



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**GIANNE RIZZUTO ARAÚJO MAGALHÃES**

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DIVERSIDADE DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE *Mandevilla catimbauensis* (APOCYNACEAE) DO PARQUE  
NACIONAL DO VALE DO CATIMBAU**

**RECIFE**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**GIANNE RIZZUTO ARAÚJO MAGALHÃES**

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DIVERSIDADE DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE *Mandevilla catimbauensis* (APOCYNACEAE) DO PARQUE  
NACIONAL DO VALE DO CATIMBAU**

Componente escrito da tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

**Área de concentração:** Produção de compostos bioativos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida Moreira

**Co – Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta

**RECIFE**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M188p Magalhães, Gianne Rizzuto Araújo.  
Produção de L-Asparaginase e diversidade de fungos endofíticos de  
*Mandevilla catimbauensis* (Apocynaceae) do Parque Nacional do Vale do Catimbau  
/ Gianne Rizzuto Araújo Magalhães. – Recife, 2019.  
95 f.: il.

Orientador(a): Keila Aparecida Moreira.  
Coorientador(a)s: Cristina Maria de Souza Motta.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de  
Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências e apêndice(s).

1. Asparaginase 2. Enzima 3. Caatinga 4. Fungo endofítico 5. Planta endêmica  
I. Moreira, Keila Aparecida, orient. II. Motta, Cristina Maria de Souza, coorient.  
III. Título

CDD 636.089

**GIANNE RIZZUTO ARAÚJO MAGALHÃES**

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DIVERSIDADE DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS DE *Mandevilla catimbauensis* (APOCYNACEAE) DO PARQUE  
NACIONAL DO VALE DO CATIMBAU**

Componente escrito da tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociência Animal.

**Aprovada em:**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keila Aparecida Moreira (Orientadora) - UFRPE/UAG**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lidiane Roberta Cruz da Silva – UFRPE/UAG**

---

**Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra - UFPE**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Laura Mesquita Paiva - UFPE**

---

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Marcia Nieves Carneiro da Cunha - UFRPE**

**Membro Suplente:**

---

**Alexandre Reis Machado - UFPE**

---

**André Luiz C. M. de A. Santiago – UFPE**

*Dedico este trabalho a Deus, por conduzir a minha vida, à toda minha família, aos meus pais e ao meu esposo, que sempre me deram apoio, suporte e acreditaram em mim.*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele não sou ninguém.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa, em especial:

À minha mãe Gilmary, que soube com muita garra e dedicação mostrar que nada na vida vem sem esforço, que é preciso ter disciplina, coragem, dedicação, perseverança. Ela me ensinou a nunca desistir dos meus objetivos porque um dia a vitória chega.

Ao meu padasto Antônio Benjamim (*in memorian*), que sempre acreditou e torceu por mim em todos os momentos.

Ao meu irmão George Rizzuto e minha irmã Giannina Rizzuto, por torcerem por mim e me ajudarem sempre.

Ao meu esposo Renan Magalhães, por participar ativamente de cada etapa dessa pesquisa e por sempre estar comigo, me apoiando, ajudando, torcendo, incentivando nos momentos bons e nos difíceis também e por querer me ver crescer ao seu lado.

Ao meu Pai Gilson, por todo carinho, orações e apoio.

À minha avó Vanilda e aos meus tios, pelo apoio nos momentos difíceis.

À minha sogra Ana Maria, por ser minha segunda mãe, torcer e me apoiar em todos os momentos.

Aos meus queridos cunhados, Carlos Henrique, Ana Carla, Jackeline, Saulo, Felipe e Kerolyne por todo o apoio e sempre acreditarem no meu potencial.

À toda minha família, por todo o apoio e carinho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio durante os quatro anos do doutorado.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, pela disponibilização de equipamentos e das instalações da Central de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG).

Ao Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, por todo apoio, acolhimento e conhecimento.

À Universidade Federal de Pernambuco, por todo suporte durante essa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de doutorado concedida para a realização dessa pesquisa.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pela disponibilização de materiais e das instalações da Micoteca URM, do Laboratório de Biologia Molecular e do Laboratório Micologia Ambiental para a realização desse estudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira, pela confiança depositada em mim e por ser essa pesquisadora que nos inspira o saber.

À Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, por ser mais que uma co-orientadora, ser amiga, conselheira, um ser humano admirável.

À Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva, pelo acolhimento no Laboratório de Micologia ambiental, apoio na realização dessa pesquisa, e por ser essa pessoa iluminada, que nos enche amor com cada gesto, uma mãe acadêmica que me acompanha desde a graduação.

Ao Dr. Jadson, por todo apoio e suporte durante os quatro anos dessa pesquisa, você foi fundamental nesses quatro anos, nunca desistiu de mim, nem dos nossos artigos. Você é um amigo muito querido e um Doutor incrível, que faz tudo com muita seriedade e amor.

A todos os membros da banca avaliadora, pelas considerações.

Ao Dr. Gualberto e Dra. Iolanda, por todo apoio com os dados estatísticos e ecológicos.

Aos pesquisadores da USP por todo conhecimento transmitido.

A todos do laboratório de Micologia Ambiental, que me ajudaram sempre com muita paciência.

Às amigas Karla Freire e Leticia Francisca, pela cumplicidade e amizade, e por me ajudarem incansavelmente em todos os momentos que precisei e por contribuírem bastante na realização dessa pesquisa e na vida.

A todos os amigos do Departamento de Micologia, pelos bons momentos e pela amizade.

A todos os amigos da turma de doutorado.

A todos meus queridos amigos que sempre torceram por mim e que me acompanharam em todos os momentos ao longo desses quatro anos com palavras de incentivo e conforto.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*

**Cora Coralina**

## RESUMO

A Caatinga, região exclusivamente brasileira, possui 47 unidades de conservação, entre estas, o Parque Nacional do Vale do Catimbau. O Parque é composto por inúmeras espécies endêmicas, entre elas, *Mandevilla catimbauensis*, uma espécie rara, pertencente à família Apocynaceae, e que está classificada como vulnerável à extinção. Os fungos endofíticos vivem no interior dos vegetais, sem lhes causar danos. Alguns endófitos possuem potencial para produzir substâncias bioativas como a enzima L-asparaginase. A L-asparaginase é utilizada no tratamento de diversos cânceres em humanos e outros animais. É também utilizada na indústria alimentícia para redução dos níveis de acrilamida dos alimentos. Pesquisadores buscam fontes eucarióticas capazes de produzir L-asparaginase com menores efeitos colaterais. O objetivo desse estudo foi estimar a diversidade de fungos endofíticos presentes em *M. catimbauensis* e avaliar o potencial biotecnológico desses fungos na produção de L-asparaginase. Um total de 66 isolados foram obtidos e, a taxa de colonização dos fragmentos foi de 11,78%. As análises filogenéticas utilizando sequências de ITS e/ou LSU do DNAr revelaram a presença de sete ordens do filo Ascomycota. Um total de 18 táxons foi identificados. Os endófitos mais frequentemente isolados foram membros do gênero *Phyllosticta* (45,10%). A curva de acumulação de espécies não alcançou o ponto de estabilização. Uma nova espécie do gênero *Phyllosticta* foi descoberta, descrita e publicada como *Phyllosticta catimbauensis*. A produção de L-asparaginase foi estudada por 20 isolados. Um total de 14 fungos apresentou capacidade de produzir a enzima ( $0,48 \text{ U g}^{-1}$  –  $2,22 \text{ U g}^{-1}$ ). A espécie *P. catimbauensis* exibiu capacidade significativa, e foi selecionada para realizar um planejamento fatorial  $2^3$ . A melhor produção enzimática foi  $2,25 \text{ U g}^{-1}$ , utilizando 1,5 g de L-asparagina, pH 5 e 1,5 g inóculo. Posteriormente, uma sequência experimental foi realizada e foi possível obter um aumento significativo na produção de L-asparaginase de  $3,50 \text{ U g}^{-1}$ , utilizando 3,5 g de L-asparagina, pH 4,2 e 1 g de inóculo. Esse é o primeiro estudo sobre os fungos endofíticos de *M. catimbauensis* e também da produção de L-asparaginase por esses fungos. Essa pesquisa, poderá contribuir com o conhecimento da comunidade fúngica presente em *M. catimbauensis*, além de auxiliar futuros estudos sobre a produção enzimática desses endófitos.

**Palavras-chaves:** Asparaginase. Enzima. Caatinga. Planta endêmica.

## ABSTRACT

The Caatinga, an exclusively Brazilian region, has 47 conservation units, among them, the Catimbau Valley National Park. The park is compound of numerous endemic species, including *Mandevilla catimbauensis*, a rare species belonging to the family Apocynaceae, which is classified as vulnerable to extinction. Endophytic fungi live inside the plants without causing them harm. Some endophytes have the potential to produce bioactive substances like the enzyme L-asparaginase. L-asparaginase is used to treatment various cancers in humans and other animals. It is also used in the food industry to reduce the levels of acrylamide in food. Researchers pursue for eukaryotic sources capable of producing L-asparaginase with lower side effects. The aim of this study was to estimate the diversity of endophytic fungi present in *M. catimbauensis* and to evaluate the biotechnological potential of these fungi in the production of L-asparaginase. A total of 66 isolates were obtained and the rate of colonization of the fragments was 11.78%. Phylogenetic analyzes using ITS and / or LSU sequences of rDNA revealed the presence of seven orders of the Ascomycota phylum. A total of 18 taxa were identified. The most commonly isolated endophytes were members of the genus *Phyllosticta* (45.10%). The curve of species accumulation did not reach the point of stabilization. A new species of the genus *Phyllosticta* was discovered, described and published as *Phyllosticta catimbauensis*. The production of L-asparaginase was studied by 20 isolates. A total of 14 fungi were efficient to produce the enzyme (0,48 U g<sup>-1</sup> – 2,22 U g<sup>-1</sup>). The species *P. catimbauensis* exhibited significant capacity and was selected to perform a factorial design 2<sup>3</sup>. The best enzymatic production was 2,25 U g<sup>-1</sup>, using 1,5 g of L-asparagine, pH 5 and 1,5 g inoculum . Subsequently, an experimental sequence was performed and a significant increase in L-asparaginase production of 3,50 U g<sup>-1</sup> was obtained using 3,5 g of L-asparagine, pH 4,2 and 1 g of inoculum. This is the first study on the endophytic fungi of *M. catimbauensis* and also on the production of L-asparaginase by these fungi. This research may contribute to the knowledge of the fungal community present in *M. catimbaunensis*, besides helping future studies on the enzymatic production of these endophytes.

**Key-words:** Asparaginase. Enzyme. Caatinga. Endemic plant.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Localização do Parque Nacional do Vale do Catimbau (PNC), Pernambuco, Brasil.....	18
<b>Figura 2.</b> <i>Mandevilla catimbaunesis</i> no Parque Nacional do Vale do Catimbau.....	20
<b>Figura 3.</b> Reação química catalisada pela enzima L-asparaginase.....	26

### Capítulo I

<b>Figura 1.</b> Árvore de Inferência Bayesiana obtida das sequências de ITS DNAr de fungos endofíticos isolados de folhas da <i>M. catimbauensis</i> da floresta tropical seca brasileira (Caatinga). O espécime <i>Earliella scabrosa</i> (URM 7788) foi usado como grupo externo. Suporte de bootstrap com valores acima de 50% e probabilidades posteriores de BI acima de 0,80 são mostrados nos nós.....	
<b>Figura 2.</b> Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos isolados de <i>Mandevilla catimbauensis</i> , planta endêmica da floresta tropical seca do Brasil.....	61

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

	Pág
<b>Tabela 1.</b> Espécies que apresentaram alta similaridade com as sequências dos isolados de <i>Mandevilla catimbauensis</i> após busca no banco de dados GenBank.....	56
<b>Tabela 2.</b> Frequência absoluta (Fa) e frequência relativa (Fr) das espécies fungos endofíticos isoladas de <i>Mandevilla catimbauensis</i> , planta endêmica do Parque Nacional do Vale do Catimbau.....	59

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Fungos endofíticos selecionados para produção de L-asparaginase isolados de <i>Mandevilla catimbauensis</i> .....	77
<b>Tabela 2.</b> Planejamento fatorial estatístico 2 <sup>3</sup> com quatro pontos centrais para seleção das melhores condições de produção de L-asparaginase pelo endófito <i>Phyllosticta catimbauensis</i>	79
<b>Tabela 3.</b> Sequência experimental para melhor produção de L-asparaginase pelo endófito <i>Phyllosticta catimbauensis</i> .....	79
<b>Tabela 4.</b> Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de <i>Mandevilla catimbauensis</i> .....	80
<b>Tabela 5.</b> Produção enzimática de <i>Phyllosticta catimbauensis</i> URM 7672 em um planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com quatro pontos centrais.....	81
<b>Tabela 6.</b> Sequência experimental para aumentar a produção enzimática do isolado <i>Phyllosticta catimbauensis</i> URM 7672.....	82
<b>Tabela 7.</b> Atividade da L-asparaginase por <i>Phyllosticta catimbauensis</i> URM 7672 obtida através das melhores condições da sequência experimental.....	82

