas, que proporciona uma condição favorável à colonização dos fungos endofíticos. Neste caso, o tempo maior de exposição do tecido analisado às condições ambientais foi um dos fatores determinantes no desenvolvimento dos fungos, como já foi observado em estudos de Arnold & Herre (2003) com folhas de *Theobroma cacao*, de *Plumeria rubra* (SURYANARAYANAN & THENNARASAN, 2004) e de folhas de *Baccharis dracunculifolia* (OKI et al. 2009).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *M. URUNDEUVA*

Dos 187 fungos endofíticos isolados dos folíolos de *M. urundeuva*, todos foram agrupados de acordo com a morfologia, e destes, 30 fungos não foram mais capazes de

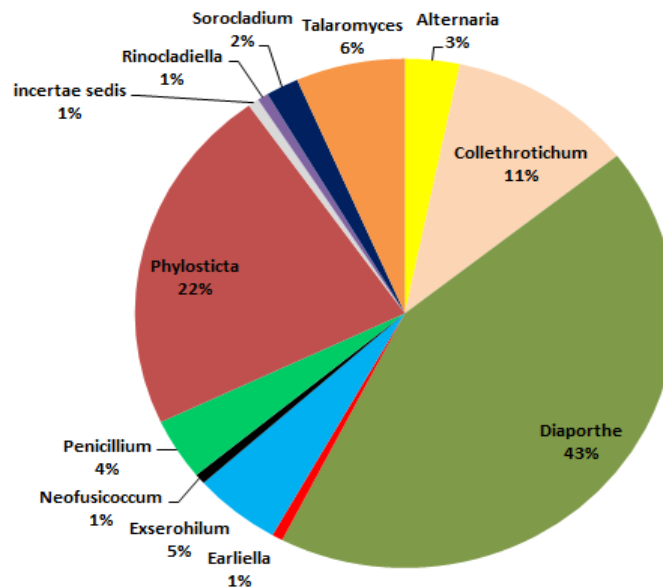
crescer no meio de cultura BDA, 153 tiveram o DNA extraído, que foi amplificado. As sequências obtidas foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Foram totalizados 12 gêneros diferentes (Figura 16).

Figura 16. Morfologia de representantes dos gêneros identificados no presente estudo, em meio BDA após 10 dias de desenvolvimento. A: *Earliella* sp., B: *Talaromyces* sp., C: *Phyllosticta* sp., D: *Diaporthe* sp. E: *Colletotrichum* sp. F: *Sarocladium* sp., G: *Neofusicoccum* sp., H: *Alternaria* sp. I: *Rinocladiella* J: *Incertai sedis* (Diaporthale), K: *Exserohilum*, L: *Penicillium*.



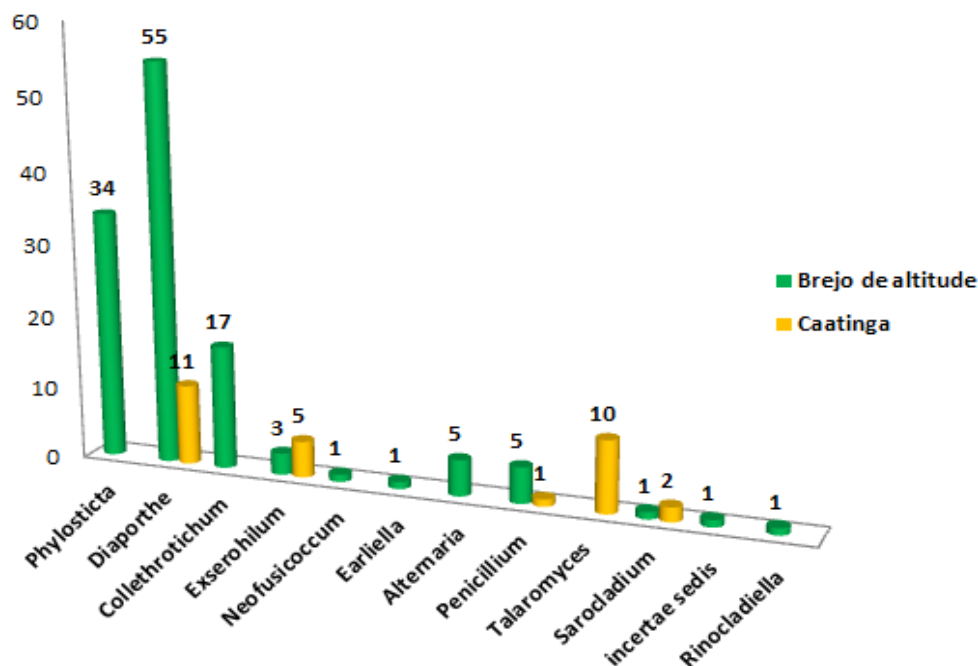
Fonte: Pádua, A. P. S. L.

Dos 12 gêneros obtidos, *Diaporthe* sp. foi o mais prevalente (43%), em seguida *Phyllosticta* sp. (22%); *Colletotrichum* sp. (11%); *Talaromyces* sp. (6%); *Penicillium* sp. (4%); *Exserohilum* sp. (5%); *Alternaria* sp. (3%); *Sarocladium* sp. (2%); (1%); *Neofusicoccum* sp. (1%); *Rinocladiella* sp. (1%); *Earliella* sp. (1%) e *incertae sedis* (1%) (Figura 17).

Figura 17. Percentual dos gêneros de fungos de brejo de altitude e Caatinga

Os isolados identificados como *Diaporthe* foram os mais frequentes em *M. urundeuva* (66 isolados pertencentes a 15 possíveis morfo espécies), seguidos por *Phyllosticta* (34 isolados pertencentes a uma morfo-espécie), *Collethotrichum* (17 isolados pertencentes a uma morfo-espécie), *Talaromyces* (10 isolados pertencentes a uma morfo-espécie), *Penicillium* (sete isolados pertencentes a três morfo-espécies), *Exserohilum* (oito isolados pertencentes a uma morfo-espécie), *Sarocladium Terricola* (três isolados pertencentes a uma morfo-espécie), *Alternaria* (três isolados pertencentes a duas morfo-espécies), e os seguintes taxa foram isolados apenas uma vez: *Earliella scabrosa*, *Neofusicoccum* sp., *Rhinochadiella* sp. e *incertae sedis* em Diaporthales (um isolado) (Figura 18).

Figura 18. Gráfico apresentando a frequência absoluta de fungos em brejo de altitude e Caatinga.



Estudos relacionados à quantidade de fungos endofíticos em *M. urundeuva* ainda são escassos, entretanto, Sousa et al. (2013) relataram apenas uma espécie de *Aspergillus niger* no seu caule. Das folhas e cascas já foram isoladas espécies de *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Phomopsis* sp. e *Sterile mycelium* (RODRIGUES et al. 2004; RODRIGUES et al. 2005). Gonçalves (2014) mostrou a presença de *Pseudofusicoccum stromaticum* habitando esta planta. Segundo dados de Gonçalves et al. (2013) já foram encontrados ainda *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Fusicoccum* spp., *Lasiodiplodia* sp., *Nodulisporium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., e *Sordaria* sp. e fungos pertencentes a Botryosphaeriaceae. E mais recentemente, Cavalcanti et al. (2017) isolaram quatro fungos endofíticos com potencial para produção da enzima tanase.

Frequentemente o gênero *Diaporthe* é registrado habitando os tecidos internos de plantas hospedeiras (BOTELLA & DIEZ, 2011; MURALI et al. 2006), já tendo sido isolado da planta medicinal *Chrysanthemoides monilifera* na Austrália (THOMPSON et al. 2015). *Diaporthe* parece ter importância ecológica para *M. urundeuva*, tendo apresentado a maior frequência nos dois ambientes estudados. Este gênero permanece como um dos mais complexos na identificação à nível de espécie, sendo fundamental o uso de dados moleculares para uma identificação mais precisa (CROUS & GROENEWALD, 2005; UDAYANGA et al. 2012). Os fungos pertencentes a este

gênero têm sido comumente isolados como fitopatogênicos, sapróbios, e atualmente estudos relataram a espécie como causadora de enfermidades em humanos e outros mamíferos (ROSSMAN, 2007; CROUS & GROENEWALD, 2005; BODDY & GRIFFITH, 1989; CARROLL, 1986; GARCIA-REYNE et al. 2011). Por outro lado, algumas espécies podem apresentar inúmeros benefícios, como *Phomopsis* sp. (forma assexuada de *Diaporthe*) isolado da espécie medicinal *Taxus cuspidata*, produtor de taxol, composto que possui atividade anticancerígena (KUMARAN, 2009).

O segundo gênero mais isolado foi *Phyllosticta*, encontrado exclusivamente em plantas de brejo de altitude. As espécies do gênero *Phyllosticta* são sobretudo patógenos de plantas de diversos hospedeiros, sendo causadoras de doenças como manchas foliares e manchas pretas em frutas (WULANDARI et al. 2009; GLIENKE et al. 2011; WONG et al. 2012). Espécies de *Phyllosticta* geralmente são associadas à *Guignardia* (estado sexual do gênero) (WIKKEE et al. 2011). A espécie *Phyllosticta capitalensis* foi descrita por Hennings (1908) associando-a a folhas necróticas de *Stanhopea* sp. (Orchidaceae) coletadas no Brasil. E *Guignardia mangiferae* (fase sexuada de *P. capitalensis*) já foi isolada por Souza et al. (2013) de *M. urundeuva*. De plantas medicinais, o gênero *Phyllosticta* já foi relatado em *Guazuma tomentosa* (SRINIVASAN et al., 2010).

Outro gênero que apresentou-se constante foi *Colletotrichum*, tendo sido isolado apenas de área de brejo de altitude. O gênero pode ser encontrado em muitas espécies vegetais, como legumes, gramíneas e inclusive plantas medicinais, como *Taxus mairei*, *Pereskia bleo* e *Lippia siddoides* (planta medicinal da Caatinga) (MUSSI-DIAS et al. SENTHIL et al. 2011; SIQUEIRA et al. 2011; CHOW & TING, 2015). O gênero *Colletotrichum* também foi o segundo mais isolado em um estudo de Mussi-Dias et al. (2012) que relataram a presença de fungos endofíticos em plantas medicinais. Este gênero também já foi relatado na planta medicinal *Zingiber officinale* (Anishal & Radhakrishnan, 2017). Os endófitos identificados como *Colletotrichum* e *Phyllosticta* foram isolados apenas do ecossistema de brejo de altitude. Bezerra et al. (2012) e Freire et al. (2015) estudando uma espécie de Cactaceae da Caatinga não recuperaram espécies pertencentes a esses dois gêneros. Em outro ambiente, uma floresta temperada no Japão, Hata et al. (2002) relataram espécies de *Colletotrichum* e *Phyllosticta* como os endófitos mais frequentes.

O isolamento de fungos do gênero *Penicillium* em área de brejo de altitude e Caatinga no presente trabalho assemelha-se ao relatado por Dastogeer et al. (2018), que isolaram *Penicillium* sp. em plantas medicinais indígenas australianas do gênero

Nicotiana, em regiões áridas do Nordeste da Austrália.