## SUMÁRIO

	<b>Pág</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 CAATINGA.....	15
<b>2.1.1 Parque Nacional do Vale do Catimbau</b> .....	17
2.2 FAMÍLIA APOCYNACEAE (gênero <i>Mandevilla</i> ).....	19
<b>2.2.1 <i>Mandevilla Catimbauensis</i></b> .....	20
2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	21
<b>2.3.1 Importância ambiental e biotecnológica dos fungos endofíticos</b> .....	23
2.4 A ENZIMA L-ASPAGAGINASE.....	26
<b>2.4.1 Importância da L-asparaginase para a indústria Farmacêutica</b> .....	27
2.4.1.1 Importância da L-asparaginase como fármaco para medicina veterinária.....	30
<b>2.4.2 Importância para a indústria alimentícia</b> .....	30
<b>2.4.3 Importância da L-asparaginase como biossensor</b> .....	32
<b>2.4.4 Produção de L-asparaginase</b> .....	33
2.5. L-ASPAGAGINASE PRODUZIDA POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>Capítulo I Comunidade de fungos endofíticos de <i>Mandevilla catimbauensis</i>: planta endêmica da floresta tropical seca do Brasil e ameaçada de extinção</b>	50
<b>Resumo</b> .....	50
<b>Introdução</b> .....	51
<b>Material e métodos</b> .....	53
<i>Área de estudo</i> .....	53
<i>Material vegetal</i> .....	53
<i>Isolamento de fungos endofíticos</i> .....	53
<i>Extração de DNA, PCR e sequenciamento</i> .....	54
<i>Análises filogenéticas</i> .....	54

	<i>Taxa de colonização e frequência absoluta e relativa.....</i>	55
	<i>Análise de dados ecológicos.....</i>	55
	<b>Resultados.....</b>	56
	<b>Discussão.....</b>	61
	<b>Conclusão.....</b>	64
	<b>Referências.....</b>	65
Capítulo	<b>Potencial biotecnológico para produção de L-asparaginase por fungos</b>	73
II	<b>endofíticos de <i>Mandevilla catimbauensis</i> (Apocynaceae) planta</b>	
	<b>endêmica da floresta tropical seca do Brasil</b>	
	<b>Resumo.....</b>	74
	<b>Introdução.....</b>	75
	<b>Material e Métodos.....</b>	76
	Seleção de Fungos endofíticos.....	76
	Produção de L-asparaginase em fermentação submersa.....	77
	Quantificação da atividade enzimática.....	78
	Seleção das melhores condições de produção de L-asparaginase.....	78
	Análise estatística.....	79
	<b>Resultados.....</b>	80
	<b>Discussão.....</b>	83
	<b>Conclusão.....</b>	85
	<b>Referências.....</b>	86
	<b>Apêndices.....</b>	91

## 1. INTRODUÇÃO

A Caatinga apresenta uma floresta sazonalmente seca que abrange a maior parte dos estados do Nordeste e uma parte do nordeste de Minas Gerais, abrigando espécies endêmicas de aves, mamíferos, peixes e vegetais, e demais espécies que garantem a importância da sua variada e marcante paisagem (LEAL et al., 2005; BEZERRA et al., 2013; CARLIXTO JUNIOR; DRUMOND, 2014).

O Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA) corresponde a uma das áreas de importância na Caatinga (ROCHA et al., 2010; VASCONCELOS; MELO, 2016), possuindo uma exuberante paisagem natural, tem sua flora formada por um verdadeiro mosaico, sendo possível caracterizar várias fitofisionomias, como: caatinga arbustivo-arbórea; arbustiva com predominância de elementos de cerrado, vegetação arbustiva perenefólia, caducifólia e espinhosa (RODAL et al., 1998; SILVA et al., 2007).

Pesquisas científicas estão sendo realizadas no Catimbau com objetivo de estimar a biodiversidade, identificar a quantidade de espécies endêmicas e reforçar a preservação desse local. Cerca de 56 espécies de plantas exclusivas da Caatinga são encontradas no Parque, entre elas merece destaque *Mandevilla catimbauensis*, uma espécie de planta rara pertencente à família Apocynaceae, que se sobressai por ser endêmica e enquadrar-se na categoria vulnerável à extinção (SOUZA-SILVA et al., 2010).

*Mandevilla* Lindl. é considerado o maior gênero neotropical da família Apocynaceae (SIMÕES et al., 2007). No Brasil, foram reconhecidas 40 espécies pertencentes ao gênero *Mandevilla*, incluindo oito novidades taxonômicas (SALES et al., 2006; SOUZA-SILVA et al., 2010). Uma pesquisa realizada na região do semiárido brasileiro sobre a família Apocynaceae, incluiu 29 espécies nativas, destas, sete são endêmicas (SOUZA-SILVA et al., 2010).

A maioria das plantas vasculares são relatadas abrigando micro-organismos endofíticos (KHIDIR et al., 2010; SURYANARAYANAN et al., 2011; CHANDRA, 2012; LOPEZ et al., 2012). Os fungos endofíticos são definidos como aqueles que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e possuem imensa diversidade taxonômica (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; HYDE; SOYTONG, 2008; WHITE JR.; BACON, 2012). Estudos revelam que

espécies de fungos endofíticos apresentam uma diversidade de relações ecológicas com as plantas hospedeiras além de produzirem uma variedade de metabólitos (PEIXOTO-NETO et al., 2004). Desta forma, os endófitos têm demonstrado grande potencial para utilização em processos biotecnológicos e ambientais, com a existência de pesquisas que contribuem com o conhecimento da diversidade de fungos e descoberta de novas espécies (ESTRADA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2017).

Ainda, destaca-se que os fungos endofíticos foram descritos como promissores na produção da enzima L-asparaginase por Theantana et al. (2007, 2009) em estudo com plantas medicinais da Tailândia. A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase E.C.3.5.1.1) é uma enzima utilizada no tratamento de diversos cânceres em humanos (DEVI; AZMI, 2012; LOUREIRO, 2010) e outros animais (SCHLEIS et al., 2011), e também é utilizada na indústria alimentícia na redução de um composto cancerígeno e neurotóxico, a acrilamida (HENDRIKSEN et al., 2005; KUMAR et al., 2014).

Essa enzima pode ser produzida por animais, plantas e micro-organismos, no entanto, os micro-organismos são considerados as melhores fontes de produção de L-asparaginase (KUMAR et al., 2013). Existem duas fontes clínicas conhecidas de L-asparaginase de origem bacteriana (BURKHOLDER et al., 1953; DYE, 1969; SAMSON et al., 2005). Por ser de origem procariota, o uso prolongado dessa enzima pode causar serios efeitos colaterais, como hipersensibilidade, anafilaxia, problemas no fígado, pâncreas entre outros (AMENA et al., 2010). Estudos apontam que os micro-organismos eucarióticos podem produzir L-asparaginase com menores efeitos devido a semelhança nas estruturas celulares com as células humanas. (SARQUIS et al., 2004; LOREIRO et al., 2012).

Nagarajan et al. (2014) verificaram que os fungos endofíticos *Acremonium* sp., *Curvularia lunata* e *Fusarium* sp., isolados de plantas na Índia, produziam L-asparaginase. No Brasil, estudos verificaram a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos (LOREIRO et al., 2012; SANTOS et al., 2015) e atualmente, existem poucos registros sobre a produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de plantas da Caatinga (SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2018; PÁDUA et al., 2018).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CAATINGA

A floresta tropical seca, no Brasil conhecida como Caatinga, apresenta características marcantes, clima semiárido semelhante a um deserto, que abriga em sua composição várias espécies endêmicas (LEAL et al., 2005). A Caatinga é o único bioma predominantemente brasileiro e também considerado o maior e mais importante da região Nordeste do Brasil. Possui uma extensão territorial de aproximadamente 850.000 km<sup>2</sup>, ocupando parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte do estado de Minas Gerais (ALVES et al., 2009; CARLIXTO JUNIOR; DRUMOND, 2014). Sua área territorial é limitada a leste pela Floresta Atlântica, a oeste pela Floresta Amazônica e ao Sul, pelo Cerrado (LEAL et al., 2005; MMA, s.d.).

A palavra Caatinga é de origem Tupi-Guarani e significa “mata branca”, em decorrência do aspecto esbranquiçado que a vegetação apresenta durante o período seco, momento em que a maioria das plantas perde suas folhas e os troncos tornam-se secos e esbranquiçados (PRADO, 2003; DRUMOND et al., 2012).

A diversidade da comunidade vegetal é caracterizada por uma série de combinações entre variações microclimáticas e tipos edáficos, com dominância de uma vegetação arbustiva ou arbórea, apresentando diversos arbustos e árvores de pequeno porte, muitos dos quais apresentam microfilia, espinhos e características xerofíticas adaptadas para o déficit hídrico (PRADO, 2003; BARROS, 2003; LEAL et al., 2005).

O bioma Caatinga destaca-se por apresentar características extremas: resiste a mais alta radiação solar e temperatura média anual, possui baixa nebulosidade, baixas taxas de umidade relativa, elevada evapotranspiração e principalmente precipitações baixas e irregulares (PRADO, 2003). Apresenta clima quente, do tipo Bsh (semiárido), e a precipitação média anual varia de 240 a 1500 mm (MMA, s.d.). Cerca de 50% da região recebe menos de 750 mm de chuva, e outras áreas menos de 500 mm. As chuvas na Caatinga se concentram em três meses consecutivos, sendo o período de estação seca muito variável entre as diversas áreas do bioma (VELLOSO et al., 2002; PRADO, 2003). O total de chuva varia muito entre os anos,

em intervalos de 10-20 anos chegam a menos da metade da média (VELLOSO et al., 2002). A temperatura média anual varia de 20 a 28°C, diminuindo em altitudes acima de 500m nas chapadas e serras (MARACAJÁ; BENEVIDES, 2006; ALVES et al., 2009).

As bacias hidrográficas na Caatinga apresentam regime sazonal e intermitente, reflexo da escassez e irregularidade das chuvas e da alta taxa de evaporação hídrica, no entanto, estas características não se aplicam a todos os rios da Caatinga, tendo em vista, que os rios São Francisco e Parnaíba são perenes (ROSA et al., 2003).

A região da Caatinga possui riqueza de fauna e flora, além de inúmeras espécies endêmicas (ALVES et al., 2009). O percentual de endemismo varia de 7 a 57% entre peixes, anfíbios, répteis, aves, mamíferos e plantas vasculares (LEAL et al., 2005). Além disso, a Caatinga é apontada como um bioma rico em recursos genéticos, dado a sua alta biodiversidade quando comparada a outras regiões semiáridas no mundo (PEREIRA JUNIOR et al., 2012).

Apesar de sua composição estar bastante alterada, devido, sobretudo a ação antrópica, a Caatinga possui ainda alta variedade de tipos de vegetação, grande número de espécies, incluindo táxons raros e endêmicos, entre eles, 178 espécies de mamíferos, 177 de répteis, 591 de aves, 79 de anfíbios, 221 de abelhas e 241 de peixes (GIULIETTI et al., 2004; MMA, s.d.).

Considerada a região semiárida mais povoada do mundo, a Caatinga é ocupada por cerca de 27 milhões de habitantes, em sua maioria carente, que utilizam os recursos naturais para a sua sobrevivência (HAUFF, 2010). A economia da região é sustentada pelas atividades realizadas com finalidades agrosilvopastoris e industriais, em especial nos ramos farmacêutico, químico, cosméticos e alimentos (MMA, s.d.). Atividades não sustentáveis resultantes da ação do homem, como agricultura de corte e queima, caça de animais, corte de madeira para lenha e a remoção contínua da vegetação para criação de pastos e animais, tem aumentado em larga escala, a degradação ambiental da Caatinga (LEAL et al., 2005; GARDA et al., 2018).

O uso insustentável dos recursos naturais desse bioma tem ocasionado a perda de espécies endêmicas, a formação de núcleos de desertificação e a modificação de processos ecológicos, elevando a necessidade de estratégias de conservação da Caatinga (LEAL et al., 2007). No país, 62% das áreas que são

susceptíveis à desertificação estão localizadas na Caatinga (MMA, s.d.). Esse bioma brasileiro é considerado um dos mais degradados, estima-se que 45,3% de sua área total esteja modificada, e 52% sofre com problemas de degradação, colocando-o como o terceiro bioma mais alterado do Brasil, sendo superado apenas pelo Cerrado e a Mata Atlântica (AGEITEC, 2017).

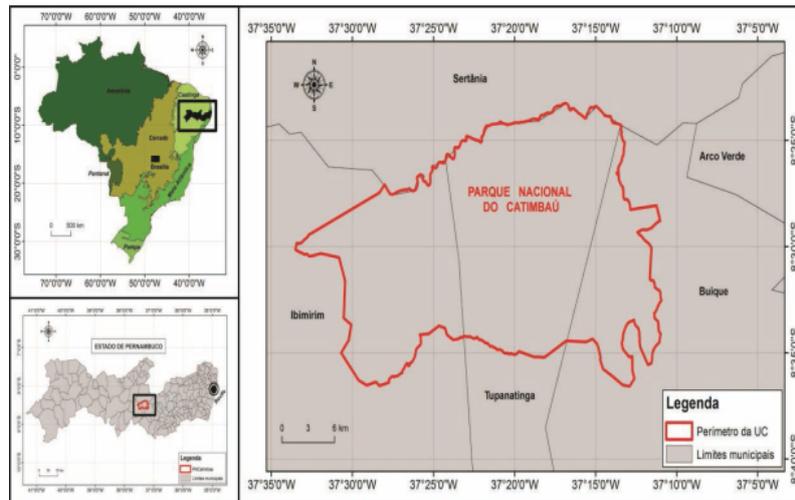
Devido à situação crítica em que se apresenta o bioma Caatinga, os mais diversos setores governamentais e não governamentais estão em estado de alerta em relação a degradação causada pela ação antrópica (VELLOSO et al., 2002; TABARELLI et al., 2018). Apenas 8,4% de sua região é protegida por unidades de conservação estaduais e federais, 3,9% deste percentual, distribuídos em 23 unidades, correspondem as unidades de conservação federal (HAUFF, 2010; ICMBIO, 2017). Este bioma possui 47 unidades de conservação (LEAL et al., 2005), entre estas, o Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau).