Três isolados de brejo de altitude e Caatinga foram identificados como *Sarocladium terricola*. Espécies de *Sarocladium* são frequentemente relatadas em associação com gramíneas, como parasitas e como endofíticos mutualistas (SUMMERBELL et al. 2012). O gênero também já foi relatado na China, de plantas medicinais, como a *Salvia miltiorrhiza* (LOU et al. 2013).

O gênero *Alternaria* foi relatado no presente estudo, totalizando três isolados na área de brejo de altitude, já tendo sido relatado em diversas plantas medicinais, incluindo espécies do gênero *Nicotiana* em regiões áridas da Austrália (DASTOGEER et al. 2018) e espécies como *Lippia sidoides* (SIQUEIRA et al. 2011) e *Cereus jamacaru*, no Brasil (BEZERRA et al. 2013).

Foram isolados também fungos pertencentes ao gênero *Exserohilum*, em Caatinga e em brejo de altitude. Espécies deste gênero já foram relatadas causando doenças em várias plantas (YAMAGUCH & MUTSUNOBU, 2010), podendo ser patogênicas também em humanos e animais domésticos, como cães, gatos, cavalos e bovinos (PADHYE et al. 1986). Estudos relataram a espécie *Exserohilum rostrata* na planta medicinal *Bauhinia guianensis*, uma planta medicinal da Amazônia, utilizada por populações locais para tratamento de infecções e diabetes (PINHEIRO, et al. 2016).

Alguns isolados neste estudo tiveram apenas um representante do gênero identificado. É o caso dos isolados B25 (URM 7799); B61 (URM 7788), B56 (URM 7798) e B117 (URM 7800), pertencentes aos gêneros *incertae sedis*, *Earliella*, *Neofusicoccum* e *Rhinochadiella*, respectivamente, todos isolados de brejo de altitude e sendo relatados pela primeira vez para a planta *M. urundeuva*.

A espécie *Earliella scabrosa* pertencente ao filo Basidiomycota, cultivada em meio BDA se desenvolveu apresentando coloração branca, textura algodonsa e demonstrou um crescimento lento tanto em temperatura controlada (BOD) a 25° C, quanto em temperatura ambiente a 27°C. Sabe-se que os representantes de *Earliella* possuem o basidiocarpo fortemente aderido ao hospedeiro, geralmente em troncos e galhos de árvores (RYVARDEN & JOHANSEN, 1980), o que pode explicar o contato dos esporos com as folhas. Espécies de fungos macroscópicos já foram relatadas habitando troncos em decomposição de *Schinus terebinthifolius* (aroeira da praia) em ambiente de brejo de altitude no município de Triunfo, PE (GILBERTONI, 2012). E a espécie *E. scabrosa* já foi isolada como fungo endofítico da planta medicinal *Zingiber officinale* em estudo de Anisha & Radhakrishnan (2017).

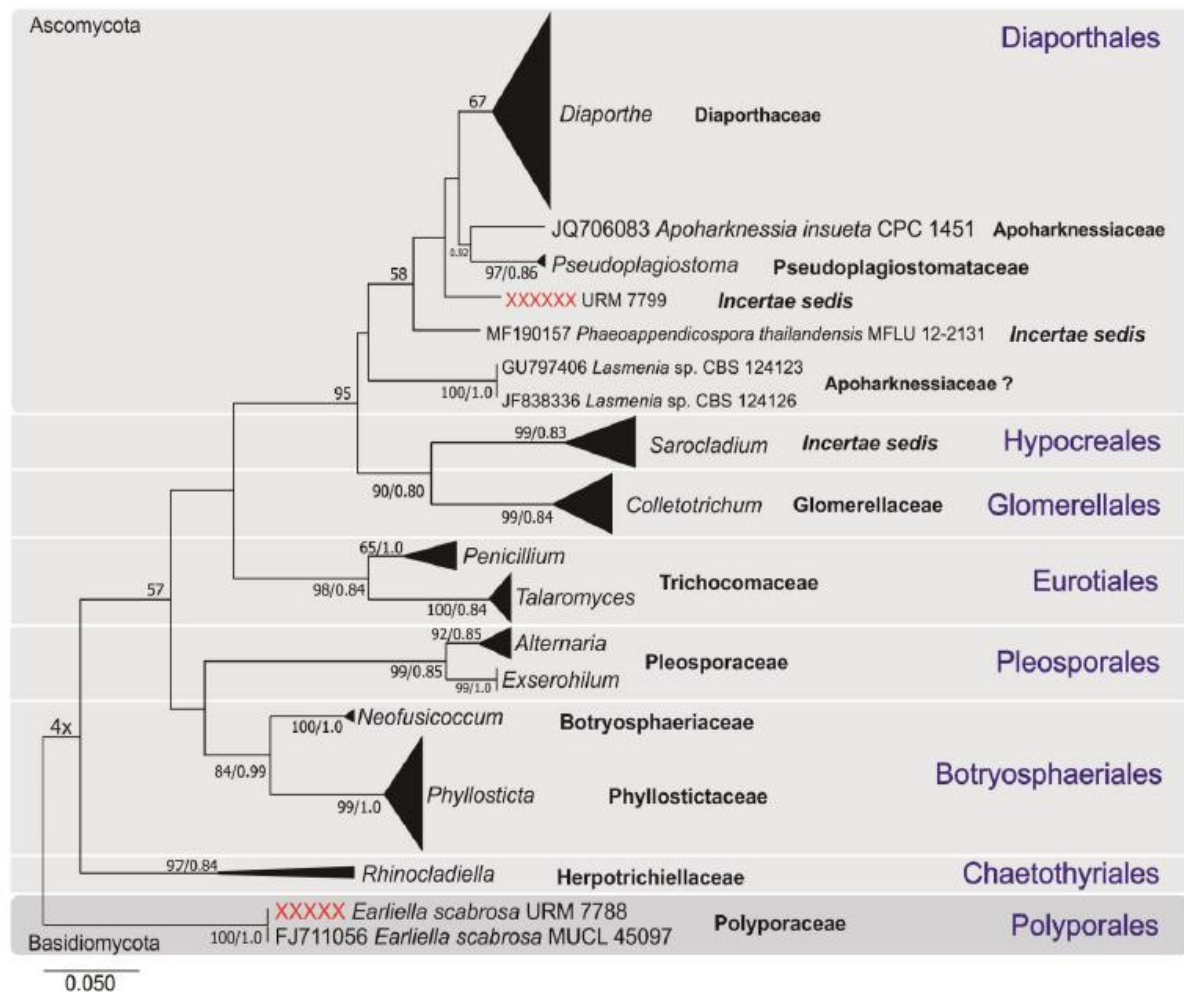
O gênero *Rinocladiella* teve também apenas um representante em brejo de altitude. A espécie *Rinocladiella simillis*, encontrada no presente estudo, também já foi isolada de plantas nativas da floresta atlântica brasileira, mais precisamente no parque da Serra do Mar em gradientes altitudinais (BOMFIM, 2016). Outros fungos relatados no presente trabalho foram *Neofusicoccum* sp. e um isolado denominado *incertae sedis* em Diaporthales.

Foi relatada a presença de fungos pigmentados nas duas áreas, como os gêneros *Alternaria*, *Phyllosticta*, *Exserohilum*, *Rinocladiella*, *Penicillium* e *incertae sedis* em Diaporthales. Diversos estudos já destacaram o isolamento de fungos endofíticos pigmentados em regiões secas e desérticas (SURYANARAYANAN et al., 2005; SUN et al., 2012). A melanina presente em alguns fungos pode ser o fator desencadeador que lhes confere proteção térmica em estresses ambientais (REDMAN et al. 2002; SUN et al. 2012;). Por outro lado, outros estudos mostram que o acúmulo de melanina em algumas espécies de fungos, como *A. alternata* e *Magnaporthe grisea* pode estar envolvido com a patogenicidade (KAWAMURA et al., 1997).

4.3 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Para confirmar os resultados obtidos nas pesquisas BLASTn, as análises filogenéticas realizadas baseadas em ML e BI mostraram a presença de endófitos pertencentes a sete ordens em Ascomycota (Botryosphaeriales, Chaetothyriales, Diaporthales, Eurotiales, Glomerellales, Hipocreais e Pleosporales) e uma ordem em Basidiomycota (Polyporales) (Figura 19)

Figura 19. Árvore de máxima verossimilhança (ML) obtida de seqüências de rDNA de ITS de 158 fungos endofíticos isolados dos folíolos da planta medicinal *M. urundeuva* crescendo em uma floresta seca tropical (Caatinga) e brejo de altitude. *Earliella scabrosa* (Basidiomycota, URM 7788 e MUCL 45097) foi utilizado como grupo externo. Os valores de suporte do ML bootstrap foram acima de 50% e as probabilidades posteriores do BI acima de 0,80.



4.4 ANÁLISES ECOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS

A taxa de colonização dos fungos foi de 39,58% para brejo de altitude e 10,41% para Caatinga e no geral (para as duas áreas), a taxa de colonização foi de 25%. Em espécies de plantas medicinais chinesas Wang et al. (2008) relataram uma taxa de colonização superior a 74% por fungos endofíticos de folhas, caules e frutos. E estudos de Banhos et al. (2014) apresentaram uma taxa de colonização endofítica de 53,3% na planta medicinal *Myrcia guianenses*, utilizando também o meio BDA para o isolamento. Assim como no presente trabalho, Brown et al. (1998) também obtiveram uma maior quantidade de fungos endofíticos em folhas mais velhas de *Musa acuminata*.

A maior frequência relativa foi do gênero *Diaporthe* (FR: 36,28 %), sendo este o gênero dominante tanto para Caatinga como para brejo de altitude e *Phyllosticta* que

ocorreu apenas em brejo de altitude (FR: 19,77 %) (Tabela 4). Os endófitos pertencentes a *Exserohilum*, *Diaporthe*, *Penicillium* e *Sarocladium* foram observados em ambas as áreas, enquanto que *Talaromyces* foi obtido apenas na Caatinga e *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Earliella*, *Neofusicoccum*, *Phyllosticta*, *Rhinochadiella* e um endófito denominado *incertae sedis* em Diaporthales foram isolados apenas no ecossistema de brejo de altitude (Figura 20). O gênero *Talaromyces* (IndVal = 1; $p < 0,001$) foi o indicador da Caatinga, e os gêneros *Phyllosticta* (IndVal = 1; $p < 0,001$), *Diaporthe* (IndVal = 90%; $p < 0,006$) e *Colletotrichum* (IndVal = 79% $p < 0,026$) foram indicadores de brejo de altitude.

A composição das comunidades de fungos endofíticos diferiu significativamente entre Caatinga e brejo de altitude com base na análise de PerMANOVA ($F = 12,25$, $R^2 = 0,47$, $p < 0,0001$) (Figura 21). A curva de acumulação de espécies não atingiu o ápice, mas o esforço de amostragem foi suficiente para recuperar 96% e 71% da riqueza estimada, utilizando o índice Chao de primeira ordem (Chao 1), para a Caatinga e brejo de altitude, respectivamente (Fig. 22a, b). A riqueza e a diversidade dos fungos endofíticos, com base no índice de Shannon, foram significativamente maiores para brejo de altitude (Figuras 23a, b), mas não há diferença de diversidade com base no índice de Fisher entre as duas áreas (Fig.ura 23c).