### **2.1.1 Parque Nacional do Vale do Catimbau**

O Parque Nacional do Vale do Catimbau (PARNA DO CATIMBAU) foi criado através do Decreto 913/12 de 2002 e corresponde a uma das áreas de relevante importância na Caatinga (ROCHA et al., 2010). É uma Unidade de Conservação de Proteção Integral, sendo considerada uma área de extrema relevância biológica (MMA, 2002), por apresentar ambientes com vários tipos de vegetações e uma fauna e flora bastante peculiar (PEREIRA et al., 2009).

O nome Catimbau foi derivado da serra do Catimbau, a qual está localizada no distrito do Catimbau, em Buíque (VASCONCELOS; MELO, 2016). O Parque possui uma extensão de 62.300 km<sup>2</sup>, e ocupa parte dos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga, no estado de Pernambuco (Figura 2), localizado numa região popularmente conhecida como Sertão do Moxotó (MELO, 2012). Sua criação teve por objetivo a preservação e conservação dos ecossistemas naturais, o que possibilita a realização de atividades de educação ambiental, turismo ecológico e pesquisas científicas (MMA, 2002; IBAMA, 2017).

**Figura 1.** Localização do Parque Nacional do Vale do Catimbau (PNC), Pernambuco, Brasil.



Fonte: Melo (2012).

A região do Parque caracteriza-se por apresentar solo pobre, altitude elevada variando entre 800 a 1.000 m, flora e fauna bastante exóticas, com presença de espécies endêmicas (CARVALHO et al., 2007). Apresenta clima predominantemente semiárido e precipitação média anual oscilando entre 650 a 1.100 mm, sendo o período de setembro a janeiro considerado o de menor precipitação, com temperatura média anual variando em torno de 23 °C (MACHADO et al., 2013).

A vegetação do Parque Nacional do Catimbau é composta por arbustos, árvores perenifólias e uma camada subarbusciva densa (SILVA et al., 2007). O Parque possui ainda espécies com ampla distribuição, pertencentes não só a Caatinga, mas também ao Cerrado, a Restinga e ao Campo rupestre. Apresenta vegetação diversificada, com diversas famílias como Cactaceae, Apocynaceae, Bromeliaceae, entre outras (RODAL et al., 1998). Cerca de 56 espécies de plantas exclusivas da Caatinga são encontradas no Parque, entre elas merece destaque a *Mandevilla catimbauensis*, uma espécie de planta rara pertencente à família Apocynaceae, que se sobressai por ser endêmica e enquadrar-se na categoria vulnerável à extinção (SOUZA-SILVA et al., 2010).

## 2.2 FAMÍLIA APOCYNACEAE (gênero *Mandevilla*)

A família Apocynaceae é considerada uma das mais representativas do grupo das Angiospermas (MOROKAWA et al., 2013). Estima-se que existam cerca de 375 gêneros e 5.000 espécies pertencentes à família Apocynaceae, com distribuição pantropical e algumas espécies em regiões temperadas (ENDRESS, 2004). No território brasileiro, é possível encontrar aproximadamente 85 gêneros e 950 espécies, com ocorrência de 127 endêmicas para o bioma Caatinga (JUDD et al., 2009).

As Apocynaceae são caracterizadas pela presença de laticíferos e látex geralmente leitoso. Possuem folhas opostas, no entanto, por vezes espiraladas, coletéres comumente presentes na base do pecíolo. Flores frequentemente radiais e frutos expondo-se com frequência aos pares (JUDD et al., 2009). Além disso, apresentam mecanismos de apresentação secundária de pólen, o que aumenta a complexidade floral e o nível de especialização dos agentes polinizadores. A polinização nesta família é realizada por vários insetos, principalmente himenópteros, lepidópteros e dípteros (ALVINO et al., 2007).

O gênero *Mandevilla* Lindley. compreende cerca de 150 espécies (LEEUEWENBERG, 1994), sendo a maior parte com ocorrência em florestas secas e úmidas (WOODSON, 1933). É considerado o maior gênero neotropical da família Apocynaceae e teve sua descrição ampliada com a inclusão dos gêneros *Macrosiphonia* Müll.Arg., *Quiotania* Zaruqui e *Telosiphonia* (Woodson) Herinckson como sinônimos (SIMÕES et al., 2007).

No Brasil, foram reconhecidas 40 espécies pertencentes ao gênero *Mandevilla*, incluindo oito novidades taxonômicas (SALES et al., 2006; SOUZA-SILVA et al., 2010). Uma pesquisa realizada na região do semiárido brasileiro sobre a família Apocynaceae incluiu 29 espécies nativas, destas, sete são endêmicas (SOUZA-SILVA et al., 2010). As espécies desse gênero apresentam grande importância medicinal, devido à capacidade de produzir compostos químicos secundários, e por isso estão sendo bastante utilizadas na medicina moderna (DI STASI; HIMURA-LIMA, 2002).

### 2.2.1 *Mandevilla catimbauensis*

A espécie *Mandevilla catimbauensis* foi descrita por Souza-Silva et al. (2010) em uma pesquisa sobre a família Apocynaceae realizada na região semi-árida brasileira. Essa espécie é uma planta endêmica do Parque Nacional do Catimbau, Serra de Jerusalém (8° 24' 00" e 8°36'35" S, 37° 09'30' e 37° 14'40' O).

Caracteriza-se por apresentar um entrelaçamento elíptico, folhas glabras, coriáceas e flores roxas, entre outras características (Figura 3). Através da observação dessas particularidades sua identificação torna-se mais fácil (SOUZA-SILVA et al., 2010).

**Figura 2.** *Mandevilla catimbaunesis* no Parque Nacional do Vale do Catimbau.



**Fonte:** Acervo próprio

Considerando ser a descoberta da *Mandevilla catimbauensis* relativamente recente, não existem outros estudos acerca da mesma, que pudessem expandir o conhecimento a respeito da espécie ou ainda indicar características como produção de metabólitos secundários, potencial medicinal, tampouco a presença de micro-organismos endofíticos. Neste sentido, é impossível realizar neste momento uma descrição mais detalhada da espécie.

## 2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo “Endófito” derivado do grego e utilizado por De Bary (1866) no século XIX, agrupava organismos que viviam dentro das plantas, ‘endo’ significa dentro e ‘phyte’ significa planta (JALGAONWALA et al., 2011). Esse conceito inicialmente foi muito abrangente e incluía, além de fungos, bactérias, vírus, protistas e invertebrados que viviam dentro de vegetais (LÉVEILLÉ, 1846; WILSON, 1995). Segundo Petrini (1991), os endófitos habitam o interior dos vegetais, colonizam os tecidos saudáveis de raízes, caules, ramos, folhas e frutos, sem causar-lhes danos aparentes, nem produzindo estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000; JOHRI, 2006).

Os micro-organismos endofíticos são estudados por um ramo da ciência denominado endofitologia (UNTERSEHER et al., 2012). Esses micro-organismos vivem de maneira simbiótica com o vegetal em forma de micélio (no caso dos fungos). Assim, para se denominar fungo endofítico deve haver presença das hifas no tecido vivo (KAUL et al., 2012).

É importante observar a diferença entre micro-organismo endofítico, epifítico (vivem na superfície de plantas) e fitopatógeno (causam doenças em plantas), pois muitas vezes, essa situação vai depender do estágio de interação do micro-organismo com o hospedeiro (STROBEL et al., 2004; PATIL et al., 2015). Estudos relacionam os fungos endofíticos com diversos tipos de vegetais como, por exemplo, plantas de florestas tropicais (STROBEL, 2002), plantas herbáceas (TAECHOWISAN et al., 2003), plantas medicinais (HUANG et al., 2001), plantas cultivadas (MELNROY; KLOPPER, 1995), plantas aquáticas (CHEN et al., 2003) e plantas de ambientes semiárido (BEZERRA et al., 2012; 2017; SILVA et al., 2018).

A região geográfica pode interferir nos padrões de distribuição dos fungos endofíticos e essa interferência pode ser influenciada por características ecológicas, incluindo a composição botânica e as condições climatológicas (COLLADO et al., 1999; SUN et al., 2012). De acordo com Hoffman e Arnold (2008), os micro-organismos endofíticos de plantas de áreas desérticas podem sofrer forte seleção para atuar como generalistas e destacam que o benefício de colonizar o hospedeiro supera o custo da exposição prolongada ao calor intenso, radiação ultravioleta e dessecação.

A propagação dos endófitos pode ocorrer de maneira vertical, quando penetram no vegetal através das sementes ou pela raiz, e horizontal, quando entram através dos estômatos ou diretamente na parede celular utilizando estruturas de fixação e absorção, como os apressórios e haustórios (SAIKKONEM et al., 2004). A colonização de micro-organismos endofíticos ocorre em qualquer tecido ou órgão do vegetal, por via intracelular e limitada a poucas células, intercelular e localizada ou ainda inter e intracelular sistêmica (MARINHO et al., 2007).

Geralmente são obtidos inúmeros isolados de um único vegetal e a partir deste único hospedeiro, pelo menos uma espécie apresenta-se como específica, confirmando o fato que os endofíticos são um componente importante da diversidade microbiana (TAN; ZOU, 2001; STROBEL; DAYSE, 2003). Para realizar a identificação dos endófitos é necessário seu isolamento em meios de cultura específicos, observação das estruturas macroscópicas e microscópicas, através da utilização de técnicas de microscopia ótica, além disso, também pode ser realizada uma detecção através de técnicas diretas de biologia molecular através da amplificação de DNA (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Pesquisas sobre fungos endofíticos de plantas de regiões secas e desérticas, destacaram o isolamento de espécies pigmentadas como as do gênero *Cladosporium*, *Alternaria* e *Phoma* (SURYANARAYANAN et al., 2005; SUN et al., 2012). Os fungos pigmentados armazenam melanina na parede das suas células e esse acúmulo pode ser considerado como um mecanismo que lhes proporciona tolerância a estresses ambientais, tais como, radiação UV, resposta a defesa de plantas hospedeiras e animais contra a infecção fúngica (JACOBSON et al., 1995; KAWAMURA et al., 1997; REDMAN et al., 2002). Entretanto, a pesquisa realizada por Kawamura et al. (1997) indica que o acúmulo de melanina em algumas espécies de fungos, tais como *Alternaria alternata* e *Magnaporthe grisea*, pode ser um indício para a patogenicidade.

Estudos apontam os fungos endofíticos como responsáveis pela produção de compostos bioativos, o que torna a utilização desses micro-organismos em processos biotecnológicos fundamentais (SPECIAN et al., 2015). Alguns compostos secundários, tais como alcaloides, terpenos, esteroides e compostos aromáticos, já foram descritos na literatura como sendo produzidos por fungos endofíticos, e conferem ao vegetal, proteção contra predadores, como ataques de herbívoros, além disso, algumas espécies já foram relatadas como produtoras de micotoxinas

(*Fusarium* e *Aspergillus*) (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011; SANTOS et al., 2015; SWETT et al., 2015).

A produção de metabólitos secundários na natureza por micro-organismos endofíticos sofre influência de diversos fatores. O bioma no qual se encontram inseridos, pode influenciar as vias biogênicas da produção de metabólitos secundários (SCHULZ et al., 2002).

Segundo Strobel e Daisy (2003), os micro-organismos endofíticos são potenciais fontes de produção de antibióticos, e foram observados na inibição ou na eliminação de agentes causadores de doenças como bactérias, vírus, fungos e protozoários que acometem humanos e animais. Além disso, esses micro-organismos são extremamente importantes na realização de processos de biotransformações (ADRIO; DEMAIN, 2003).

De maneira geral, os micro-organismos, incluindo os fungos endofíticos, constituem uma valiosa fonte de substâncias de aplicação em diversas áreas. São utilizados na produção de antibióticos, antitumorais, imunossuppressores, antiparasitários, vitaminas, pigmentos e enzimas (ADRIO, 2003; GUNATILAKA, 2006). Além disso, os estudos sobre fungos endofíticos são indispensáveis para fornecer informações fundamentais para a avaliação da diversidade fúngica global e de distribuição, bem como para a descoberta de novas espécies que podem ser promissoras para estudos biotecnológicos (STONE et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2008).

### **2.3.1 Importância ambiental e biotecnológica dos fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos desempenham, através da interação com seus hospedeiros, importantes funções para saúde dos vegetais, como por exemplo, atuam no controle de fitopatógenos, protegem as plantas de insetos herbívoros, tornando-as mais resistentes a nematóides e outros animais (PEIXOTO NETO et al., 2002; KAUL et al., 2012; NUR, 2016).

Existem estudos relacionados com a química dos endófitos, no entanto, ainda são escassos, quando se observa a grande diversidade fúngica e a sua

especificidade na colonização de seus hospedeiros. O conhecimento das relações entre planta e micro-organismo, além de contribuir para a compreensão de processos químicos na ecologia, pode resultar na criação de novas fontes de substâncias de interesse industrial (SANTOS et al., 2008; PANSA et al., 2013; PIRES et al., 2015). Fungos endofíticos são potenciais fontes de bioprodutos que podem ser explorados na indústria, agricultura e medicina, além disso, apresentam enorme potencial de produzir substâncias bioativas (STROBEL; DAISY, 2003; CHAPLA et al., 2013).