Tabela 4. Diversidade, Riqueza e Frequência relativa dos fungos endofíticos isolados de folíolos de *M. urundeuva*, coletados em brejo de altitude e Caatinga

Fungos endofíticos	Caatinga		Brejo de altitude	
	<i>f</i>	<i>fr</i>	<i>f</i>	<i>fr</i>
<i>Alternaria</i> spp.			5	2.67
<i>Colletotrichum</i> sp.			17	9.09
<i>Diaporthe</i> spp.	11	5.88	55	29.41
<i>Earliella scabrosa</i>			1	0.53
<i>Exserohilum</i> sp.	5	2.67	3	1.60
<i>Neofusicoccum</i> sp.			1	0.53
<i>Penicillium</i> spp.	1	0.53	5	2.67
<i>Phyllosticta</i> sp.			34	18.18
<i>Rhinochadiella</i> sp.			1	0.53
<i>Sarocladium terricola</i>	2	1.06	1	0.53
<i>Talaromyces</i> sp.	10	5.34		
<i>Incertae sedis</i> in Diaporthales			1	0.53

Figura 20. Diagrama de Venn mostrando números de fungos endofíticos únicos e compartilhados entre as áreas de Caatinga e brejo de altitude.

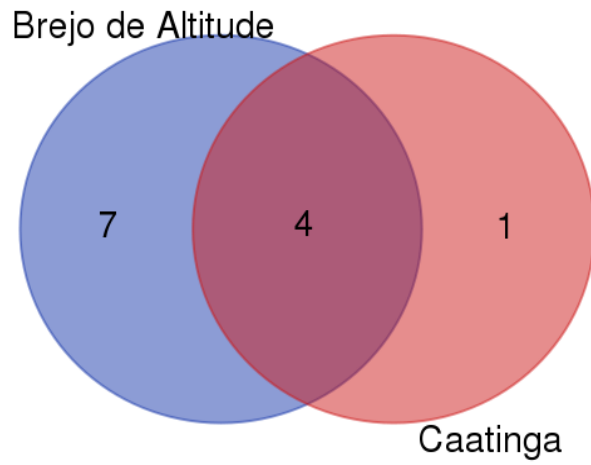


Figura 21. Escala multidimensional não métrica (NMDS) dos conjuntos de fungos endofíticos de folíolos de *M. urundeuva* em áreas de Caatinga e brejo de altitude.

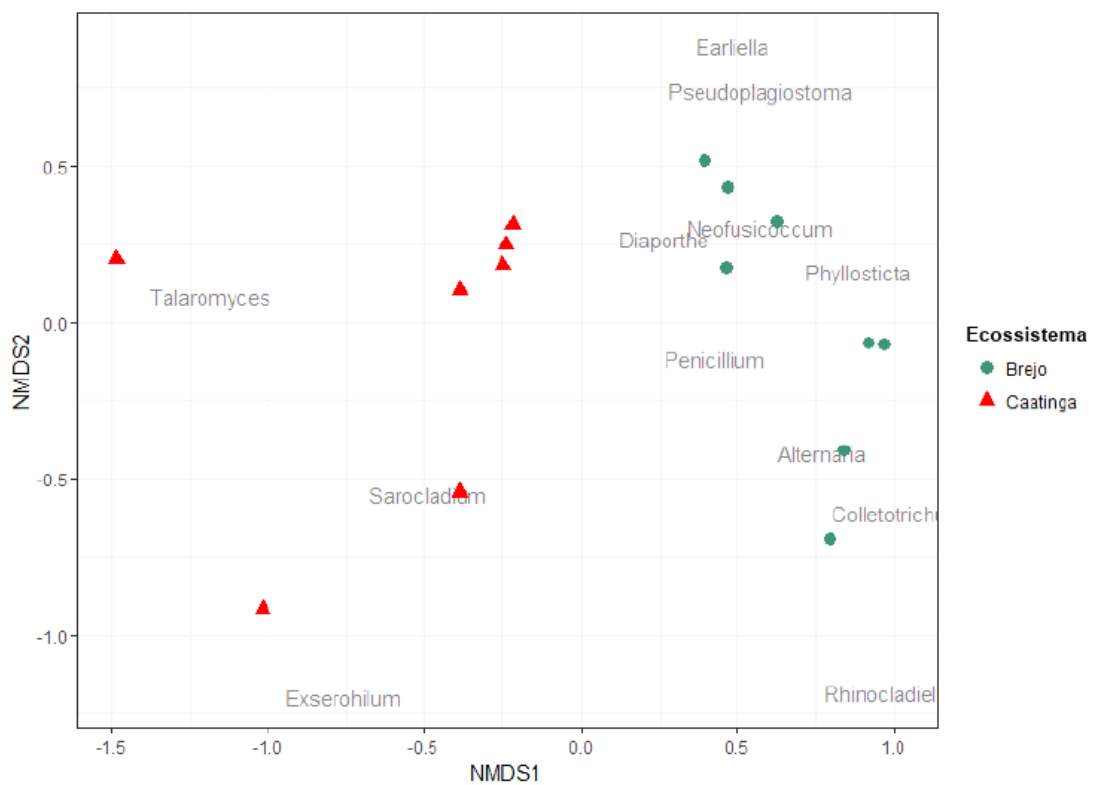


Figura 22 (a,b). Curvas de acumulação de espécies de fungos endofíticos dos folíolos de *M. urundeuva*, mostrando a riqueza registrada (Rich.obs) e estimada (Chao1) nas áreas de Caatinga (a) e de brejo de altitude (b).

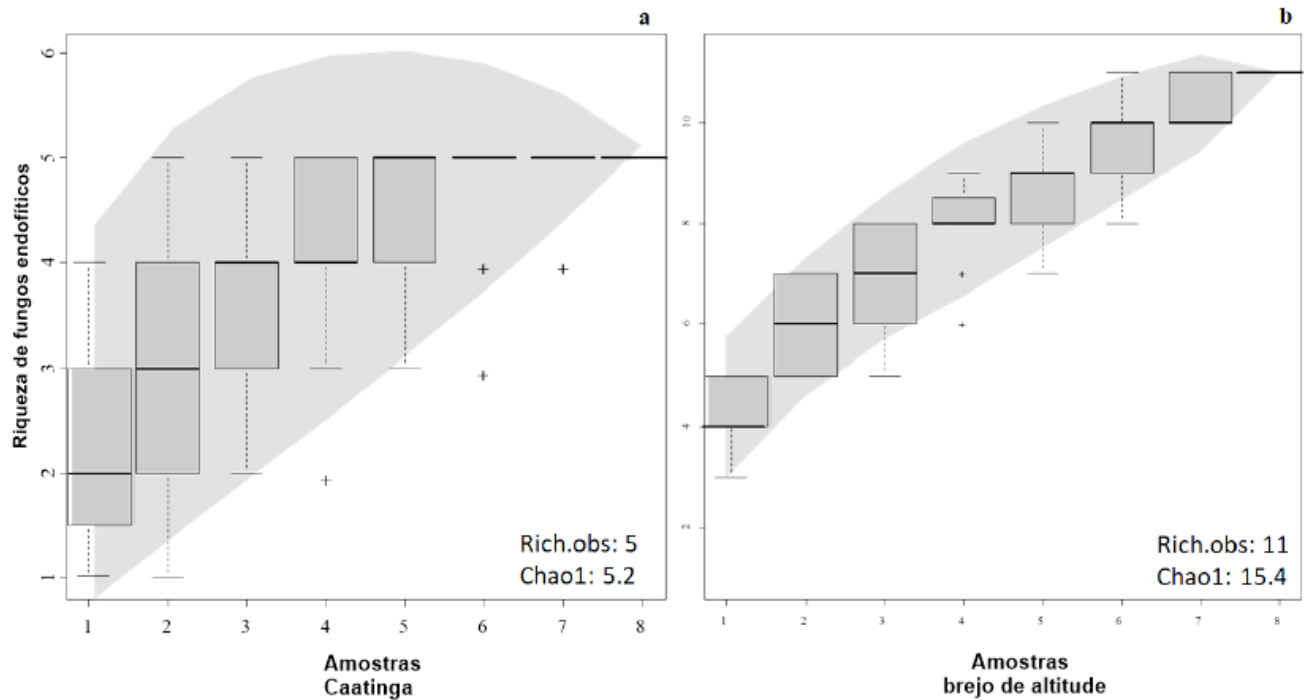
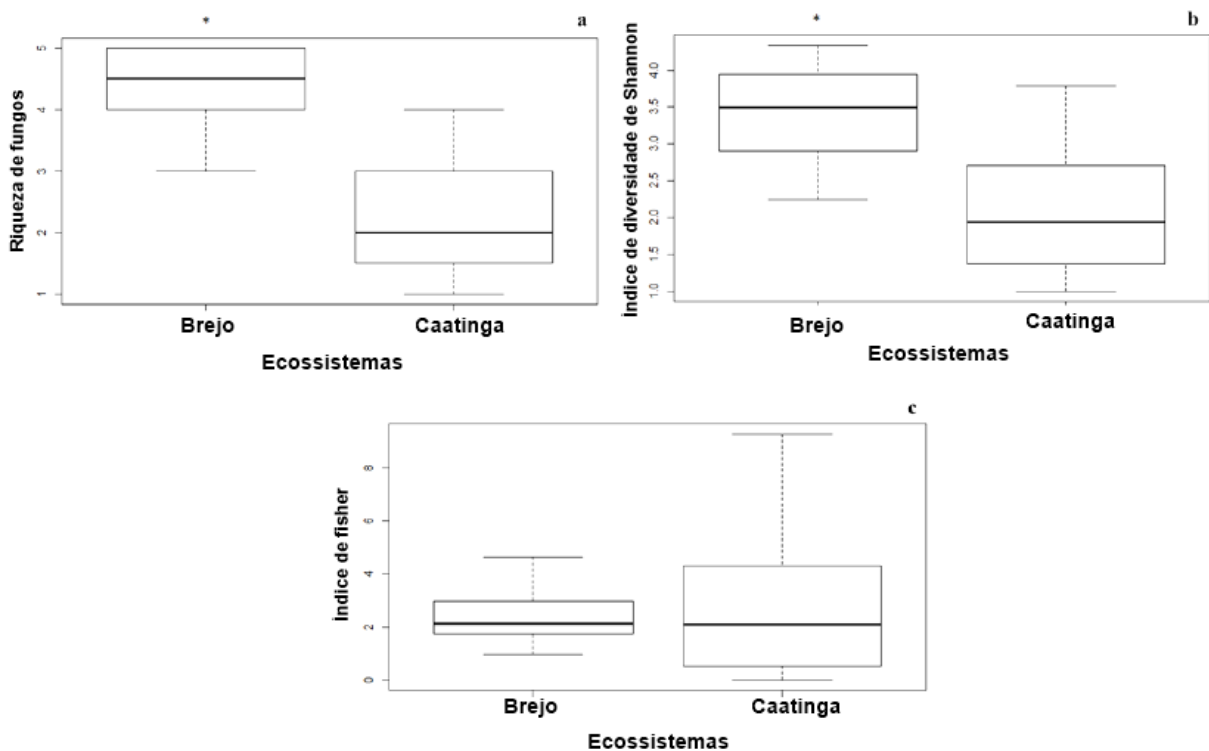


Figura 23 (a,b,c). Boxplot indicando a riqueza (a) e a diversidade baseada nos índices de Shannon-Wiener (b) e Fisher (c) de fungos endofíticos de folíolos de *M. urundeuva* em áreas de Caatinga e brejo de altitude. Os asteriscos (*) indicam valores significativamente maiores do ANOVA de sentido único baseado em atributo avaliado. Mediano (ponto central), quartil (caixa), máximo e mínimo são mostrados.