Pesquisas verificaram o potencial de fungos endofíticos no favorecimento do crescimento de plantas (HANADA et al., 2010; KHAN et al., 2012; WAQAS et al., 2012). Estes, podem proporcionar um melhor desenvolvimento e crescimento mais acelerado das plantas através de mecanismos, embora não totalmente desvendados, mas evidenciados, pela produção de fitohormônios (PEIXOTO NETO et al., 2002, KAUL et al., 2012). Luz et al. (2006) observaram que fungos endofíticos promoveram o crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo e Silva et al. (2006), verificaram o potencial de fungos endofíticos em proporcionar o crescimento de mudas de pinha. No estudo de Hwang et al. (2011), o endófito *Penicillium citrinum* influenciou, no crescimento da planta *Carex kobomugi* de forma bem expressiva.

Alguns fungos apresentam atividade antagonista e podem ser utilizados como agentes no biocontrole (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, podem melhorar a resistência das plantas às adversidades ambientais (CLAY, 1988; WOLOCK-MADEJ; CLAY, 1991), promover uma maior resistência a doenças (CHEN et al., 1994), aumentar a fixação de nitrogênio, melhorar a capacidade do hospedeiro em explorar habitats extremos como regiões quentes e secas, de pouca luz e baixa fertilidade do solo (TEIXEIRA et al., 2007).

Num estudo sobre fungos endofíticos isolados da planta *Baccharis dracunculifolia*, Esteves et al. (2007) observaram que a riqueza desses micro-organismos foi inversamente proporcional a riqueza de herbívoros na planta, e concluíram posteriormente, que alguns fungos poderiam estar produzindo toxinas, e que a ocorrência desse fato, evidencia a importância dos endófitos na defesa de determinados hospedeiros. As plantas, por sua vez, oferecem aos endófitos nutrientes e estrutura espacial, (FAETH; FAGAN, 2002), e até precursores para síntese de metabólitos (CLAY; SCHARDL, 2002).

Os fungos endofíticos são potenciais produtores de substâncias (metabólitos primários e secundários) de importância biotecnológica, considerados produtos naturais de utilidades medicinal, agrícola, industrial e farmacêutico. (SOUZA et al., 2004; CHAPLA et al., 2013). Esses produtos naturais produzidos pelos fungos endofíticos, podem agir como antibióticos que inibem ou causam a morte de patógenos como bactérias, vírus, protozoários e até mesmo fungos que causam doenças ao homem e animais (STROBEL; DAYSI, 2003).

Brakhage e Schroeckh (2010) avaliaram a grande diversidade de compostos bioativos produzidos por micro-organismos e concluíram que as linhagens mais produtoras pertenciam principalmente ao Reino Fungi. Pesquisa com fungos endofíticos, Pires et al. (2015) verificaram o potencial antibacteriano de fungos isolados de plantas da Caatinga, e observaram que dos 60 endófitos testados, 21 apresentaram atividade antagônica contra bactérias causadoras de doenças ao homem.

Estudos relatam também os fungos endofíticos como produtores de enzimas de grande importância industrial (BEZERRA et al., 2012; CHANDRA, 2012; BEZERRA et al., 2015). A capacidade de produzir enzimas extracelulares por fungos endofíticos foi verificada no estudo de Cuzzi et al. (2011). Bezerra et al. (2012), verificaram o potencial de produção de enzimas por isolados de *Opuntia ficus-indica*, e relataram a capacidade desses fungos em produzir as enzimas celulase, pectinase, protease e xilanase. Em outro estudo, Bezerra et al. (2015), também constataram produção de celulase, protease, xilanase e lipase por fungos isolados da planta *Bauhinia forficata*. Enquanto que, Bischoff et al. (2009), verificaram elevada atividade enzimática de xilanase no endófito *Acremonium zeae*.

A relação dos fungos endofíticos com as plantas hospedeiras e consequentemente a produção de enzimas, desperta um interesse por parte das indústrias para sua utilização na produção de alimentos, bebidas, medicamentos, detergentes, indústria têxtil e de couro (WENZEL et al., 2013). Em estudos com biorremediação, Moura et al. (2015), avaliaram o potencial de fungos endofíticos de folhas de amoreira (*Morus nigra*) na biorremediação de corante têxtil e relataram que os isolados testados possuem capacidade de degradar corante têxtil, sugerindo os fungos endofíticos como uma alternativa para o tratamento destes poluentes.

Diversos produtos naturais obtidos de fungos endofíticos podem se tornar fármacos inovadores contra muitas doenças (JIANG; AN, 2000). O taxol é um

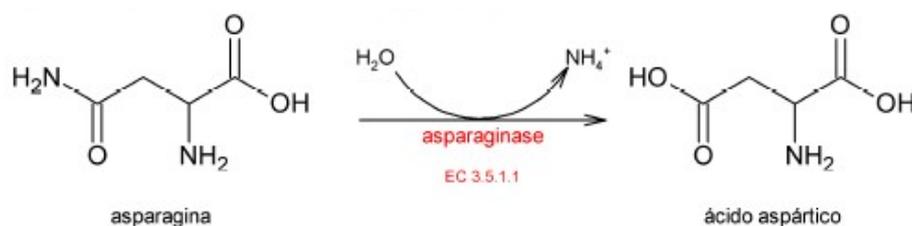
poderoso anticancerígeno, isolado inicialmente do endófito *Taxomyces andreanae*, associado à planta *Taxus brevifolia* e utilizado no combate a diversos tipos de câncer (STIERLE et al., 1993). Os fungos endofíticos também têm sido relatados como produtores da enzima L-asparaginase (KALYANASUNDARAM et al., 2015; THEANTANA et al., 2007; 2009). Silva et al. (2018) estudaram não só a riqueza dos dos fungos endofíticos de *Tillandsia catimbauensis*, planta endêmica da Caatinga, como também o potencial biotecnológico desses fungos para produzir a enzima L-asparaginase.

## 2.4 A ENZIMA L-ASPARAGINASE

As enzimas são proteínas biologicamente sintetizadas, algumas vezes, usadas como medicamentos, que otimizam uma determinada reação de forma eficiente e específica em um determinado substrato (AVRAMIS; TIWARI, 2006).

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase E.C. 3.5.1.1) é uma enzima utilizada como catalisador na reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia (Figura 1) (THEANTANA et al., 2009). Pode ser produzida por animais, plantas e micro-organismos, no entanto, os micro-organismos são considerados as melhores fontes de produção desta enzima. (KUMAR et al., 2013)

**Figura 3.** Reação química catalisada pela enzima L-Asparaginase.



Fonte: Roth (2011).

As enzimas originadas a partir de micro-organismos são consideradas as fontes enzimáticas mais promissoras para as indústrias, uma vez que, em curto prazo, podem ser produzidas em grandes proporções, possuem tempos de gerações

reduzidos e o processo de manipulação genética pode ser mais facilmente realizado. O setor industrial busca novas fontes microbianas para produção de diferentes enzimas que atendam as exigências de permanecerem ativas, estáveis e ausentes de toxicidade (ANBU et al., 2015).

A L-asparaginase possui grande aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia (CACHUMBA et al., 2016). Além disso, possui utilidades clínicas na medicina veterinária e pode ser utilizada também como biossensores em diagnósticos (BATOOL et al., 2016; SCHLEIS et al., 2011).

### **2.4.1 Importância da L-asparaginase para a indústria farmacêutica**

A L-asparaginase foi descoberta em 1953 como droga antitumoral e introduzida na década de 1960 em atendimento clínico (KIDD, 1953; MALONEY et al., 2010). No tratamento quimioterápico, a enzima age na remoção da L-asparagina do sangue, privando as células tumorais, controlando, assim, o crescimento do tumor de forma eficaz, uma vez que é um aminoácido essencial para proliferação de células malignas (CHOW; TING, 2014).

Os mais importantes compostos antitumorais usados no tratamento do câncer são produzidos microbiologicamente (DEMAIN, 1999; MORAIS et al., 2014; SPECIAN et al., 2014). A L-asparaginase é utilizada como agente anticancerígeno para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (VERNA et al., 2007) e também é aplicada no tratamento da leucemia linfocítica crônica, leucemia mielocítica aguda, doença de Hodgkin, melanossarcoma, reticulossarcoma e tratamento linfossarcoma (LOUREIRO, 2010; DEVI; AZMI, 2012).

Através da enzima L-asparagina sintetase o aminoácido L-asparagina pode ser produzido no interior das células, e pode também ser absorvido externamente (corpo disponibiliza as suas células). As células cancerígenas necessitam de grandes quantidades de asparagina para atender o seu rápido crescimento (TRIVEDI; PADALIA, 2016), essas células são deficientes na produção de aminoácidos, logo, necessitam de associação extracelular para sintetizar proteínas. O mecanismo de ação da enzima L-asparaginase leva a perda de asparagina extracelular, o que inibe a síntese de proteínas, acarretando a morte das células neoplásicas (KEATING et al., 1993; GUILLEME et al., 2013). As células saudáveis

não são atingidas, pois produzem asparagina através da L-asparagina sintetase presente em quantidades suficientes (NARTA et al., 2007).

Existem duas fontes clínicas conhecidas de L-asparaginase de origem bacteriana, *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, conhecida também por *Pectobacterium chrysanthemi*, *Dickeya chrysanthemi* e *Erwinia caratovora* (BURKHOLDER et al., 1953; DYE, 1969; SAMSON et al., 2005), ambas dão origem aos três tipos de asparaginases que são usadas para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), duas derivadas de *E. coli*, asparaginase peguilado (polietilenoglicol [PEG] - asparaginase: Oncaspar; Sigma-Tau Pharmaceuticals) e asparaginase nativa (asparaginase de *E. coli*: Kidrolase; EUSA Pharma Oxford; Reino Unido; Elspar; Ovation Pharmaceuticals; Deerfield; Illinois; Crasnitin; Bayer AG; Leverkusen; Alemanha; Leunase; Sanofi-Aventis; Paris; França; Asparaginase Medac; Kyowa Hakko; Tóquio; Japão), e uma derivada de *Erwinia chrysanthemi* a Erwinia asparaginase (Erwinase; EUSA Pharma; Oxford; Reino Unido) ou crisantaspase (DUVAL et al., 2002; PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013).

Uma quarta preparação de *E. coli* asparaginase recombinante foi desenvolvida, essa foi projetada para ter a mesma sequência de aminoácidos de Asparaginase Medac, com dados iniciais baseados num perfil de eficiência e toxicidade comparável aqueles das outras asparaginases de *E. coli* (PIETERS et al., 2011). Além disso, uma asparaginase encapsulada em glóbulos vermelhos tem sido proposta como uma nova abordagem para manter a atividade enzimática, enquanto reduz a formação de anticorpos anti-asparaginase (BACHET et al., 2015). Estudo pré-clínico de uma forma peguilada de Erwinia asparaginase recombinante está em desenvolvimento (PIETERS et al., 2011).

Apesar da produção dessa enzima vir de fonte procariota e possuir mecanismos de ação e efeitos tóxicos semelhantes, as propriedades farmacocinéticas são diferentes, podendo gerar resistência em diferentes tipos de pacientes (NARTA et al., 2007).

Assim, com a administração prolongada da L-asparaginase, alguns anticorpos são produzidos no corpo, provocando efeitos como choque anafilático ou neutralização da eficácia do fármaco (AMENA et al., 2010). Outros efeitos adversos já relatados da L-asparaginase são pancreatite, hipercoagulabilidade, disfunção hepática, diabetes, leucopenia, reações alérgicas e hipersensibilidade, este último, é o mais frequentemente relatado (DEANGELO et al., 2015; SHRIVASTAVA, et al.

2016; MARINHO et al., 2017). Por isso, há uma necessidade por parte dos pesquisadores de encontrar novas fontes que produzam L-asparaginase com menores efeitos colaterais, rendimento elevado e baixo custo (AMENA et al., 2010). Estudos apontam que os micro-organismos eucarióticos podem produzir L-asparaginase com menores efeitos adversos (SARQUIS et al., 2004; LOUREIRO et al., 2012).

A L-asparaginase é vendida comercialmente no Brasil sob o nome de Elspar® da Merck, originada a partir de *E. coli*, e Erwinase da Speywood®. As duas possuem o mesmo mecanismo de ação e toxicidade, diferindo nas propriedades farmacocinéticas. Quando utilizadas por longo prazo, podem causar hipersensibilidade, levando a reações alérgicas e até anafilaxia (DUVAL et al., 2002; VERNA et al., 2007).

Em 2010, o fármaco teve a fabricação suspensa no Brasil e, segundo os médicos, a falta dele comprometeu o tratamento de muitos pacientes, já que o seu uso é importante nas primeiras quatro semanas de tratamento. Nesse mesmo ano, o Governo Federal recorreu à importação do medicamento, onde cada caixa contendo um frasco-ampola (10 mL) custava aproximadamente U\$100,00. A fabricação foi reestabelecida e em 2012, o Ministério da Saúde investiu aproximadamente R\$ 17 mil para compra deste medicamento (PORTAL DA TRANSPARÊNCIA, 2012). Atualmente no Brasil, nenhuma indústria de medicamentos possui o registro e o certificado de Boas Práticas de Fabricação para a produção de L-asparaginase (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Devido ao potencial de sua aplicação no tratamento do câncer, a demanda por L-asparaginase tende a aumentar. Deste modo, é indispensável buscar outras fontes de produção desta enzima com intuito de aumentar a disponibilidade do medicamento à população e diminuir os diversos efeitos colaterais ocasionados pela utilização dessa substância quando administrada por longos períodos (PEDRESCHI et al., 2008).

### 2.4.1.1 Importância da L-asparaginase como fármaco para medicina veterinária

Na medicina veterinária o uso de L-asparaginase na quimioterapia de animais domésticos é bastante comum. Ela é indicada para o tratamento de caninos e felinos com leucemias linfoides e linfossarcomas, e sua administração geralmente é associada a outros fármacos, como corticosteroides e alcaloides (SCHLEIS et al., 2011).