A comunidade de fungos endofíticos de *M. urundeuva* é muito diversificada como indicado pelos valores médios dos índices de diversidade (Caatinga: $H' = 2.10$ e valor Fisher-Alpha = 2.30; brejo de altitude: $H' = 3.41$, valor Fisher-Alpha = 2.40). Alguns relatos sobre fungos endofíticos realizados na Caatinga com espécies de Cactaceae em estudo de Bezerra et al., (2013) demonstraram valores de índice de diversidade semelhantes aos obtidos no presente estudo ($H = 2,991$ e valor de Fisher-Alpha = 9,167 a 12,52). Verificando a diversidade e o potencial enzimático dos endófitos das folhas da planta medicinal *Bauhinia forficata* no Brasil, Bezerra et al. (2015) apresentaram um índice de Shannon-Wiener de 1.842, e os valores obtidos dos outros tecidos da planta (sépalas, sementes e hastes) variando de 1.677 a 2.206. Verificando a diversidade, potencial anticancerígeno e antimicrobiano dos endofitos fúngicos associados à planta medicinal *Monarda citriodora* na Índia, Katoch et al. (2017) observaram um índice de $H' = 2,890$ nas folhas, enquanto o índice Fisher-Alpha não estimou nenhum valor de diversidade. Esses resultados indicam que a diversidade dos fungos endofíticos associados às folhas de *M. urundeuva* é alta e é influenciada pelo ecossistema onde a planta foi coletada.

As curvas de acumulação obtidas neste estudo mostraram que a comunidade de fungos endofíticos não foi totalmente recuperada. Pesquisas sobre a diversidade de endófitos realizadas em ambientes secos, incluindo a floresta da Caatinga, também já demonstraram que a diversidade dos fungos endofíticos em seus estudos não foi totalmente recuperada (MURALI et al. 2007; LORO et al. 2012; BEZERRA et al. 2013; SILVA-HUGHES et al. 2015; DASTOGEER et al. 2018). Outros pesquisadores como Arnold et al. (2000) e Arnold & Lutzoni (2007) estudando a floresta úmida tropical também demonstraram a incapacidade de isolar todas as espécies estimadas que vivem em um hospedeiro. Além disso, outros estudos que relataram também a diversidade de *M. urundeuva* não conseguiram isolar uma grande diversidade de fungos endofíticos.

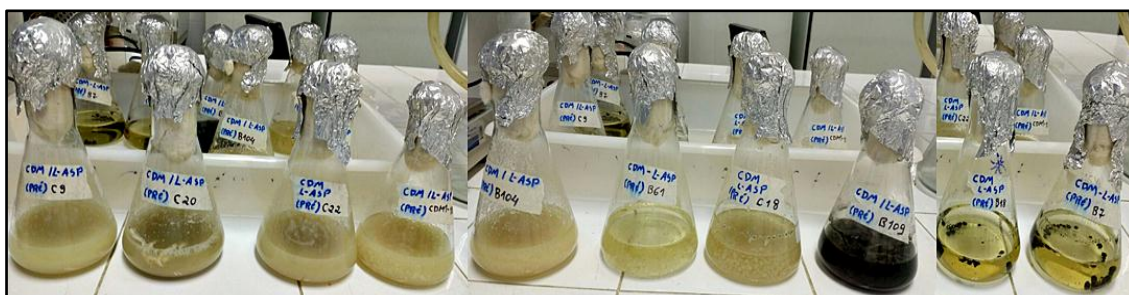
4.5 PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE

Dos 20 fungos selecionados, 16 apresentaram biomassa suficiente para o teste de produção da enzima L-asparaginase, e destes, 13 apresentaram produção da enzima após análise dos *screenings* (Tabela 6).

Após serem inoculados em meio de pré-fermentação CDM, os fungos aumentaram sua biomassa (Figura 24), o que possibilitou a filtração e posterior

transferência para o meio de fermentação, onde foi realizada nova filtragem e pesagem da biomassa obtida. Na maioria dos fungos foi possível essa pesagem, no entanto, em quatro isolados o aumento da biomassa foi insuficiente, o que impossibilitou a avaliação da atividade com esses fungos. Os isolados C1 (*Exserohilum sp.* URM 7780) B104 (*Colletotrichum sp.* URM 7796), B61 (*Earliella scabrosa* URM 7788) e B18 (*Phylosticta sp.* URM 7797) apresentaram biomassa insuficiente não sendo possível avaliar sua atividade enzimática de L-asparaginase.

Figura 24. Aumento da biomassa fúngica no meio CDM de pré-fermentação no teste de L-asparaginase



Fonte: Pádua, A. P. S. L.

O teste inicial para o isolamento dos fungos a partir do meio CDM (Czapeck-Dox modificado) apresentou os seguintes resultados: três isolados deste meio de brejo de altitude não apresentaram atividade enzimática, entretanto, o teste mostrou-se eficiente, uma vez que das 10 cepas isoladas deste meio testadas sete mostraram atividade e destas, três obtiveram os maiores níveis de produção (duas da Caatinga e uma de brejo de altitude). Estudos químicos de Sobreira (2016) evidenciaram a presença de fungos endofíticos da aroeira do sertão produtores de substâncias biologicamente ativas, descrevendo sua prospecção química e comprovando sua citotoxicidade.

No primeiro *screening* realizado, seis cepas apresentaram biomassa suficiente e apresentaram atividade, e os isolados que produziram melhor a enzima foram C22 (*Talaromyces sp.* URM 7785 ; C20 (*Sarocladium terricola sp.* URM 7778) e C18 (*Diaporthe sp.* URM 7779), apresentando atividade de 1,91 U/g, 1,37 U/g e 2 U/g, respectivamente.

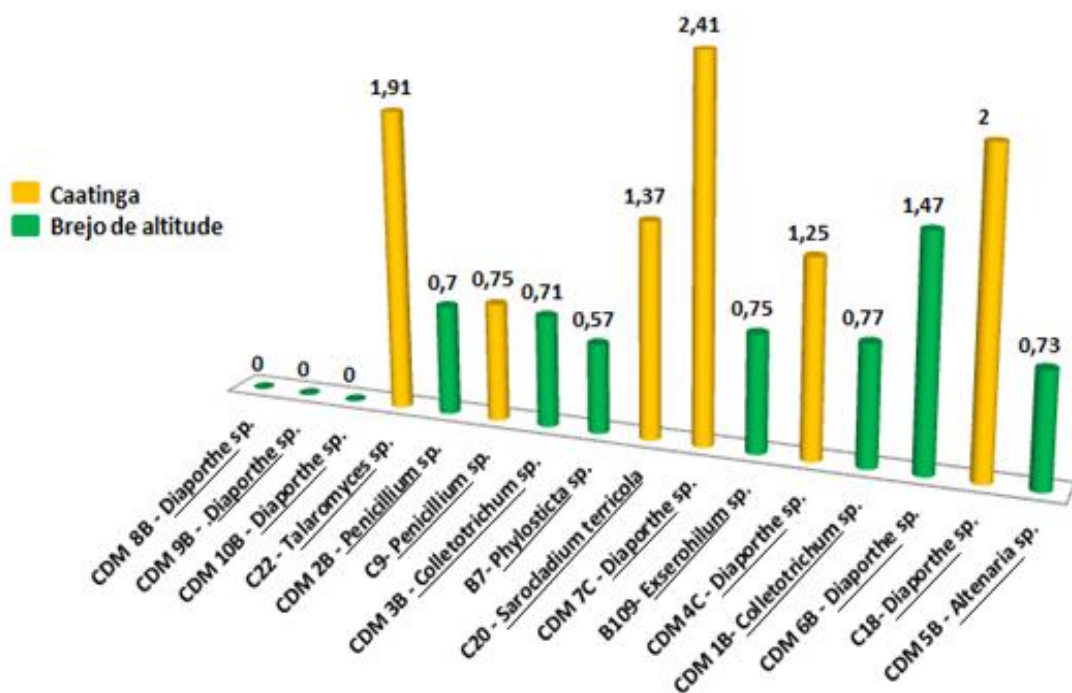
No segundo *screening* realizado, todos os isolados apresentaram biomassa suficiente para o teste de produção da enzima L-asparaginase, porém, três isolados não produziram a enzima (CDM 8B URM 7784; CDM 9B URM 7794; CDM 10B URM 7795). Os fungos com melhor desempenho na produção da atividade foram CDM 4C (*Diaporthe sp.* URM 7791), CDM 6B (*Diaporthe sp.* URM 7792) e CDM 7C (*Diaporthe sp.* URM 7793), apresentando atividade de 1,25 U/g, 1,47 U/g e 2,41 U/g,

respectivamente.

Os fungos endofíticos de plantas medicinais têm a capacidade de produzir os mesmos compostos biológicos ou compostos similares aos relacionados com as substâncias isoladas de tecidos vegetais de seus hospedeiros (VENIERAKI et al. 2017). Segundo Schulz e Boyle, (2005) a porcentagem de fungos endofíticos produtores de compostos biologicamente ativos geralmente é alta, podendo alcançar 80% dos isolados. É o que demonstra inúmeros estudos a partir do potencial farmacológico dos endofíticos isolados de plantas medicinais (LIU et al. 2016; HUANG et al. 2007; VENIERAKI et al. 2017).

Dos 13 isolados produtores da enzima sete são de brejo de altitude e seis de Caatinga, e os fungos de Caatinga foram os que melhor se destacaram na quantidade da enzima produzida (Figura 25). Os fungos deste ambiente parecem apresentar características favoráveis para produção da L-asparaginase, assim como relatado por Santos et al. (2015) que demonstraram a atividade dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gibberella* e *Penicillium*, isolados do cacto *Cereus jamacuru* também de ambiente de Caatinga.

Figura 25. Produção da enzima L-asparaginase pelos fungos endofíticos da *M. urundeuva* nos dois ambientes analisados.



Segundo Begon et al. (2009), a Caatinga é influenciada constantemente por eventos extremos como baixas precipitações, alta salinidade no solo e altas temperaturas. Essas condições desencadeiam nos vegetais diferentes vias metabólicas que acarretam respostas adaptativas inovadoras, o que pode ser excelente para os processos biotecnológicos. A partir disto, seus fungos endofíticos podem representar fontes promissoras, como mostra recente estudo de Cavalcanti et al. (2017), relatando produção da enzima tanase por fungos endofíticos isolados de plantas da Caatinga, inclusive da *M. urundeuva*.