O diagnóstico preciso é realizado através amostras citológicas obtidas por Punção Aspirativa com Agulha Fina (PAAF) e/ou de exames histopatológicos de tecidos biopsiados, no entanto, para um diagnóstico mais preciso e de melhor compreensão a respeito do comportamento biológico tumoral, recomenda-se a utilização de técnicas moleculares (DICKINSON, 2008).

A toxicidade devido ao uso contínuo da L-asparaginase mais comumente vista em pacientes veterinários é uma reação de hipersensibilidade, embora possa aparecer outros efeitos colaterais. Os animais afetados geralmente apresentam vômito, diarreia, urticária, edema, prurido, dispneia, agitação, hipotensão, e raramente colapso (CHUN et al., 2007).

### 2.4.2 Importância para a indústria alimentícia

A procura pela enzima L-asparaginase na indústria alimentícia tende a aumentar, pois seu uso ajuda a reduzir os níveis de acrilamida dos alimentos termicamente processados (KUMAR et al., 2013). A acrilamida é uma substância química considerada potencialmente cancerígena e neurotóxica para os seres humanos, havendo casos de sintomas como formigamento nos pés e nas mãos e até paralisia (HENDRIKSEN et al., 2005; KUMAR et al., 2014). Esta substância pode estar presente em elevadas concentrações em alimentos fritos e cozidos, particularmente nos enriquecidos em carboidratos. Por ser um composto químico presente em alimentos populares e de alto consumo, se faz necessário um monitoramento e controle (ZUO et al., 2015).

A ação carcinogênica da acrilamida atinge os seres humanos e também os animais. Estes podem ser vítimas através de suas rações, que podem conter acrilamida e aminas heterocíclicas, ambos compostos carcinogênicos, formados a partir do processamento comercial de rações animais (AYVAZ et al., 2015; SILVA, 2015).

O processo de formação de acrilamida é atribuído a temperaturas elevadas, resultado das reações de Maillard, que por sua vez, são essenciais para produção de sabor, cor e aroma desejável. Os elementos básicos para a reação de Mailard são os açúcares redutores como frutose e glicose, e os aminoácidos, como a asparagina, no caso da batata (PEDRESCHI et al., 2008).

Segundo Hendriksen et al. (2009), o emprego da enzima L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, E.C. 3.5.1.1) viabiliza uma possibilidade para redução de acrilamida nos alimentos. Existem vários produtos como pães, batatas fritas, biscoitos, cereais e café, nos quais, a formação de acrilamida pode ser reduzida pela utilização da enzima L-asparaginase (KORNBRUST et al., 2010). A L-asparaginase é capaz de reduzir por hidrólise o nível de asparagina livre, sem prejudicar os outros aminoácidos, de forma, a remover um dos precursores essenciais para formação de acrilamida, limitando assim, o impacto nas características finais dos alimentos (HENDRIKSEN et al., 2009).

Atualmente são comercializados dois produtos utilizados para reduzir o nível de acrilamida nos alimentos, o Acrylaway® da Novozymes A/S e o PreventASe™ da DSM, ambos produzidos a partir dos fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, respectivamente (KRISHNAKUMAR; VISVANATHAN, 2014; XU et al., 2016). O Acrylaway® é um produto líquido que age reduzindo a formação de acrilamida em diversos alimentos como biscoito, batata-frita, cereais e café (NOVOZYMES, 2013), e o PreventASe™ atua diminuindo em até 90% a formação de acrilamida em pães, sem influenciar no sabor e textura, convertendo a asparagina em ácido aspártico (DSM, 2018).

Em uma pesquisa realizada sobre a eficiência da L-asparaginase na diminuição da formação de acrilamida para um produto de batata, Zyzak et al. (2003) observaram que um pré-tratamento com a enzima reduziu quase 100% a formação de acrilamida e comprovaram que a via principal para formação desse composto está ligada ao aminoácido asparagina. Kumar et al. (2013), relataram que a L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp. reduziu a formação de acrilamida

durante o processo de fabricação de pães, não afetando suas propriedades físico-sensoriais.

### **2.4.3 Importância da L-asparaginase como biossensor**

O desenvolvimento de biossensores com a finalidade de analisar os níveis de asparagina em diagnóstico da leucemia, ou ainda, os elevados níveis desse aminoácido na indústria alimentar, é uma outra aplicação da L-asparaginase (VERMA et al., 2012).

Diversas técnicas de espectrometrias são utilizadas para detecção dessa enzima, no entanto, a maioria possui um custo elevado, o que torna menos favorável sua utilização (BATOOL et al., 2016). Alguns estudos têm testado o uso de biossensores na detecção de asparagina por ser uma tecnologia rápida, de confiança e com um custo mais acessível, além de ser de fácil manuseio e capaz de identificar a asparagina tanto em amostras de alimentos, como em soro humano (KOTZIA; LABROU, 2011; VERMA et al., 2013).

### **2.4.4. Produção de L-asparaginase**

O sistema de produção enzimática é composto basicamente por duas etapas principais: a produção através da utilização de um micro-organismo e a purificação da proteína de interesse. Em geral, a produção enzimática é realizada, principalmente, por fermentação submersa (LOPES et al., 2017). Entretanto, em alguns casos, a fermentação em estado sólido também é aplicada, por envolver uma matriz sólida que pode ser uma fonte de nutrientes, todo o processo ser realizado na ausência de água, além do risco de contaminação ser reduzido (ABHA, 2006; CAVALCANTI et al., 2018).

A técnica mais utilizada para produção de L-asparaginase é a fermentação submersa, por seu meio de cultivo possuir características que favorecem um alto rendimento e qualidade. Nessa técnica, não há necessidade de um pré tratamento do substrato, os parâmetros do processo (pH, temperatura e etc.) são mais acessíveis, além de suportar a presença de micro-organismos geneticamente modificados e possuir o processo de purificação mais simples (SUBRAMANIYAM;

VIMALA, 2012). Entretanto, podem surgir algumas desvantagens como: maior gasto de energia (agitação/aeração), risco de contaminação, maior custo de produção, e muitas vezes, geração de resíduos difíceis de eliminar (VIMAL; KUMAR, 2017). Algumas pesquisas já utilizaram a fermentação em estado sólido para produção de L-asparaginase (SARQUIS et al., 2004; PATRO; GUPTA, 2012; THAKUR et al., 2013; KUMAR; MANONMANI, 2013; VARALAKSHMI; RAJU, 2013; BEDAIWY et al., 2016).

Durante a produção da enzima em escala industrial, diversos fatores devem ser cuidadosamente avaliados e considerados para obter como produto final, um composto de alto rendimento e viabilidade econômica. As principais variáveis a serem consideradas para produção da L-asparaginase por micro-organismos são: pH, temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, aeração, período de fermentação e principalmente o agente microbiano (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2011).

Diversos meios de cultura estão sendo estudados para a produção da L-asparaginase. A glicose representa a fonte de carbono mais utilizada, enquanto as fontes de nitrogênio podem ser consideradas, um dos fatores mais importantes e determinantes no meio (FARAG et al., 2015).

Algumas etapas realizadas posteriormente ao processo de produção são: centrifugação, filtração, cromatografia extração líquido-líquido e precipitação da proteína. Para o setor industrial, a purificação através da precipitação de proteínas pode ser uma técnica bastante interessante, por ser de baixo custo, ter alto rendimento e ter a possibilidade de poder reutilizar o precipitado. O agente precipitante pode ser recuperado ao final do processo, evitando com isso, um posterior dano ambiental (LOPES et al., 2017).

Logo após o processo de produção enzimática realizado pelo micro-organismo de interesse, é desempenhada a etapa de purificação da proteína. As etapas de extração e purificação são fundamentais na produção e são também as que geram maior custo ao processo. É necessário controle rigoroso durante todas as etapas, para que haja alto nível de pureza no produto final, uma vez que a enzima é produzida intracelularmente pela maioria dos micro-organismos, e no momento da extração as organelas e outras moléculas do interior do micro-organismo virão juntamente com a enzima, podendo ocasionar reações imunológicas aos pacientes (CACHUMBA et al., 2016).

Outra técnica de grande relevância no processo de produção enzimática é a purificação realizada por cromatografia. Essa técnica é utilizada para garantir o alto grau de pureza da enzima, e pode ser realizada através de troca iônica, exclusão molecular por tamanho e por afinidade (LOPES et al., 2017).

Tendo em vista à grande relevância da enzima L-asparaginase para algumas indústrias, novas estratégias de produção no setor farmacêutico e alimentício são necessárias para suprir a procura desta enzima. A busca alternativa por novas fontes de produção de L-asparaginase através de micro-organismos eucarióticos pode conduzir a descoberta de uma enzima com efeitos colaterais reduzidos (SARQUIS et al., 2004; LOUREIRO et al., 2012).

## 2.5 L-ASPARAGINASE PRODUZIDA POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

De maneira geral, os fungos possuem ampla aplicabilidade nas indústrias por produzirem inúmeros compostos como antibióticos, pesticidas, vitaminas, pigmentos, além de produzirem enzimas utilizadas na produção de bebidas, clarificação de sucos, produção de papel, biorremediação de ambientes contaminados, fabricação de medicamentos, entre outros (MACIEL et al., 2014; SILVA et. al., 2017; SILVA LISBOA et. al., 2017).

Diversos estudos vêm relatando a produção da enzima L-asparaginase por fungos endofíticos. Theantana et al. (2009), num estudo realizado com plantas medicinais da Tailândia, constataram que os principais gêneros produtores dessa enzima foram *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Eupenicillium* e *Tallaromyces*. Nagarajan et al. (2014), verificaram que diferentes fungos endofíticos isolados de plantas na Índia como *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. e *Torulomyces* sp. produziam L-asparaginase.

Estudando o potencial de produção de L-asparaginase de fungos endofíticos isolados de plantas com propriedades anticancerígenas, Chow e Ting (2014) relataram que 25 morfotipos produziram L-asparaginase, sendo 19 destes identificados como prováveis espécies do gênero *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phoma* e

*Penicillium*. Santos et al. (2015) observaram que as espécies de fungos endofíticos *Aspergillus flavus* (URM 6887), *A. japonicus* (URM 6872), *A. parasiticus* (URM 6868), *A. sydowii* (URM 6866), *Fusarium oxysporum* (URM 6815), *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* (URM 6816) e *Penicillium brevicompactum* (URM 6833) isolados de *Cereus jamacaru* produzem uma quantidade significativa da enzima. Silva et al. (2018), verificaram a produção da enzima por espécies de *Penicillium* e *Talaromyces*, e realizaram a otimização parcial da produção da L-asparaginase com a espécie mais promissora. Pádua et al. (2018), estudaram a diversidade de fungos endofíticos de uma planta medicinal da floresta tropical seca do Brasil e testaram a produção de L-asparaginase, o isolado do gênero *Diaporthe* apresentou melhor resultado quanto a produção enzimática.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico na produção da enzima L-asparaginase por fungos endofíticos isolados de *Mandevilla catimbauensis* do Parque Nacional do Vale do Catimbau e estimar a diversidade desses fungos.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar fungos endofíticos de tecidos sadios de *M. catimbauensis*;
- Verificar a taxa de colonização dos fragmentos da folha de *M. catimbauensis*;
- Identificar por taxonomia morfológica e molecular os fungos endofíticos;
- Realizar a análise filogenética da comunidade de fungos endofíticos;
- Estimar a frequência e diversidade de espécies de fungos endofíticos;
- Avaliar o potencial dos isolados endofíticos quanto a produção da enzima L-asparaginase através de fermentação submersa;
- Determinar as melhores condições de produção da L-asparaginase pelo endófito mais promissor.

## REFERÊNCIAS

- ABHA, M. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, 2006.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p.191-199, 2003.
- AGEITEC - AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA – AGEITEC. **Bioma Caatinga**. 2017. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma\\_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html)>. Acesso em: 7 jul. 2017.
- ALVES, J. J. A. et al. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 3, p. 126-135, jul./set. 2009.
- ALVINO, L. D. et al. Ecologia da polinização de *Mandevilla tenuifolia* (J. C. Mikan) Woodson uma Apocynaceae exclusivamente psicófila. CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: SEB, 2007.
- AMENA, S. et al. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 173-178, 2010.
- ANBU, P. et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- ASTHANA, S. N.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, v.2, p. 184-194, abr. 2003.
- AVRAMIS, V. I.; TIWARI, P. N. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 241-254, 2006.
- AYVAZ, H. RODRIGUEZ-SAONA, L. E. Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips. **Food Chemistry**, v. 174, p. 154-162, 2015.
- AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N; DESHMUKH, S. K. (eds.) **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007, p. 189-207.
- \_\_\_\_\_ et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BACHET, J. B. et al. Asparagine synthetase expression and phase I study with L-asparaginase encapsulated in red blood cells in patients with pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas**, v. 44, n. 7, 2015.
- BARROS, M. L. B. Prefácio. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M. ; SILVA, J. M. C (Eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: UFPE, 2003, p. 9-11.
- BATOOL, T. et al. Comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 900–923, 2016.

- BEDAIWY, M. Y. et al. Optimal conditions for production of L-asparaginase from *Aspergillus tamarii*. **The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)**, v.12, n. 2, p. 229–237. 2016.
- BEZERRA, J. D. P. et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 49-57. 2015.
- \_\_\_\_\_. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, p.53–63, 2013.
- \_\_\_\_\_. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.(Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1989-1995, mai. 2012.
- \_\_\_\_\_. New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. **Ima Fungus**, p. 77-97, 2017.
- BISCHOFF, Kenneth M. et al. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. **Current microbiology**, v. 58, n. 5, p. 499-503, 2009.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, 2010.
- BURKHOLDER, W. H.; MCFADDEN, L. A.; DINOCK, A. V. A bacterial blight of chrysanthemums. **Phytopathology**, v. 43, p. 522-526, 1953.
- CARLIXTO JUNIOR, J. T.; DRUMOND, M. A. Estudo comparativo da estrutura fitossociológica de dois fragmentos de Caatinga em níveis diferentes de conservação. **Brazilian Journal of Forestry Research**, Colombo, v. 34, n. 80, p. 345-355, out./dez. 2014.
- CARVALHO, A. T. et al. Baixo sucesso reprodutivo em *Anemopaegma laeve* (*Bignoniaceae*) no Parque nacional do Catimbau, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 102-104, 2007.
- CACHUMBA, J. J. M. et al., Current applications and diferente approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47S, p. 77-85, 2016.
- CAVALCANTI, P. A. W. et al. Utilização de resíduos lignocelulósicos na produção de celulasas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido. **Scientia Plena**, v. 14, n.6, 2018.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, jul. 2012.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v. 5, p. 83-91, 1994.

CHEN, G. et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. **Tetrahedron**, n. 59, p. 4907-4909, 2003.

CHOW, Y.; TING, A. S. Y. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 869-876, 2014.

CHUN, R.; GARRETT, L. D.; VAIL, D. M. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S. J., VAIL, D. M. (Eds.). **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2007, p. 163–192.

CLAY. K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v. 69, p.10–16, 1988.

\_\_\_\_\_; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **The American Naturalist**, v. 160, p. 99–S127, 2002.

COLLADO, J. et al. Geographical and seasonal influence on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. **New Phytologist**, v. 143, p. 525–532, 1999.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* D.C. (ASTERAECEAE). **Global Science and Technology**, v.4, n. 2, p. 47-57, maio/ago. 2011.

DEANGELO, D. J. et al. Long-term outcome of a pediatric-inspired regimen used for adults aged 18–50 years with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v, 29, p. 526–534, 2015.

DE BARY, A. Morphologie und Physiologie der Pilze. **Flechten und Myxomyceten**, Leipzig, 1866.

DEMAIN, A. Idiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In: LUIJENDIJK, T. (Ed.) **2000 Years of Natural Products Research, Past, Present and Future**. Proceedings of the congress held. Amsterdam: Ed Teus J.C, 1999.

DEVI, S.; AZMI, W. One step purification of glutaminase free L-asparaginase from *Erwinia carotovora* with anticancerous activity. **International Journal of Life science & Pharma Research**, v. 2, n. 3, p. 36-45, 2012.

DIAS, M. L. et al. Bromélias e suas principais interações com a fauna. **CES Revista**, Juiz de Fora, v. 28, n. 1, p. 3-16, 2014.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002.

DOS SANTOS, I. P. et al. Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 18, p. 1227-1235, 2015.

DRUMOND, M. A. et al. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro... e o mais frágil. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**, São Leopoldo, n. 389, Ano XII, p. 2-60, 2012.

DSM. **PreventASe®**. Disponível em: <[https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/pt\\_BR/products/enzymes/baking/preventase.html](https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/pt_BR/products/enzymes/baking/preventase.html)>. Acesso em: 17 jul. 2018.

- DUVAL, M. et al. 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, 2002.
- DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. **N. Z. J. Science. Technology.**, v. 12, p. 223-236, 1969.
- ENDRESS, M. E. Apocynaceae: brown and now. **Telopea**, v. 10, p. 525-541, 2004.
- ESTEVEES, D. et al. Fungos endofíticos como mediadores na relação entre *Baccharis dracunculifolia* e herbívoros no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. SEB, Sociedade de Ecologia do Brasil. CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007, Caxambu. **Anais...**, Caxambu: SEB. 2007.
- FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrated and Computational Biology**, v. 42, p. 360–368, 2002.
- FARAG, A. M.; HASSAN, S. W.; BELTAGY, E. A.; EL-SHENAWY, M. A. Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295-302, 2015.
- GARDA, A. A.; LION, M. B.; LIMA, S. M. Q.; MESQUITA, D. O.; ARAÚJO, H. F. P.; NAPOLI, M. F. Os animais vertebrados do Bioma Caatinga. *Cienc. Cult.* v.70, n.4, 2018.
- GIULIETTI, A. M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J. M. C. et al. (Orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004, p. 48-90.
- GOMES, D. N. F. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do manguezal Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco**. 2007. Tese (Doutorado em Biologia) - Programa de Pós-graduação em Biologia dos Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007.
- GUILLEME, C.M. et al. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **Anales de Pediatría**, v. 79, n. 5, p. 329. e1-329. e11, nov. 2013.
- GUERRA, D. M. S. et al. Persistência de *Metarhizium anisopliae* spp no solo sob diferentes condições de temperatura e umidade. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 50-54, abr./jun. 2009.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Design of experiments and artificial neural network linked genetic algorithm for modeling and optimization of l-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 1, p. 50-58, 2011.
- HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T.*

*grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 114, n. 11-12, p. 901-910, 2010.

HAUFF, S. N. **Representatividade do sistema nacional de unidades de conservação na Caatinga**. Brasília: MMA, 2010.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v. 87, p. 888-891, 1997.

HENDRIKSEN, H. V. et al.. Asparaginase-mediated reduction of acrylamide formation in baked, fried and roasted products. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. S135, 2005.

HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168-4176. 2009.

HOFFMAN, M. T.; ARNOLD, A. E. Geographic locality and host identity shape fungi endophyte communities in cupressaceous trees. **Mycological Research**, v. 112, p. 31-344, 2008.

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

HWANG, Jeong-Sook et al. Effects of endophytic fungal secondary metabolites on the growth and physiological response of *Carex kobomugi* Ohwi. **Journal of Coastal Research**, v. 27, n. 3, p. 544-548, 2011.

IBAMA. **Ambiente Unidades de Conservação**: Parque Nacional de Catimbau. 2017. Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/unidades\\_de\\_conservacao/parques\\_nacionais/parque\\_nacional\\_de\\_catimbau.html?query=catimbau](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/unidades_de_conservacao/parques_nacionais/parque_nacional_de_catimbau.html?query=catimbau)>. Acesso em: 17 jul. 2017.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBio. **Dados Geostatísticos das Unidades de Conservação Federais**. Unidades de conservação por Bioma. 2017. Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/servicos/geoprocessamento/DCOL/dados\\_tabulares/UC\\_bioma\\_junho\\_2017.pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/servicos/geoprocessamento/DCOL/dados_tabulares/UC_bioma_junho_2017.pdf)>. Acesso em: 7 jul. 2017.

IMADA, A. et al. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, p. 85-99, 1973.

JACOBSON, E. S. et al. Antioxidant function of melanin in black fungi. **Infection. Immunity**, v. 63, p. 4944-4945, 1995.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32. 2011.

JIANG, Z. D., AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. In: RAHMAN, A.U. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**; Bioactive Natural Products (Part C). New York: Elsevier, 2000, v. 22, p. 245-272.

JOHRI, B. N. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1315-1316, 2006.

- JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal**: um enfoque filogenético. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- KALYANASUNDARAM, I. et al. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. **World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 663-677. 2015.
- KAUL, S. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.
- KAWAMURA, C. et al. The melanin biosynthesis genes of *alternaria alternata* can restore pathogenicity of the melanin deficient mutants of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 4, p. 446-453, 1997.
- KEATING, M. J. et al. L-asparaginase and PEG asparaginase – Past, present and future. **Leuk Lymphoma**, v. 10, p. 153-157, 1993.
- KHAN, A.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; JUNG, H. Y.; LEE, J. H.; LEE, I. J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 3, 2012.
- KHIDIR, H. H. et al. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. **Journal of Arid Environmental**, v. 74, p. 35-42, 2010.
- KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, dez. 1953.
- KORNBRUST, B. A. et al.. Asparaginase—an enzyme for acrylamide reduction in food products. In: WHITEHURST, R. J.; OORT, M. V. (Eds). **Enzymes in Food Technology**. 2. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010, p. 59–87.
- KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Engineering substrate specificity of *E. carotovora* l-asparaginase for the development of biosensor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 95–101, 2011.
- KRISHNAKUMAR, T.; VISVANATHAN, R. Acrylamide in food products: A review. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 5, n. 7, p. 1- 9, 2014.
- KUMAR, N. S. M; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577-587, 2013.
- \_\_\_\_\_. et al. Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 741-748. 2014.
- \_\_\_\_\_. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis, version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.
- LEAL, I. R. et al. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 2. Ed. Recife: UFPE, 2005.
- LEAL, K. R. et al. Conservação na Caatinga: Em que pé estamos?. CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: SEB, 2007.

LEEUWENBERG, A. J. M. Taxa of the Apocynaceae above the genus level - Series of Apocynaceae XXXVIII. **Wageningen Agric. Univ. Papers**, v. 94, p. 47- 60, 1994.

LÉVEILLÉ, J. H. **Considérations mycologiques suivis d'une nouvelle classification des champignons**. Paris, 1846.

LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017.

LOPEZ, B. R. et al. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. **Environmental and Experimental Botany**, v. 81, p. 26–36, 2012.

LOUREIRO, C. B. **Purificação, conjugação e avaliação" in vitro" da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7. A)**. 2010. 24 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

\_\_\_\_\_. et al. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 138-145, 2012.

LUZ, J. S. et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 2, abr/jun. 2006.

MACHADO, C. C. C. et al. Estimativa do Índice de Área Foliar no Parque Nacional do Catimbau (PE-Brasil) e sua comparação com medições de campo usando o LAI-2200. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 16, 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: INPE, 2013.

MACIEL, M. H. C. et al. Pectinolytic complex production by *Aspergillus niger* URM 4645 using yellow passion fruit peels in solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 3313-3332, 2014.

MAIA, L. C. et al. Fungos. In: PÔRTO, K. C. et al (Orgs.). **Diversidade biológica e conservação da floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco**. Brasília: MMA, 2005, p. 75-106.

\_\_\_\_\_.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, RC. et al (Orgs.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, v.1, p. 43-48.

MALONEY, K. W. Erwinia asparaginase: coming closer to an understanding of its use in pediatric acute lymphoblastic leukemia? **Pediatric blood cancer**, v. 54, n. 2, p. 189-190, 2010.

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**, São Cristovão, v. 6, n. 1, p. 165-175. 2006.

MARINHO, A. M. R. et al. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 9, n. 2, p.189-199, 2007.

MARINHO, E. B. **Asparaginase**: Produção, Mecanismos de Ação, Indicação Terapêutica e problemas relevantes. 2017. Monografia (Graduação em Farmácia) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, 2017.

MELNROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.

MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: *Boraginaceae* sensu lato. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 4, p. 109-120, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, PORTAL DA SAÚDE, ANVISA. **Brasil amplia produção de medicamentos biológicos**. 2017. <[http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/nota-autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase/219201/pop\\_up?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/nota-autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase/219201/pop_up?inheritRedirect=false)>. Acesso em: 31 jul 2018.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga**. Brasília: MMA/SBF, 2002.

\_\_\_\_\_. **Caatinga**. S.d. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 5 jul. 2017.

\_\_\_\_\_. **Contexto, Características e Estratégias de Conservação**. S.d. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga/item/191>>. Acesso em: 6 jul. 2017.

MORAES, A. M. L. et al. Introdução à Micologia. In: MOLINARO, E. M. et al (Orgs.). **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010, v. 4, p 399-496.

MORAIS, J. F. et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista Uningá review**, Paraná, v. 17, n. 1, p. 27-34, 2014.

MOROKAWA, R; SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S. Apocynaceae s. str. do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 1, p. 179-199, 2013.

MOURA, G. F.; BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A. Seleção de endofíticos com potencial biotecnológico na biorremediação de corante têxtil. ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA UNICESUMAR, 9, 2015, Maringá. **Anais...** Maringá: UNICESUMAR, 2015.

MURALI, T. S. et al. Fungal endophytes communities in two tropical forest of southern India: diversity and host affiliation. **Mycological Progress**, v. 6, p. 191-199, 2007.

NAGARAJAN, A. et al. Screening and isolation of novel glutaminase free L-asparaginase from fungal endophytes. **Research Journal of Microbiology**, v. 9, n. 4, p.163-176, 2014.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.

NOVOZYMES. **Award-winning Novozymes' solution enables acrylamide mitigation in even more product categories**. 2013. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2013/11/new-novozymes->

solution-enables-acrylamide-mitigation-in-even-more-product-categories-->. Acesso em: 3 jan. 2018.

NUR, A. Endophytic fungi to control of cocoa pod borer (*Conopomorpha cramerella*) on cocoa plantation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 1496-1501, 2016.

PANSA, C. C.; MELO, I. S.; SANTOS, S. N. Atividade antimicrobiana de compostos obtidos de fungos endofíticos de plantas da família combretaceae do semiárido brasileiro. CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7, 2013, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Embrapa, 2013.

PATIL, M. P. et al. A novel and sensitive agar plug assay for screening of asparaginase-producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 175-177, 2012.

PATIL, M. P. et al. Biological activities and identification of bioactive metabolite from endophytic *Aspergillus flavus* L7 isolated from *Aegle marmelos*. **Current microbiology**, v. 71, n. 1, p. 39-48, 2015.

PATRO, Krishna Raju; GUPTA, Nibha. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 3, n. 3, p. 30-34, 2012.

PEDRESCHI, F. et al. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food Chemistry**, v. 109, p. 386–392, 2008.

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

\_\_\_\_\_. et al. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, 2004.

PEREIRA, R. D. C. A. et al. Flora do Parque Nacional do Catimbau-PE: Asteraceae. CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 60, 2009, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: SBB, 2009.