É o primeiro registro de produção da enzima L-asparaginase por fungos dos gêneros *Sarocladium* e *Diaporthe*. As cepas que produziram as maiores quantidades da enzima L-asparaginase pertencem ao gênero *Diaporthe*, como CDM 4C (*Diaporthe* sp. URM 7791), CDM 6B (*Diaporthe* sp. URM 7792), C18 (*Diaporthe* sp. URM 7779) e CDM 7C (*Diaporthe* sp. URM 7793). Estudos demonstram que este gênero tem alto potencial biotecnológico, já tendo sido relatado como produtor de diversas substâncias, inclusive anticancerígenas como *Phomopsis cassiae*, isolado de *Cassia spectabilis* que produz um metabólito que apresenta citotoxicidade contra uma linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa) (SILVA et al. 2005), *Phomopsis* sp. isolado de *Taxus cuspidata* que produz taxol, um composto com atividade anticancerígena (KUMARAN, 2009) e *P. archeri* isolado de *Vanilla albidia* que produz sesquiterpenos com atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer (HEMTASIN et al. 2011). Além destas substâncias, o composto Phomopxanthone A e B, produzido por *Phomopsis* sp., isolado de *Tectona grandis* apresenta atividade in vitro antimalárica, antituberculose e citotóxica (ISAKA et al. 2001). Os outros dois maiores produtores da enzima foram C22 (*Talaromyces* sp. URM 7785) e C20 (*Sarocladium terricola* URM 7778), ambos isolados de ambiente de Caatinga. O gênero *Talaromyces* já foi citado como produtor de compostos antitumorais em estudos de Li et al. (2011) e mais recentemente em estudos de Palem et al. (2015), onde reportaram *Talaromyces radicus*, isolado das folhas de *Catharanthus roseus* como produtor das substâncias vincristina e vimblastina. Além destes, o fungo *T. pinophilus*, isolado da planta medicinal *Curcuma amada*, já foi relatado como produtor de L-asparaginase em estudos de Krishnapura & Belur (2016). Não foi relatada na literatura a espécie *Sarocladium terricola* como produtora de L-asparaginase.

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que há diferença estatisticamente

significativa entre a produção de L-asparaginase por endófitos de *M. urundeuva*, uma vez que o valor de p obtido no teste foi $p = 0,0144$ (Tabela 5). Comparando a produção entre os isolados, pode-se observar que não há diferença significativa entre as médias obtidas para *Diaporthe* sp. URM 7793, *Diaporthe* sp. URM 7779, *Talaromyces* sp. URM 7785 e *Diaporthe* sp. URM 7792. No entanto, há uma diferença significativa entre a produção obtida pelo isolado *Diaporthe* sp. URM 7793 e outros isolados com uma produção inferior a 1,37 U/g, como é o caso da cepa *Sarocladium terricola* URM 7778.

Tabela 5. Atividade de L-asparaginase obtida por fungos endofíticos isolados de folíolos da planta medicinal *M. urundeuva* nos ecossistemas de Caatinga e brejo de altitude

Fungo edofítico	URM	Ecossistema	Atividade 1 (U/g)	Atividade 2 (U/g)	Average (U/g)
<i>Diaporthe</i> sp.	7793	C	2.25	2.57	2.41 ^a
<i>Diaporthe</i> sp.	7779	C	2.63	1.38	2.00 ^{ab}
<i>Diaporthe</i> sp.	7792	B	1.36	1.59	1.47 ^{abc}
<i>Sarocladium</i> sp.	7778	C	1.24	1.51	1.37 ^{bc}
<i>Diaporthe</i> sp.	7791	C	1.30	1.19	1.25 ^{cd}
<i>Phylosticta</i> sp.	7787	B	0.58	0.55	0.57 ^{fg}
<i>Talaromyces</i> sp.	7785	C	1.78	2.05	1.91 ^{ab}
<i>Colletotrichum</i> sp.	7782	B	0.69	0.72	0,71 ^{ef}
<i>Penicillium</i> sp.	7790	B	0.70	0.70	0.70 ^{ef}
<i>Altenaria</i> sp.	7783	B	0.70	0.76	0.73 ^e
<i>Exserohilum</i> sp.	7789	B	0.73	0.77	0.75 ^{de}
<i>Penicillium</i> sp.	7786	C	0.93	0.57	0.75 ^{ef}
<i>Colletotrichum</i> sp.	7781	B	0.80	0.75	0.77 ^{de}
<i>Diaporthe</i> sp.	7784	B	0.00	0.00	0.00 ^g
<i>Diaporthe</i> sp.	7794	B	0.00	0.00	0.00 ^g
<i>Diaporthe</i> sp.	7795	B	0.00	0.00	0.00 ^g

C - Caatinga; B - brejo de altitude

Os resultados obtidos no presente trabalho foram satisfatórios, uma vez que outros estudos já obtiveram a produção da enzima L-asparaginase em menor quantidade. Estudos da produção da enzima L-asparaginase por fungos endofíticos, utilizando o meio de cultura (mL) já relataram a produção da enzima utilizando a técnica AHA (método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico). Almeida (2015) obteve uma produção de L-asparaginase por diferentes cepas fungicas e os níveis de produção variaram de 0,019 e 0,610 U.mL⁻¹. Outros estudos como o de Theantana et al. 2007

relataram a produção de L-asapraginase por fungos endofíticos entre 0,019 e 1,530 U.mL⁻¹.

5 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo da comunidade fúngica dos folíolos de *M. urundeuva* nos ecossistemas de Caatinga e de brejo de altitude sugerem que esta planta medicinal nativa vem se desenvolvendo em seu ambiente natural possuindo uma notável diversidade de fungos endofíticos. Esses fungos podem desempenhar mecanismos e estratégias importantes para garantir que a planta viva em diferentes ambientes.

O ecossistema brejo de altitude possui a maior riqueza e diversidade de espécies, comparada a Caatinga, sendo este fato atribuído às condições climáticas favoráveis que este ambiente apresenta.

O gênero *Diaporthe*, o mais frequente nos dois ambientes analisados, parece apresentar uma relação ecológica com a espécie *M. urundeuva*. Segundo dados filogenéticos, sete possíveis novas espécies deste gênero estão sendo descritas. Além disto, as espécies deste gênero estão dentre as melhores produtoras da enzima L-asparaginase, sobretudo as da Caatinga, o que entrelaça ainda mais as relações 'planta-hospedeiro' de ambientes extremos.

Regiões áridas, como a Caatinga, submetidas a condições de estresses naturais consistem em áreas propícias para a descoberta de espécies de fungos que são fontes de moléculas bioativas, como a enzima L-asparaginase, que pode contribuir para vários procedimentos biotecnológicos nas indústrias de alimentos e drogas. E estes fungos são candidatos interessantes aos processos de otimização enzimática.

REFERÊNCIAS

- AGUSTA, A., OHSHI, K., SHIBUYA, H. Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from the tea plant *Camellia sinensis*. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, n. 3, p. 268-272, 2006.
- ALBUQUERQUE, S. G. de.; BANDEIRA, G. R.L. Effect of thinning and slashing on forage phytomass from a Caatinga 01 Petrolina, Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n.6, p.885-89, 1995.
- ALMEIDA, S. P. *et al.*. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 188p. 1998.
- ALMEIDA, R. P. C. **Avaliação da produção de L-asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado**. 104p. Dissertação. (Mestrado em Ciências farmacêuticas) Universidade de Brasília, 2015.
- ANDRADE-LIMA, D.. Esboço fitoecológico de alguns “brejos” de Pernambuco. **Inst. Pesquisas Agron. Nova Sér. Publ. Bot. Técn. Recife**. 8:3-27,1966.
- ANDRADE-LIMA, D. The Caatinga dominium. **Revista Brasileira e Botânica** 4:149-53, 1981.
- ANDRADE-LIMA, D. Present day forest refuges in Northeastern Brazil. in: PRANCE, G.T. (ed.). **Biological Diversification in the Tropics**. Columbia University Press, New York. Pp. 245-254, 1982.
- ANISHA, C.; RADHAKRISHNAN, E. K. Metabolite analysis of endophytic fungi from cultivars of *Zingiber officinale* Rosc. identifies myriad of bioactive compounds including tyrosol. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 146, 2017.
- APPEL, I. M. et al.. Influence of two different regimens of concomitant treatment with asparaginase and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 21, n. 11, p. 2377–80, 2007.
- ARAÚJO, W.L., LIMA, A.O.S., AZEVEDO, J.L., et al. **Manual de isolamento de microorganismos endofíticos**. ESALQ, Piracicaba, 2002.
- ARAÚJO, W.L., MACCHERONI, JR.W., AGUILAR-VILDOSO, C.I., BARROSO, P.A.V., SARIDAKIS, H.O., AZEVEDO, J.L. Variability and interations between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 229-236, 2001.
- ARNOLD, A.E., HERRE, E.A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia** 95:388–398, 2003.
- ARNOLD, A.E., LUTZONI, F.,. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology** 88:541–549, 2007.

ARNOLD, A.E., MAYNARD, Z., GILBERT, G.S. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. **Mycological Research** 105(12):1502-1507, 2001.

ARNOLD, A.E., MAYNARD, Z., GILBERT, G.S. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**. 3: 267–274, 2000.

ARRIEL, E. F., DE PAULA, R. C., BAKKE, O. A., & ARRIEL, N. H. C. Divergência Genética em *Cnidoscolus phyllacanthus* (Mart.) Pax. et K. Hoffm. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, 8(2-3), 2004.

ASSUNÇÃO, M. M. C. **Fungos endófitos isolados de folhas de bananeira (Musa spp.) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura**. 172f. Tese (Doutorado em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds.) **Fungi: multifaceted microbes**. CRC Press, Boca Raton, pp. 189-207, 2007.

BALBACH, 1995. A. **As plantas que curam**. 2ª ed. São Paulo: Missionária. p. 415.

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

BEGON, M., TOWNSEND, C. R., HARPER, J. L. . **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Artmed Editora, 2009.

BETTUCCI, L., SARAVAY, M.. Endophytic fungi of *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. **Mycological Research**, v. 97, n. 6, p. 679-682, 1993.

BEZERRA, J.D.P, NASCIMENTO C.C.F, BARBOSA, R.N, SILVA, D.C.V, SVEDESE, V.M, SILVA-NOGUEIRA, E.B, et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**. 46(1), 49-57, 2015.

BEZERRA, J.D.P, SANDOVAL-DENIS, M., PAIVA, L.M., et al. New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. **IMA Fungus** 8: 77–97, (2017).

BEZERRA, J.D.P, SANTOS, M.G.S., SVEDESE, V.M., LIMA, D.M.M., FERNANDES, M.J.S, PAIVA, L.M, et al. Richness of endophytic fungi isolated from

Opuntia ficus-indica Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World J Microb Biotechnol.** 28:1989–95, 2012.

BEZERRA, J.D.P., SANTOS, M.G.S., BARBOSA, R. N.; SVEDESE, V. M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, 60: 53-63, 2013.

BIGARELLA, J.J., D. ANDRADE-LIMA & P.J. RIEHS. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. **Anais da Academia de Ciências**, nº 47, suplemento, 1975.

BODDY, L., GRIFFITH, G.S. 1989. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. **Sydowia** 41: 41–73.

BONFIM, J. A. et al. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 202-210, 2016.

BORGES, W.S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fonte de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. São Paulo, Brasil, (M.Sc. **Tese**, USP, Ribeirão Preto, 2008.