PEREIRA JÚNIOR, L. R. et al. Composição florística e fitossociológica de um fragmento de caatinga em Monteiro, PB. **Holos**, Natal, v. 28, n. 2, p. 72-84, 2012.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, v.117, n. 2, p. 238-249, 2011.

PIRES, I. M. O. et al. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma Floresta Tropical Seca no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 155-161, 2015.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291, 2011.

PORTAL DA TRANSPARÊNCIA. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.portaltransparencia.gov.br/despesasdiarias/empenho?documento=250052000012012NE801976>>. Acesso em: 30 out. 2015.

PRADO, D. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R. et al (Eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: UFPE, 2003, p. 3-73.

- OLIVEIRA, C. T. et al. Controle biológico: Fungos endofíticos com potencial antagônico a antracnose da soja *Glycine max* (L.) Merr. CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 10, 2011, São Lourenço. **Anais...** São Lourenço: SEB, 2011.
- OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em micologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Control-Lab, 2014.
- REDMAN, R. S. et al. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1581, nov. 2002.
- RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, p. S1-S9, 2013.
- ROCHA, L. G. M. et al. Parques nacionais brasileiros: problemas fundiários e alternativas para sua resolução. **Revista de Sociologia Política**, Curitiba, v.18, n.36, p. 205-226, 2010.
- RODAL, M. J. N. et al. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 58, n. 3, p. 517-526, ago. 1998.
- ROSA, R. S. et al. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: LEAL, I. R. et al (Eds.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: UFPE, 2003, p. 135-180.
- ROTH, G. **Produção de L-asparaginase II recombinante de *Erwinia carotovora* em cultivos de *Escherichia coli* em batelada alimentada**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.
- SAIKKONEM, K. et al. Evolution of endophyte-plant symbioses. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- SALES, M. F. et al. Eight new species of *Mandevilla* Lindley (Apocynaceae, Apocynoideae) from Brazil. **Novon**, v. 16, p. 112–128, 2006.
- SAMSON, R. et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1415-1427, 2005.
- SANTOS, L. S. et al. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 539-548, 2008.
- 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**, n. 67, p. 147-156, 2015.
- SARQUIS, M. I. M. et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 489-492, ago. 2004.

- SAVITRI, N. A.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 184-194, 2003.
- SCHLEIS et al. Asparaginase-associated pancreatitis in a dog. **The Canadian Veterinary**, Guelph, v. 52, n. 9, p. 1009-1012, set. 2011.
- SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 99-111, 2007.
- SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- \_\_\_\_\_.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 06, p. 661-686, 2005.
- SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; KHURSHID, M.; KALAM, M. A.; JAIN, S. K.; SINGHAL, P. K. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1–10, 2016.
- SILVA, D. C. V. **Seleção de fungos de sedimento do rio Capibaribe contaminado com efluentes têxteis quanto à capacidade de produzir enzimas do complexo fenoxidase e de descolorir corantes**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia dos Fungos) – Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2012.
- SILVA LISBOA, D. C. V. et al. Requalification of a Brazilian Trichoderma Collection and Screening of Its Capability to Decolourise Real Textile Effluent. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, p. 373, 2017.
- SILVA, M. et al. Padrão de Forrageio de *Xylocopa* (Neoxylocopa) *Ordinaria* (Hymenoptera, Apidae) em ambiente de Caatinga, Vale Do Catimbau-Pernambuco. **Journal of Research**, v. 6, n. 1, p. 262-270, 2007.
- SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta botânica brasílica**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 649-655. 2006.
- SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos**: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. Curso de capacitação de monitores e educadores. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006.
- SILVA, S. A. **Produção e caracterização de L-asparaginase de leveduras isoladas de pólen coletadas de *Melipona* spp. da região Amazônica**. 2015. Tese (Doutorado em Biociência Animal) - Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2015.
- SILVA, V. M. A. et al. Juice clarification with tannases from *Aspergillus carneus* URM5577 produced by solid-state fermentation using Terminalia catappa L. leaves. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1131-1141, 2017.
- SIMÕES, A. O. et al. New combinations in *Mandevilla* Lindley (Apocynaceae). **Novon**, n. 17, p. 87-90, 2007.
- SIQUEIRA, V. M. **Fungos endofíticos de folhas e caule de *Lippia sidoides* Cham. E avaliação da atividade antimicrobiana**. 2008. Dissertação (Mestrado em

Biologia dos Fungos) – Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

SOUZA-SILVA, R. F. et al. *Mandevilla Catimbauensis* (Apocynaceae), A New Species From The Semi-Arid Region, Pernambuco, Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 67, n. 01, 2010.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 16,n. 4, p. 345-51, 2014.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.16, n. 4, p. 345-351, 2015.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; E STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STONE, J. K. et al. Endophytic Fungi. In: MULLER, J. M. et al (Orgs.). **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004, p. 241-270.

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

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, dez. 2003.

STROBEL, G.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, n. 67, p. 257–268, 2004.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, p. 480–486, 2012.

SUN, Y. et al. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycological Progress**, v. 11, n. 3, p. 781-790, 2012.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research**, v. 109, p. 635–639, 2005.

\_\_\_\_\_. Fungal endophytes: the tropical dimension. In: MISRA, J. K.; HORN, B. W. (Eds.). **Trichomycetes and other fungal groups**. Enfield: Science Publishers, 2001, p. 197–207.

SWETT, C. L.; GORDON, T. R. Endophytic association of the pine pathogen *Fusarium circinatum* with corn (*Zea mays*). **Fungal Ecology**, v. 13, p. 120-129, 2015.

TABARELLI, M.; LEAL, I. R.; SCARANO, F. R.; SILVA, J. M. C. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Cienc. Cult.** v.70, n.4, 2018.

TAECHOWISAN, T. et al. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 381-385, 2003.

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

THAKUR, M. et al. Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 2, n. 2, p. 12-14, 2013.

THEANTANA, T. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. **KMITL Science and Technology Journal**, v. 7, n. S1, p.13–18, 2007.

\_\_\_\_\_ et al. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. **International Journal of Integrative Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2009.

TRIVEDI, R. S.; PADALIA, U. L-Asparaginase as an Anti-Carcinogenic Agent. **International Journal of Engineering Science and Computing**, v. 6, p. 2824 - 2826, 2016.

UNTERSEHER, M.; PETZOLD, A.; SCHNITTLER, M. Xerotolerant foliar endophytic fungi of *Populus euphratica* from the Tarim River basin, Central China are conspecific to endophytic ITS phylotypes of *Populus tremula* from temperate Europe. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 133-142, 2012.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. J. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* mtcc 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **International Journal of Engineering and Technology**, v. 2, n. 09, p. 121-129, 2013.

VASCONCELOS, G. C. L.; MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, PE, Brasil: Loranthaceae. **Hoehnea**, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 317-323, 2016.

VELLOSO, A. L. et al. **ECORREGIÕES Proposta para o Bioma Caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental The Nature Conservancy do Brasil, 2002.

VERMA, N. et al. L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic. **Agente Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, p. 45-62, 2007.

\_\_\_\_\_. L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007a.

\_\_\_\_\_. E. coliK-12 Asparaginase-Based Asparagine Biosensor for Leukemia. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 449–456, 2007b.

\_\_\_\_\_; BANSAL, M.; KUMAR, S. Whole cell based miniaturized fiber optic biosensor to monitor L-asparagine. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, p. 809–814, 2012.

\_\_\_\_\_ et al. Miniaturized fiber-optic biosensor to monitor asparagine in clinical samples. **Advances in Applied Science Research**, v. 4, n. 5, p. 165-172, 2013.

- VIMAL, A.; KUMAR, A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, p. 40-61, 2017.
- XU, F.; ORUNA-CONCHA, M. J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food chemistry**, v. 210, p. 163-171, 2016.
- WAQAS, M. et al.. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10754-10773, 2012.
- WANG, B. et al. Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. **Leukemia**, v. 17, n. 8, p. 1583-1588, 2003.
- WEARING, J. **FUNGI: Mushrooms, Toadstools, Molds, Yeasts, and Other Fungi**. Ontário: Crabtree Publishing Company, 2010.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274-276, jun. 1995.
- WENZEL, J.B. et al. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Revista Perspectivas Online: Biológicas & Saúde**, Campos dos Goytacazes, v. 3, n. 9, p. 01-15, jul. 2013.
- WOLOCK-MADEJ, C. CLAY, K. Avian seed preference and weight loss experiment: the role of fungal-infected fescue seeds. **Oecologia**, v. 88, p. 296–302, 1991.
- WOODSON, R. E. Studies in Apocynaceae. IV: The American genera of Echioideae. **Annals of the Missouri Botanical Garden.**, v. 20, p. 605-790, 1933.
- ZUO, S. et al. Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable L-asparaginase during French fries processing. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 841-851, 2015.
- ZYZAK, D. V. et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4782-4787, 2003.

## CAPÍTULO I

### **Comunidade de fungos endofíticos de *Mandevilla catimbauensis*: planta endêmica da floresta tropical seca do Brasil e ameaçada de extinção**

Gianne R. Araújo-Magalhães<sup>1</sup>, Jadson D. P. Bezerra<sup>2</sup>, Karla T. L. S. Freire<sup>2</sup>, Leticia F. Silva<sup>2</sup>, Iolanda Ramalho da Silva<sup>2</sup>, Laura M. Paiva<sup>2</sup>, Cristina M. Souza-Motta<sup>2</sup>, Keila A. Moreira<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

\*Autor correspondência: Dra. Keila Aparecida Moreira, Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG, Avenida Bom Pastor, s/n.º, Bairro Boa Vista - CEP: 55292-272 - Garanhuns – PE, Tel: (87) 3764-5581 e-mail:moreirakeila@hotmail.com

#### **Resumo**

A comunidade de fungos endofíticos de folhas de 20 indivíduos de *Mandevilla catimbauensis* do Parque Nacional do Vale do Catimbau no Brasil foi estudada, e um total de 66 isolados foram obtidos. A taxa de colonização dos fragmentos foi de 11,78%. As sequências de ITS e LSU do DNAr revelaram que os isolados pertencem a sete ordens do filo Ascomycota (Pleosporales, Diaporthales, Mycosphaerellales, Botryosphaeriales, Capnodiales, Phacidiales e Eurotiales). Um total de 18 espécies foram identificadas pertencentes aos seguintes gêneros: *Phaeophleospora*, *Phyllosticta*, *Pseudofusicoccum*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Pyrenochaeta*, *Cladosporium*, *Paraconiothyrium*, *Talaromyces*, *Preussia*, *Pseudocercospora*, e uma incluída na família Tympanidaceae. Os endófitos mais frequentemente isolados foram membros do gênero *Phyllosticta* (45,10%). Quatro gêneros (*Phaeophleospora*, *Cladosporium*, *Paraconiothyrium* e *Preussia*) apresentaram baixa frequência (1,96%) e foram considerados como isolamentos raros. A curva de acumulação de espécies não alcançou o ponto de estabilização, e o esforço de amostragem não foi suficiente para recuperar toda riqueza estimada. A riqueza total de fungos endofíticos foi de 18 táxons, a diversidade total dos endófitos com base no índice de Shannon variou de 0,64 a 1,91 e o valor total utilizando o índice de Fisher alfa variou de 1,0 a 5,37. Este estudo é o primeiro relato de fungos endofíticos de *M. catimbauensis*. Além disso, essa pesquisa contribuiu para catalogar a descoberta de uma nova espécie de fungo endofítico *Phyllosticta catimbauensis*.

**Palavras-chave:** Ascomycota, endófitos, espécies fúngicas, riqueza.

## Introdução

Uma das florestas tropicais secas do Brasil, conhecida como Caatinga, abrange a maior parte dos estados da região Nordeste do país e uma pequena parte ao norte da região Sudoeste, abrigando diversas espécies de plantas, animais e micro-organismos (Leal et al. 2005; Cruz, et al. 2013, 2017). Esta região, apesar da frágil conservação ambiental, possui regiões de proteção federal tais como, o Parque Nacional do Vale do Catimbau, que corresponde a uma área de Unidade de Conservação de Proteção Integral do bioma Caatinga. Considerado o segundo maior parque arqueológico do Brasil, possui uma área de extrema relevância biológica (Rocha et al. 2010), por abrigar diversas espécies de plantas endêmicas e exclusivas, dentre elas *Mandevilla catimbauensis*, espécie rara e classificada como vulnerável a extinção (Judd et al. 2009; Souza-Silva et al. 2010).

O gênero *Mandevilla* Lindl. é considerado o maior gênero neotropical da família Apocynaceae (Simões et al. 2004). No Brasil, foram reconhecidas 40 espécies pertencentes a esse gênero, incluindo oito novidades taxonômicas (Sales et al. 2006; Souza-Silva et al. 2010). Uma pesquisa realizada na região do semiárido brasileiro sobre a família Apocynaceae incluiu 29 espécies nativas, das quais, sete são endêmicas (Souza-Silva et al. 2010). Espécies desse gênero apresentam grande importância medicinal devido à capacidade de produzir compostos químicos secundários, e por isso estão sendo utilizadas na medicina tradicional (Di Stasi e Himura-Lima 2002).

Micro-organismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que habitam o interior dos tecidos vegetais saudáveis, sem causar danos ou sintomas à planta hospedeira (Stone et al. 2000; Chow e Ting 2015). Dentre esses micro-organismos, os fungos são os mais frequentemente encontrados associados aos vegetais e em diversos estudos já foram relatados desempenhando papéis essenciais no desenvolvimento de várias espécies de plantas, como por exemplo, no controle biológico de fitopatógenos e insetos herbívoros, proteção de temperaturas extremas e radiação UV (Fernandes et al. 2015; Bezerra et al. 2016).