BOTELLA, L., Diez, J.J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, 47: 9-18, 2011.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**, Imprensa Oficial, 3a edição, Fortaleza, 1976.

BRASIL. **Decreto no 5813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências, de 23 junho de 2006.

BROOME, J. D. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from *guinea pig serum* and yeast in relation to their effect on tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 35, n. 6, p. 967–974, 1965.

BROWN, K. B.; HYDE, K. D.; GUEST, D. I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, 1998.

CABRAL, J. J. P. et al. Recursos hídricos e os brejos de altitude. **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 31-48, 2004.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.

CANNON, P. F., & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, 94(2), 210-220, 2002.

CARROLL, F.E., MÜLLER, E., SUTTON, B.C. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. **Sydowia** 29:87–103, 1977.

CARROLL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkoma, N.J., Van de Heuvel, J. (eds.). **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge University Press, Cambridge, pp.205-222, 1986.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology** 69:2-9, 1988.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas. 627p, 2003.

CAVALCANTI, R.M.F., ORNELA, P.H., O., JORGE, J.A., GUIMARAES, L.H.S., Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, p. 1–9, 2017.

CHANDRAMOULI MANASA AND MONNANDA SOMAIAH NALINI, “L-Asparaginase Activity of Fungal Endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), Endemic to the Western Ghats (India),” **International Scholarly Research Notices**, vol, 2014.

CHEN, S.L., YU, H., LUO, H.M., WU, Q., LI, C.F. and Steinmetz, A., Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects . *Chinese Medicine*, 11: 37. 2016.

CHOW, Y.Y., TING, A.S.Y., Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 869–876, 2015.

COLEY, P.D., BARONE J.A. Herbivory and plant defenses in tropical forests. **Annual Reviews Ecology Systematic** 27: 305–335,1996.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CROUS, P.W, GROENEWALD J.Z. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. **Australasian Plant Pathology**, 34: 463–470, 2005.

DASTOGEER, K. M. G et al. Host specificity of Endophytic Mycobiota of wild *Nicotiana* plants from arid regions of Northern Australia. **Microbial ecology**, v. 75, n. 1, p. 74-87, 2018.

DE CACERES M, LEGENDRE, P. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology** 90(12): 3566-3574, 2009.

DE MENDIBURU, F. **Agricolae tutorial** (Version 1.2-8), 2017.

DEFEUDIS, F. V. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). **Pharmacological Activities and Clinical Applications**, 1, 25-94, 1991.

DEHARO, E., BAELMANS, R., GIMENEZ, A., QUENEVO, C., BOURDY, G. *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the *Tacana ethnic* group in Bolívia. **Phytomedicine**, v.11, p. 516 – 522, 2004.

DO AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, 2011.

DORIYA, K. & KUMAR, D. S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3. **Biotech.** 6(2), 1–10, 2016.

DREYFUSS MM, CHAPELA IH. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: Gullo VP (ed) The discovery of natural products with therapeutic potential. **Butterworth-Heinemann**, London, United Kingdom, pp 49–80, 1994.

DUFRENE, M. & P. LEGENDRE. Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. **Ecological Monographs** 67(3): 345-366, 1997.

DUVAL, M. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia* asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2734–2739, 15 abr, 2002.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid state fermentation. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 4, p. 387–393, 2004.

ESPÍRITO-SANTO, M. M. et al., Sustainability of tropical dry forests: Two case studies in southeastern and central Brazil. **Forest Ecology and Management** 258:922-930, 2009.

FELÍCIO, R.F., et al. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities exhibited by endophytic fungi from the Brazilian marie red alga *Bostrychio tenella* (Ceramiales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, no 6, p. 641-650, 2015.

FERRAZ, E.M.N., M.J.N. RODAL, E.V.S.B. SAMPAIO & PEREIRA, R.C.A. Composição florística em um trecho de vegetação de caatinga e brejo de altitude na região do Vale do Pajeú, Pernambuco. **Revta. Brasil. Bot.** 21(1):7-15, 1998.

FIGUEIRÔA, J. M., BARBOSA, C. A. & SIMABUKURO, E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botânica Brasilica** 18(3): 573-580, 2004.

FISHER R.A, CORBET, A.S, WILLIAMS C.B. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. **J Anim Ecol** 12: 42–58, 1943.

FISHER, P.J., SUTTON, B.C., PETRINI, L.E., PETRINI, O. Fungal endophytes from *Opuntia stricta*: a first report. **Nova Hedwigia** 59:195–200, 1994.

FREIRE, F.C.O., GONCALVES, F.J.T. A diversidade microbiológica da Caatinga Cearense. **Essentia**, Sobral, vol. 14, n° 1, p. 11-34, 2012.

FREIRE, F.C.O.; BEZERRA, J.L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.3, p.304-8, 2001.

FREIRE, K.T.L.S. et al. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, 2015.

GAI, C. S. et al. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. **Journal of basic microbiology**, v. 49, n. 5, p. 441-451, 2009.

GAMBOA GAITAN, M.A. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. **Acta Biológica Colombiana** 11: 10-12.

GAO, X.X., ZHOU, H., XU, D.Y., YU, C.H., CHEN, Y.Q. AND QU, L.H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters** 249: 255-266, 2005.

GARCIA-REYNE, A. et al. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. **Transplant Infectious Disease** 13: 204–207, 2011.

GERARD .I. **The Herhull or General Historie of Plants**. P. 9. London, 1597.

GIBERTONI, T. B., et al. Diversidade de Agaricomycetes lignocelulolíticos (Basidiomycota) em áreas do Sertão de Pernambuco, 2012.

GIULIETTI, A. M. et al. **Apresentando o cenário**. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A. (Org). Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semiárido brasileiro. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). p. 15-18, 2006.

GLIENKE, C., PEREIRA, O. L., STRINGARI, D., FABRIS, J., KAVA-CORDEIRO, V., GALLITERASAWA, L., CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, v.26, p47–56, 2011.

GOMES, R. R. **Phomopsis spp. endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa***, 2008.

GONÇALVES, F. J. T. **Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará e patogenicidade em manga e ramos de umbu-cajá.** Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F.C.O.; LIMA, J.S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia**, v. 15, p.71-92, 2013.

GUIMARÃES, D. O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 134-144, 2007.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-Asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23-26, 1997.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HASSLER, M., 2018. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (version Nov 2017). In: Roskov Y., et al. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life**, 20th December 2017. <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/c549394f8234b586df90bd3896ed1c11> (Acessado em 25 de janeiro de 2018).

HATA, K., ATARI, R., SONE, K., Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. **Mycoscience**, 43: 369–373, 2002.

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

HEMTASIN, C., KANOKMEDHAKUL, S., KANOKMEDHAKUL, K., HAHNVAJANAWONG, C., SOYTONG, K., PRABPAI, S., KONGSAEREE, P. Cytotoxic Pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. **J Nat Prod** 74(4):609–613, 2011.

HENNINGS, P. *Fungi bahienses* a cl. E. Ule collecti. Hedwigia. **Dresden**, v.47, p.266-270, 1908.

HOLDRIDGE, L.R. **Life zone ecology**. Tropical Science Center, San Jose, 1967.

HUANG, W. Y. et al. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1253-1263, 2007.

HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., HYDE, K.D., CORKE, H., Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**.33:61–75, 2008.

IBGE, (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**). Cidades: Infográficos de Pernambuco e Paraíba. Rio de Janeiro, 2014.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K. ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-89, 1973.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer infantil. 2017. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em: 17/12/2017.

ISAKA, M., JATURAPAT, A., RUKSEREE, K., DANWISSETKANJANA, K., TANTICHARON M., THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal Natural Products** 64: 1015–1018, 2001.

IUCN, Standards and Petitions Subcommittee, 2017. Guidelines for using the IUCN red list categories and criteria. Version 13. Standards and Petitions Subcommittee, Cambridge. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>>. (Acesso em 25 de janeiro de 2018).

KATOCH, M., PHULL, S., VAID, S., SINGH, S. Diversity, Phylogeny, anticancer and antimicrobial potential of fungal endophytes associated with *Monarda citriodora* L. **BMC Microbiology**.17:44, 2017.

KATOCHK., STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.** 30, 772–780, 2013.

KAWAMURA, C., MORIWAKI, J., KIMURA, N., FUJITA, Y., FUJI, S., HIRANO, T., KOIZUMI, S., TSUGE, T. The Melanin Biosynthesis Genes of *Alternaria alternata* Can Restore Pathogenicity of the Melanin Deficient Mutants of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 10(4):446-453,1997.

KHARWAR, R.N., VERMA, V.C., STROBEL, G., EZRA, D. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Current Science** 95:228–233, 2008.

KHARWAR, R.N.; MISHRA, A.; SURENDRA, K.G. ;STIERLE, A. ; STERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Nat. Prod. Rep.** 28, 1208, 2011.

KHIDIR, H.H., EUDY, D.M., PORRAS-ALFARO, A., HERRERA, J., NATVIG, D.O., SINSABAUGH, R.L. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. **J Arid Environ** 74:35–42, 2010.

KOIDE, R.T., RICKS, K.D., DAVIS E. Climate and dispersal influence structure of leaf endophyte communities of *Quercus gambelii* in the eastern Great Basin, USA. **Fungal Ecology**. 30:19-28, 2017.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: con un estudio de los climas de la tierra. Fondo de Cultura Económica, México, 1948.

KRINGS M, TAYLOR TN, HASS H, KERP H, DOTZLER N, HERMSEN EJ. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, 174:648–657, 2007.

KRISHNAPURA, P.R. and BELUR, P.D. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants of L-asparaginase production. **Prepar Biochem Biotechnol**. 46:281–287, 2016.

KUMAR, A., PATIL, D., RAJAMOCHANAN, P.R. and AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **PloS one**, 8: e71805, 2013.

KUMAR, R., DEVI, R. A., NAIR, A., BALAKRISHNAN, K. Stimulatory Effect of Acid Hydrolysed Okara Fortified with L-Asparagine on Fungal L-Asparaginase Production by *Aspergillus Terreus* MTCC 1782. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 1458-1468, 2013.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. 1870-1874, 2016.

KUMARAN, R.S., Hur B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 54: 21–30, 2009.

LANDUM, Miguel C. et al. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological research**, v. 183, p. 100-108, 2016.

LEAL, I. R., SILVA, J. M. C., TABARELLI, M., LACHER, JR. T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 139-146, 2005.

LI, H., HUANG, H., SHAO, C., HUANG, H., JIANG, J., ZHU, X., LIN, Y. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*. **Journal of natural products**, 74(5), 1230-1235., 2011.

LIU, S., DAI, H., ORFALI, R.S., LIN, W., LIU, Z., PROKSCH, P. New fusaric acid derivatives from the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* and their phytotoxicity to barley leaves. **J Agric Food Chem**. 64:3127–3132, 2016.

LIU, Y. et al. A new polyketide from *Diaporthe* sp. SXZ-19, an endophytic fungal strain of *Camptotheca acuminata*. **Natural product research**, v. 27, n. 22, p. 2100-2104, 2013.

LOPES, A.M. OLIVEIRA-NASCIMENTO, L., RIBEIRO, A. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Crit Rev Biotechnol**, pp. 1-18, 2015.

LOPES, C.R. et al. **Folhas de chá**. Viçosa: UFV, 2005.

LORO, M., VALERO-JIMÉNEZ, C.A., NOZAWAC, S., MÁRQUEZ, L.M. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. **J Arid Environ** 85:46–55, 2012.

LOU, J. et al. Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activity. **African journal of microbiology research**, v. 7, n. 47, p. 5343-5349, 2013.

LOUREIRO, C. B., BORGES, K.S., ANDRADE, A. F., TONE, L.G., SAID, S. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-Asparaginase produced by *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. **Adv Microbiol**, 2: 138-145, 2012.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 9, n. 2, p. 128-134, 2006.

M. MOHARRAM, A & ZOHRI, ABDEL-NASER and SEDDEK, NERMIEN. L-asparaginase production by endophytic fungi isolated from *withania somnifera* in Egypt. Ss. **International journal of multidisciplinary research**. 2. 30 – 40, 2016.

MAGALHÃES, F. E. A., et al. Isolamento e identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da caatinga da região dos inhamuns, tauá, ceará, brasil. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, v. 17, n. 2, 2017.

MAHMOUD, T.S. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Braz J Pharmacogn**. 21:456–464, 2011.

MARACAJÁ, P.B., BENEVIDES, D.S. Estudo da Flora Herbácea da Caatinga no Município de Caraúbas no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** 6:165-175, 2006.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from MASUMI, S. et al. Isolation, identification and biodiversity of endophytic fungi of *Thymus*. **Progress in Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 43-50, 2015.

MASUMI, S., MIRZAEI, S., ZAFARI, D. and KALVANDI, R. Isolation, identification and biodiversity of endophytic fungi of *Thymus*. **Progress in Biological Sciences**, 5: 43-50. 2015.

MEDEIROS, R.L.S. et al. Ecofisiologia de sementes em brejo de altitude na Paraíba visando à conservação da biodiversidade autóctone. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, p. 697-705, 2017.

MEDINA, J. C. **Flora do Brasil** – dicotiledôneas arbóreas úteis. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas. v. 1 e v. 2, p. 925, 1966.

MILNE, I., WRIGHT, F., ROWE, G. et al. TOPALi: Software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. **Bioinformatics** 20: 1806-1807, 2004.

MINISTERIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde enviou medicamento para teste de qualidade. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28021-ministerio-da-saude-enviou-medicamento-para-teste-de-qualidade>>. Acesso em: 17/12/2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA/SBF, 2002.

MOHAN KUMAR, N. S. et al. Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-Asparaginase Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 741–748, 19 abr, 2013.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium sp.* **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n. 1573-0972 p. 577-587, 2013.

MONTEIRO, J. M., ARAÚJO, E. D. L., AMORIM, E. L. C., Albuquerque, U. P. D. Valuation of the aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão): perspectives on conservation. **Acta Botanica Brasilica**, p. 125–132, 2012.

MORAIS, S.A.L., NASCIMENTO, E.A., QUEIROZ, C.R.A.A. Studies on polyphenols of *Myracrodruon urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 447–452, 1999.

MURALI, T.S, SURYANARAYANAN, T.S, GEETA, R. Endophytic Phomopsis species: host range and implications for diversity estimates. **Canadian Journal of Microbiology** 52: 673–680, 2006.

MURPHY, P.G., LUGO, A.E. Ecology of tropical dry forest. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 17:67-88, 1986.

MUSSI-DIAS, V., ARAÚJO, A., SILVEIRA, S., ROCABADO, J. ARAÚJO, K., Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 14(2): 261–266, 2012.

NAKAHAMA, K.; IMADA, A.; IGARASI, S.; TUBAKI, K. Formation of L-Asparaginase by *Fusarium* Species. **Journal of General Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 269-273, 1973.

NASCIMENTO, T.L., OKI, Y., LIMA, D.M.M. , ALMEIDA-CORTEZ, J.S., WILSON FERNANDES, G., SOUZA-MOTTA, C.M. Biodiversity of endophytic fungi in

different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Elsevier fungal ecology** 14 p.79-86, 2015.

NIHARIKA YADAV, C.; SARKAR, S. Production of L-Asparaginase By *Fusarium Oxysporum* Using Submerged Fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 3, n. 6, p. 32-40, 2014.

O'DONNELL K. *Fusarium and its near relatives*. In: Reynolds DR, and Taylor JW (Eds.) The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. **CAB International, Wallingford**. pp. 225-233, 1993.

OKI, Y., et al. The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

OKSANEN, J, FG et al. vegan: community ecology package in R package version 2.4-0, 2017.

OLIVEIRA, F. C. **Fungos endofíticos de folhas de cajueiro, *Anacardium occidentale* L.; propriedades antagônicas a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo, e avaliação enzimática através de eletrofores e substratos específicos**. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 82p., 1999.

OLIVEIRA, F.C.S, BARROS RFM, NETO, J.M.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Rev Bras Pl Med**.12(3):282-301, 2010.

PADHYE A. A.; AJELLO L.; WIEDEN M. A. et al. Phaeohyphomycosis of the nasal sinuses caused by a new species of *Exserohilum*. **J Clin Microbiol** 24:245– 249, 1986.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência das madeiras de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), cássia (*Senna siamea*) e ipê (*Tabebuia impetiginosa*) a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Floresta e Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 135-144, 2002.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Comput Appl Biosci** 12, 357–358, 1996.

PALEM, P. PC; KURIAKOSE, Gini C.; JAYABASKARAN, C. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. **PloS one**, v. 10, n. 12, 2015.

PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento** 29:62-76, 2002.

PELL, S. K.; MITCHELL, J. D.; MILLER, A. J.; LOBOVA, T. A. Anacardiaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). The families and genera of vascular plants: X. Flowering plants. Eudicots. Sapindales, Curcubitales, Myrtales. Berlin: **Springer**. p. 7-50, 2011.

PEREIRA FILHO, G.A. and MONTINGELLI, G.G. Check list of snakes from the Brejos de Altitude of Paraíba and Pernambuco, Brazil. **Biota Neotropica**. 11: 145–151, 2011.

PEREIRA, J.O.; CARNEIRO-VIEIRA, M.L.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 15:37-40, 1999.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds.). **Microbial ecology of leaves**. Springer, New York, 1991.

PETRINI, O., CARROLL, G. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal of Botany** 59:629–636, 1981.

PETRINI, O.; STONE, J. & CARROLL, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany** 60: 789-796, 1992.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P. HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, p. 1508-1513, 2001.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C. H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011.

PIMENTEL, I. C., KUCZKOWSKI, F. R., CHIME, M. A., AUER, C. G., & JUNIOR, A. G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, 36(1), 2006.

PINHEIRO, E. A. et al. Perfil cromatográfico e potencial químico e biológico de fungos de solo e fungos endofíticos isolados de *Bauhinia guianensis* e *Mimosa acutistipula* var. **Ferrea**, 2016.

PIROZYNSKI, K.A., MALLOCH, D.W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **Biosystems** 6:153–164, 1975.

PORTO, K.C., CABRAL, J.J.P., TABARELLI, M. (Coord.). **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba. História natural, ecologia e conservação**. Ministério do Meio Ambiente e Universidade Federal de Pernambuco, 320 p. Brasília, 2004.

PRATHYUSHA P., RAJITHA S. A. B., SATYA PRASAD K. Diversity and enzymatic activity of foliar endophytic fungi isolated from medicinal plants of Indian dry deciduous forest , **Der Pharmacia Lettre**, 7 (8):244-251, 2015.

QIN, J. C., ZHANG, Y. M., GAO, J. M., BAI, M. S., YANG, S. X., LAATSCH, H., & ZHANG, A. L. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 19(6), 1572-1574, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM R: a language, environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2015.

RAHBEK, C. et al. Predicting continental-scale patterns of bird species richness with spatially explicit models. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1607, p. 165-174, 2007.

RANI, S.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 279-282, 2012.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** 39: 603- 613, 2001.

REDMAN, R.S., SHEEHAN, K.B., STOUT, R.G., RODRIGUEZ, R.J., HENSON, J.N. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science** 298:1581, 2002.

RIZZINI, C.T., Nota prévia sobre a divisão fitogeografia (florístico-sociológica) do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**. 25:1-64, 1963.

RODAL, M.J.N. **Fitossociologia da vegetação arbustivo-arbórea em quatro áreas de caatinga em Pernambuco**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas: Campinas – SP, 1992.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, p. 376-385, 1994.

RODRIGUES, K. F., Samuels, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, 39:131-135, 1999.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of basic microbiology**, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.

RODRIGUES, K.F., COSTA, G.L., CARVALHO, M.P., EPIFANIO, R. A. Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, p.1617–162, 2005.

RODRIGUES, K.F., SIEBER, T.N., GRÜNIG, R. C., HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, 119, Cambridge, v. 108, p. 45–52, 2004.

RONQUIST, F., and J. P. HUELSENBECK. MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19 (12):1572-1574, 2003.

ROSSMAN, A.Y., FARR, D.F., CASTLEBURY, L.A. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. **Mycoscience**, 48: 135–144, 2007.

RYVARDEN, L. et al. A preliminary polypore flora of East Africa. **A preliminary Polypore flora of East Africa**, 1980.

SÁ, R. A. et al. D. M. A. F. N., L.W. Bieber, P. M. G. Paiva. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Compar Bioche. Physio, Part C**, v. 146, p. 300-06, 2009.

SACCARO JUNIOR, N. L. **Desafios da bioprospecção no Brasil**. Texto para Discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2011.

SAIKKONEM, K., WÄLI, P., HELANDER, M., FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **TRENDS in Plant Science** 9(6):275-280, 2004.

SALAZAR, C. S., & DE GARCÍA, M. C. C. Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. **Revista iberoamericana de micología**, 22(2), 99-101, 2005.

SANTOS M.G.S., et al. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. **Sydowia** 67:147–156, 2015.

SANTOS, M. G., et al. Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: can it tolerate climate changes? **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 26(1), 83-99, 2014.

SARQUIS, M.I, OLIVEIRA, E.M, SANTOS, A.S, et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99, 489–92, 2004.

SAXENA, R.K., SINHA, U. L-Asparaginase and glutaminase activities in the cultures filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Curr Sci** 50: 281-219, 1981.

SCHETZ, R. W.; WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of 121 an l-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, n. 1, p. 184–189, 1971.

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

SEETHARAMAN, P., GNANASEKAR, S., CHANDRASEKARAN, R., CHANDRAKASAN, G., KADARKARAI, M. AND SIVAPERUMAL, S. Isolation and characterization of anticancer flavone chrysin (5, 7-dihydroxyflavone)-producing endophytic fungi from **Passiflora incarnat**, 2017.

SHANNON, C.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. **Urbana: University of Illinois Press**, 1949.

SILVA, A. C. O. D., & ALBUQUERQUE, U. P. D. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta botânica brasílica**, 19(1), 17-26, 2005.

SILVA, G.H., TELES, H.L, TREVISAN, H.C., BOLZANI, V.S., YOUNG M.C.M., PFENNINGC, L.H, EBERLIND, M.N., HADDAD, R., COSTA-NETO, C.M., ARAÚJO, A.R.,
New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of Brazilian Chemical Society** 16: 1463-1466, 2005.

SILVA, J.M.C. & TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. **Nature** 404:72-7, 2000.

SILVA, M. I. L. & CAVALCANTI, L. H. Myxomycetes ocorrentes nos brejos de Pernambuco, I. **Boletim Micológico**. 4(1): 31-35, 1988.

SILVA, S.S.; IZABEL, T.S.S.; GUSMAO, L.F.P. Fungos conidiais associados a substratos vegetais submersos em algumas áreas do bioma Caatinga. **Rodriguésia** [online]. vol.65, n.2, pp.527-538, 2014.

SILVA-HUGHES AF, WEDGE DE, CANTRELL CL, CARVALHO CR, PAN Z, MORAES RM, MADDOX VL, ROSA LH. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. **Microbiological Research**, 175: 67-77, 2015.

SIQUEIRA, V.M., CONTI, R., ARAÚJO, J.M., SOUZA-MOTTA, C.M., Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, 53:89–95, 2011.

SIQUEIRA-FILHO, J. A.; SANTOS, A. M. M.; LEME, E. M. C.; CABRAL, J. S. **Atlantic Forest Fragments and Bromeliads in Pernambuco and Alagoas: Distribution, Composition, Richness and Conservation**. Bromeliad Society International: Gale Cengage Learning. 110 p., 2008.

SOBREIRA, A. C. M. Estudo químico e citotóxico de metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.): *Pseudofusicoccum stromaticum* e *Lasiodiplodia theobromae*. **Dissertação**. 2016.

SOUSA, K. Â. O.; ORLANDA, J.F.F.; BEZERRA, G.A.; SOUSA, T.P. Estudo do potencial de fungos endofíticos no controle do agente causal da fusariose em tomateiro. **Agroecossistemas**, v. 5, p. 50-55, 2013.

SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L.C.; MILACH, A.C. Jr.; BANDEIRA, M.A.; NOBRE, M.E.; VIANA, G.S. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 220-225, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**,. 640p., 2005.

SRINIVASAN, K.; JAGADISH, L. K.; SHENBHAGARAMAN, R.; MUTHUMARY, J. Antioxidant activity of endophytic fungus *Phyllosticta* sp. isolated from *Guazuma tomentosa*. **Journal of Phytology**, Humnabad, v. 2, n. 6, p. 37–41, 2010.

STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science-New York then Washington**, 260, 214–214, 1993.

STROBEL, G. et al. *Stegolerium kukenani* gen. et sp. nov. an endophytic taxol producing fungus from the Roraima *Stegolepsis guianensis* and *Kukenan tepuis* of Venezuela. **Mycotaxon**, v.78, p.353-61, 2001.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology** 22:315-333, 2002.

STROBEL, G.A., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 67(4):491-502, 2003.

SUMMERBELL, R.C., GUEIDAN, C., SCHROERS, H.J., DE HOOG, G.S., STARINK, M., AROCHA ROSETE, Y., GUARRO, J., SCOTT, J.A. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Trichothecium* and *Sarocladium*. **Studies in Mycology** 68, 139–162, 2011.

SUN, Y., WANG, Q., LU, X., OKANE, I., KAKISHIMA, M. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycological Progress** 11(3):781-790, 2012.

SURYANARAYANAN, T.S. and THENNARASAN, S. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. **Fungal Diversity** 15: 197-204, 2004.

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

SURYANARAYANAN, T.S., WITTLINGER, S.K., FAETH, S.H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research** 109:635–639, 2005.

SWOFFORD DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts, 2003.

TABARELLI, M. et al. Integridade e ameaças aos brejos da Paraíba e Pernambuco. In: Tabarelli, M. (Ed.) **Plano de Conservação dos Brejos de Paraíba e Pernambuco. Relatório Técnico** do Subprojeto Recuperação e Manejo dos Ecossistemas Naturais de Brejos de Altitude de Pernambuco e Paraíba. Projeto PROBIO, Ministério do Meio Ambiente. Recife. Pp. 82-91, 2001.

TABARELLI, M.; SANTOS, A. M. Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos. **Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba, História Natural, Ecologia e Conservação**, v. 9, p. 17-24, 2004.

TAECHOWISAN, T., PEBERDY, J.F., LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 19:381-385, 2003.

TAYLOR, T.N., TAYLOR, E.L. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: Bacon, C.W., White, J.F. (eds.) **Microbial endophytes**. Marcel Decker, New York, 2000.

TEJESVI, M.V., MAHESH, B., NALINI M.S., PRAKASH, H.S., KINI, K.R., SUBBIAH, V., SHETTY, H.S. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. **Canadian Journal of Microbiology** 52(5): 427-435, 2006.

TENGURIA, R. K., KHAN, F. Biodiversity of Endophytic Fungi in *Withania Somnifera* Leaves of Panchmarhi Biosphere Reserve, Madhya Pradesh. **J Innov Pharm Biol Sci**, v. 2, p. 222-8, 2010.

THEANTANA, T., HYDE, K. D., LUMYONG, S. Asparaginase production by Endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. **KMITL Sci. Tech. J.** 7(S1):13–18, 2007.

THEANTANA, T., HYDE, K. D. LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. **International Journal of Integrative Biology**, 7, 1–8, 2009.

THOMPSON, S. M. et al. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 35, p. 39, 2015.

TIPPANI, R.; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3692-3696, 2012.

TONIAL, F. **Bioprospecção de metabólitos secundários de endófitos de *Schinus terebinthifolius***. [tese] Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2014.

UDAYANGA, D., XINGZHONG, L., MCKENZIE, E.H.C., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A.H.A, HYDE, K.D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**. v. 50, n. 1, p. 189, 2011.

VASCONCELOS SOBRINHO, J. **As regiões naturais do Nordeste, o meio e a civilização**. Conselho de Desenvolvimento de Pernambuco, Recife, 1971.

VENIERAKI, A., DIMOU, M., KATINAKIS, P. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. **Hellenic Plant Protection Journal**. 10: 51–66, 2017.

VERMA, N. et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical reviews in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

VIANA, G. S. B. et al. **Aroeira-do-sertão: estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 164p, 1995.

VIEIRA, M. L.A et al. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 12, p. 847-856, 2014.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS-Microbiology Letters**, 193: 249-253, 2000.

WHITE, T.J, BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York,USA: 315–322, 1990.

WIKKE S., UDAYANGA D., CROUS, P.W. *Phyllosticta*: an overview of current status of species recognition. **Fungal Diversity**. 51:43–61, 2011.

WINK, P. L.; BOGDAWA, H. M.; RENARD, G.; CHIES, J. M.; BASSO, L. A. AND SANTOS, D. S. Comparison between Two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II Constructions: cloning, Heterologous Expression, Purification, and Kinetic Characterization. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, 2, 1, 13-19, 2010.

WIYAKRUTTA, S., SRIUBOLMAS, N., PANPHUT, W., THONGON, N., DANWISSET-KANJANA, K., RUANGRUNGSI,N., MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anticancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 20: 265–272, 2004.

WONG M.H., CROUS P.W., HENDERSON J. *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. **Fungal Diversity**. 56:173–187, 2012.

WORAPONG, J., STROBEL, G.A., FORD, E.J., LI, J.Y., BAIRD, G., HESS, W.M. *Muscodor albus* gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, 79: 67-79, 2001.

WULANDARI, N. F., TO-ANUN, C., HYDE, K. D., DUONG, L. M., DE GRUYTER, J., MEFFERT, J. P., CROUS, P. W. *Phyllosticta citriasiana* sp . nov ., the cause of *Citrus* tan spot of *Citrus maxima* in Asia. **Fungal Diversity**, v.34, p.23–39, 2009.

YAMAGUCHI, K. & MUTSUNOBU, M. A simple selective medium for the primary isolation of *Bipolaris*, *Drechslera* and *Exserohilum* species. **Bull. Minamikyushu Univ.** 40: 55-58, 2010.

YANG, X. et al. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. **Plant Science**, v. 102, n. 1, p. 1-9, 1994.

ZHAO, J., SHAN, T., MOU, Y., ZHOU, L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini Med. Chem.** 11,159–168, 2011. **Rev.**

ZHENG, J.H, KANG, J.C., LEI B.X., LI Q.R., WEN, T.C., MENG, Z.B. Diversity of endophytic fungi associated with *Ginkgo biloba*. **Mycosystema**; 32: 671-81. 2013.

ZOU, W. X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1529-1530.,2000.

APÊNDICE A - LISTA DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Equipamentos	Marca	Modelo
Autoclave	VERTICAL/ AV/ PHOENIX LUTERCO	SEM IDENTIFICAÇÃO
Balança digital	BEL	M254 AI
Bomba a vácuo	PUMP	SEM IDENTIFICAÇÃO
Câmara de fluxo laminar	PACHANE	PA 410
Centrífuga refrigerada	NOVA TÉCNICA	SEM IDENTIFICAÇÃO
Destilador de água	QUIMIS	Q-341-25
Disruptor de células	LOCCUS	SEM IDENTIFICAÇÃO
Dry bath Heat (Banho seco)	LOCCUS	DB-H
Espectrofotômetro	HITACHI	U-5100
Estufa de secagem	TECNAL	TE-393/2
Estufa incubadora	TECNAL	TE-402
Freezer	ELETROLUX	DF38
Incubadora refrigerada com agitação (Shaker)	TECNAL	TE-421
Micro-ondas	SAMSUNG	SMW/6750 W
Microscópio	ZEISS	AXIOSTAR PLUS
Phametro	TECNAL	TEC-3MP
Termociclador	TECHNY PRIME	SEM IDENTIFICAÇÃO
Transluminador	BENCHTOP UV -UUP	SEM IDENTIFICAÇÃO

APÊNDICE B - LISTA DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Meios utilizados	Composição dos meios utilizados
Batata Dextrose Ágar sintético (BDA) com clorafenicol (100mgL⁻¹) (Pitt & Hocking, 1997)	Preparado de acordo com o fabricante. 39g de BDA e 1L de água destilada
Batate dextrose ágar (BDA) natural	40g de batata, 20g de glicose, 20g de agar (1L de água destilada)
Czapex Dox's modificado (CDM) (Saxena & Sinha, 1981) – meio para pré-fermentação	Glicose (2,0 g/L), L-asparagina (10,0 g/L), KH ₂ PO ₄ (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (0,52 g/L), CuNO ₃ .3H ₂ O (0,001 g/L), ZnSO ₄ .7H ₂ O (0,001 g/L), FeSO ₄ .7H ₂ O (0,001 g/L), pH 6,2.
Czapex Dox's modificado (CDM) (Saxena & Sinha, 1981) – meio para fermentação	L-asparagina (10,0 g/L), KH ₂ PO ₄ (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), MgSO ₄ .7H ₂ O (0,52 g/L), CuNO ₃ .3H ₂ O (0,001 g/L), ZnSO ₄ .7H ₂ O (0,001 g/L), FeSO ₄ .7H ₂ O (0,001 g/L), pH 6,2.
Meio para método de preservação de CASTELLANI (1967)	90% de água destilada e 10% de glicerol

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 61879-1	Data da Emissão: 17/01/2018 13:15
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Ana Patrícia Sousa Lopes de Pádua	
---	--

CPF: 092.687.354-74

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	<i>Myracrodruon urundeuva</i>

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 8936994



Página 1/1