Estudos de fungos endofíticos têm sido mais explorados em florestas tropicais úmidas e temperadas, entretanto, trabalhos realizados em ambientes áridos, semiáridos e/ou desérticos, tais como a floresta tropical seca brasileira (Caatinga) vêm ganhando dimensões pelo fato de desvendar uma grande riqueza de

espécies, além de contribuir e catalogar novidades taxonômicas (Banerjee 2009; Bezerra et al. 2012, 2013, 2016; Freire et al. 2015; Pires et al. 2015; Pádua et al. 2018; Silva et al. 2018).

Fungos endofíticos produzem uma diversidade de substâncias bioativas que aceleram o crescimento das plantas, além disso, podem produzir compostos com função anticancerígena e antibacteriana de interesse para indústria farmacêutica. Também existem relatos da utilização desses endófitos na biorremediação de ambientes contaminados e na produção de biocombustíveis (Gunatilaka 2006; Massimo et al. 2015).

O aproveitamento dos fungos endofíticos em diversos processos tem despertado interesse de pesquisadores na utilização desses micro-organismos em estudos em diferentes regiões do Brasil e do mundo, com o intuito de fornecer informações essenciais a respeito da biodiversidade e aumentar o conhecimento acerca da sua distribuição geográfica, além de tentar esclarecer as relações ecológicas entre esses organismos e seus hospedeiros (Bezerra et al. 2013; Santos et al. 2015).

A dinâmica da interação entre fungo endofítico e planta hospedeira de ambiente seco vem sendo estudada com maior frequência nos últimos anos, porém ainda não foi totalmente esclarecida. Estudos sobre diversidade de fungos endofíticos realizados na Caatinga apontam o filo Ascomycota com o maior número de endófitos, seguidos por Basidiomycota e Mucoromycota (Maia et al. 2015). A maioria dos trabalhos publicados sobre fungos endofíticos da Caatinga são relacionados às plantas da família Cactaceae (Bezerra et al. 2013, 2016; Freire et al. 2015), mas também existem estudos da comunidade de fungos endofíticos associadas a folhas de *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae) (Santos et al. 2015), folhas de *Tillandsia catimbauensis* (Bromeliaceae) (Silva et al. 2018) e folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) (Pádua et al. 2018).

Baseando-se nesse panorama de crescentes estudos sobre a comunidade de fungos endofíticos em áreas de Caatinga e a necessidade de buscar estratégias de conservação desse bioma, o presente estudo teve como objetivo estudar a microbiota endofítica fúngica associadas a folhas de *M. catimbauensis* em área da floresta tropical seca brasileira, protegida no Parque Nacional do Vale do Catimbu, e elucidar a diversidade das espécies endofíticas através de análises filogenéticas

utilizando sequências de parte das regiões ITS e LSU do DNAr e análises morfológicas das colônias.

## **Material e Métodos**

### *Área de estudo*

A coleta do material vegetal foi realizada no Parque Nacional do Catimbau (8° 24' 00" e 8°36'35" S, 37° 09'30' e 37° 14'40' O), uma área de conservação da Caatinga que possui aproximadamente 623 km<sup>2</sup> de extensão. Situada na região semiárida do estado de Pernambuco, Brasil, apresenta um clima do tipo Bsh (semi-árido), com temperaturas médias anuais de 23° C e precipitação média de 650 a 1.100 mm ao ano, sendo os meses de maio e novembro o mais chuvoso, e o mais seco, respectivamente. O parque também apresenta uma vegetação heterogênea, com quatro fitofisionomias distintas, a saber: campos rupestres, vegetação florestal perenifólia, caatinga arbustiva e vegetação arbustiva perenifólia (Köppen 1948; Rodal et al. 1998; Melo 2012). A coleta foi realizada no mês de maio de 2015, após um dos maiores períodos de seca dos últimos 50 anos. O pedido de autorização de coleta foi registrado no ICMBio com o número 48492-1.

### *Material vegetal*

Folhas de cerca de 7 cm foram coletadas aleatoriamente de 20 indivíduos de *M. catimbauensis*, acondicionadas em embalagens plásticas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos, da Central Analítica da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Universidade Federal Rural de Pernambuco e processadas em 24 horas. Um exemplar exsicata de *M. catimbauensis* está depositado no Herbário UFP - Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco sob o registro de número 81.210.

### *Isolamento de fungos endofíticos*

Para isolamento de fungos endofíticos as folhas foram processadas como descrito por Bezerra et al. (2015). As folhas coletadas foram lavadas em água corrente e em seguida imersas em etanol 70% durante 60 s, hipoclorito de sódio (2-2,5% de cloro ativo) por 180 s, etanol 70% durante 30 s, e posteriormente foram então lavadas três vezes em água destilada e esterilizada. Após esse procedimento, o material vegetal foi cortado com o auxílio de um bisturi, em fragmentos de cerca de

1cm<sup>2</sup> e inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) suplementado com cloranfenicol (100 mg/L) e tetraciclina (50 mg/L) para restringir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por até 30 dias, em fotoperíodo natural. Para verificar a eficácia da assepsia da superfície, 1 mL de água da última lavagem foi semeada em placas de Petri contendo o mesmo meio, e incubadas sob as mesmas condições. Os endófitos foram isolados, purificados e mantidos em BDA para identificação taxonômica.

Culturas representativas de fungos endofíticos estão depositadas na Coleção de Culturas – Micoteca URM (filial ao World Directory of Collections of Culture of Microorganisms - WFCC nº 604) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil ([www.ufpe.br/micoteca](http://www.ufpe.br/micoteca)).

#### *Extração de DNA, PCR e sequenciamento*

A extração e amplificação de fragmentos do DNA dos isolados foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, UFPE. A extração do DNA genômico dos isolados foi realizada utilizando o kit de purificação de DNA genômico Wizard® (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante e com algumas modificações de acordo com Bezerra et al. (2017). Foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (White et al. 1990), para amplificar parte da região ITS do DNAr, e os primers LR1 e LR5 (Van Tuinen et al. 1998) para parte da região LSU. Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram realizados de acordo com Bezerra et al. (2017). Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit de purificação “PureLink PCR Purification Kit” (Invitrogen, Lituania) e encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE.

#### *Análises filogenéticas*

Foram realizadas pesquisas utilizando a ferramenta BLASTn do banco de dados do GenBank no NCBI, para verificar as relações filogenéticas associadas as sequências de DNAr de ITS e LSU. Após essa primeira busca, sequências similares de ITS depositadas no banco de dados foram selecionadas e alinhadas com as sequências de estudo para verificar as relações evolutivas com base na análise de

Inferência Bayesiana (IB). O programa MAFFT on-line (Kato e Standley 2013) foi usado para realizar o alinhamento, e o software MEGA v. 7.0 (Kumar et al. 2016) foi utilizado para o ajuste das sequências. A IB foi conduzida pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck 2003) lançado a partir do Topali 2.5 (Milne et al. 2004) usando duas corridas de  $1 \times 10^6$  gerações com um valor de 25%. O modelo de substituição de nucleotídeos foi calculado através da ferramenta on-line Findmodel (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>), que sugeriu modelo Jukes-Cantor (JC). A árvore obtida foi visualizada com TreeView v. 1.6.6 (Figtree, 2018).

#### *Taxa de colonização e frequência absoluta e relativa*

A taxa de colonização (TC%) foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (Nf) e o número total de fragmentos (Nt) ( $TC = Nf/Nt \times 100$ ) (Araújo et al. 2002), além disso, a frequência absoluta (FA) de isolamento foi calculada como sendo o número de vezes que cada táxon foi isolado da planta e a frequência relativa (FR) foi calculada como sendo o número de isolados de uma espécie dividido pelo total do número de isolados ( $FR = FA/Nt \times 100$ ) (Larran et al. 2002).

#### *Análise de dados ecológicos*

A estrutura da comunidade de fungos endofíticos foi estimada através da riqueza de espécies (S) e os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Fisher alfa. A riqueza foi determinada como sendo 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 por fim, os valores de H' foram convertidos em  $\text{Exp}(H')$ . O índice de Fisher alfa foi calculado baseado na equação  $S = \alpha \ln(1 + n/\alpha)$ , onde S é o número de taxa, n é o número de isolados, e  $\alpha$  é o alfa de Fisher (Fisher et al. 1943). A curva de acumulação de espécies foi determinada, e a riqueza total observada foi comparada com a riqueza estimada usando o Chao de primeira ordem (índice Chao 1) para avaliar a eficiência do esforço de amostragem. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R v.3.5.0 (R Development Core Team 2018) usando

os pacotes 'agricolae' (Mendiburu 2017), 'vegan' (Oksanen et al. 2018) e 'iNEXT' (Hsieh et al. 2018).

## Resultados

Um total de 20 indivíduos (560 fragmentos de folhas) de *M. catimbauensis* foram utilizados para o isolamento dos fungos endofíticos, e 66 endófitos foram obtidos. A taxa de colonização dos fragmentos pelos fungos endofíticos foi de 11,78%. Os isolados foram agrupados através das características morfológicas (macro e microscópicas) e em seguida, submetidos a extração de DNA, amplificação e análises das sequências de DNAr das regiões ITS e LSU. Buscas por sequências similares usando a ferramenta Blastn do banco de dados GenBank do NCBI foram realizadas e as sequências de espécies fúngicas que apresentaram similaridade com as sequências dos isolados de *M. catimbauensis* foram listadas na tabela 1 e foram utilizadas na construção da árvore filogenética.

Tabela 1. Sequências que apresentaram alta similaridade com as sequências dos isolados de *M. catimbauensis* após busca no banco de dados GenBank.

Identificação por Gênero	Identificação do fungo por Blast	LSU	Ident	ITS	Ident	Identificação Final
<i>Alternaria</i>	<i>A. alternata</i>	KP124449	99%	KP12429 8	100 %	<i>Alternaria alternata</i> complexo
	<i>A. arborescens</i>	KP124554	100 %	KP12440 1	99%	
	<i>A. gaisen</i>	KC584275	99%	KC58419 7	99%	
<i>Cladosporium</i>	<i>C. cladosporioides</i>	AY386195	100 %	NR_1198 39	100 %	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo
	<i>C. tenuissimum</i>		100 %	HM14819 7	100 %	
<i>Diaporthe</i>	<i>D. acaciarum</i>			KP00446 0	99%	<i>D. acaciarum</i>
	<i>D. anacardii</i>			KC34302 4	99%	<i>D. anacardii</i>
	<i>D. brasiliensis</i>			KC34304 2	100 %	<i>Diaporthe</i> sp.
	<i>D. caatingaensis</i>	KY085932	100 %	KY08592 8	100 %	<i>D. caatingaensis</i>
	<i>Diaporthe</i> cf. <i>heveae</i>			KJ463815	99%	<i>D. heveae</i>
	<i>Diaporthe inconspicua</i>			KC34312 4	99%	<i>Diaporthe</i> sp.
<i>Collophorina</i>	<i>C. africana</i>	GQ154609	83%	GQ15457 0	86%	<i>Typanidaceae incerte sedis</i>
	<i>C. capensis</i>	GQ154610	85%	GQ15457 3	89%	

	<i>C. hispanica</i>			NR_1116	85%	
				80		
	<i>C. paarla</i>	GQ154611	87%	NR_1197	87%	
				49		
<i>Paraconiothyrium</i>	<i>P. thysanolaenae</i>	KP744496	100%	NR_1556	99%	<i>P. thysanolaenae</i>
				46		
<i>Phaeophleospora</i>	<i>P. eucalypticola</i>	KX228318	99%	NR_1451	99%	<i>P. eucalypticola</i>
				23		
	<i>P. hymenocallidicola</i>	KR476772	100%	KR47673	100%	<i>P. hymenocallidicola</i>
				9		
<i>Phyllosticta</i>	<i>P. capitalensis</i>	KF766336	100%	FJ538319	100%	<i>P. capitalensis</i>
	<i>P. catimbauensis</i>	MF466163	100%	MF46616	100%	<i>P. catimbauensis</i>
				0		
<i>Preussia</i>	<i>P. persica</i>	GQ292752	98%	GQ29275	98%	<i>Preussia sp.</i>
				0		
	<i>P. minima</i>	AY510391	91%	AY51042	98%	<i>Preussia sp.</i>
				6		
<i>Pseudocercospora</i>	<i>P. bakeri</i>	KX288463	98%	KX28730	98%	<i>Pseudocercospora</i>
<i>lla</i>				6		<i>sp.</i>
	<i>P. bidentis</i>	KF421120	99%	KF42111	99%	<i>Pseudocercospora</i>
				4		<i>sp.</i>
<i>Pseudofusicoccum</i>	<i>P. stromaticum</i>	DQ377931	100%	KF76622	99%	<i>P. stromaticum</i>
				3		
<i>Pyrenochaeta</i>	<i>P. protearum</i>	JQ044453	99%	JQ04443	99%	<i>Pyrenochaeta sp.</i>
				4		
	<i>P. unguis-hominis</i>	LN907372	98%	LT726715	99%	
<i>Talaromyces</i>	<i>T. borbonicus</i>			NR_1575	99%	<i>T. borbonicus</i>
				02		
	<i>T. helicus</i>	FJ430763	94%	AF03339	93%	
				6		

Através do conjunto de informações morfológicas e moleculares dos isolados fúngicos, foi possível identificar a presença de endófitos pertencentes a sete ordens do filo Ascomycota (Pleosporales, Diaporthales, Mycosphaerellales, Botryosphaeriales, Capnodiales, Phacidiales e Eurotiales).

A análise filogenética através de Inferência Bayesiana mostrou que as sequências se agruparam em clados distintos, com probabilidade superior a 94%, sendo possível identificar a maioria dos isolados até nível de probabilidade (Figura 1).

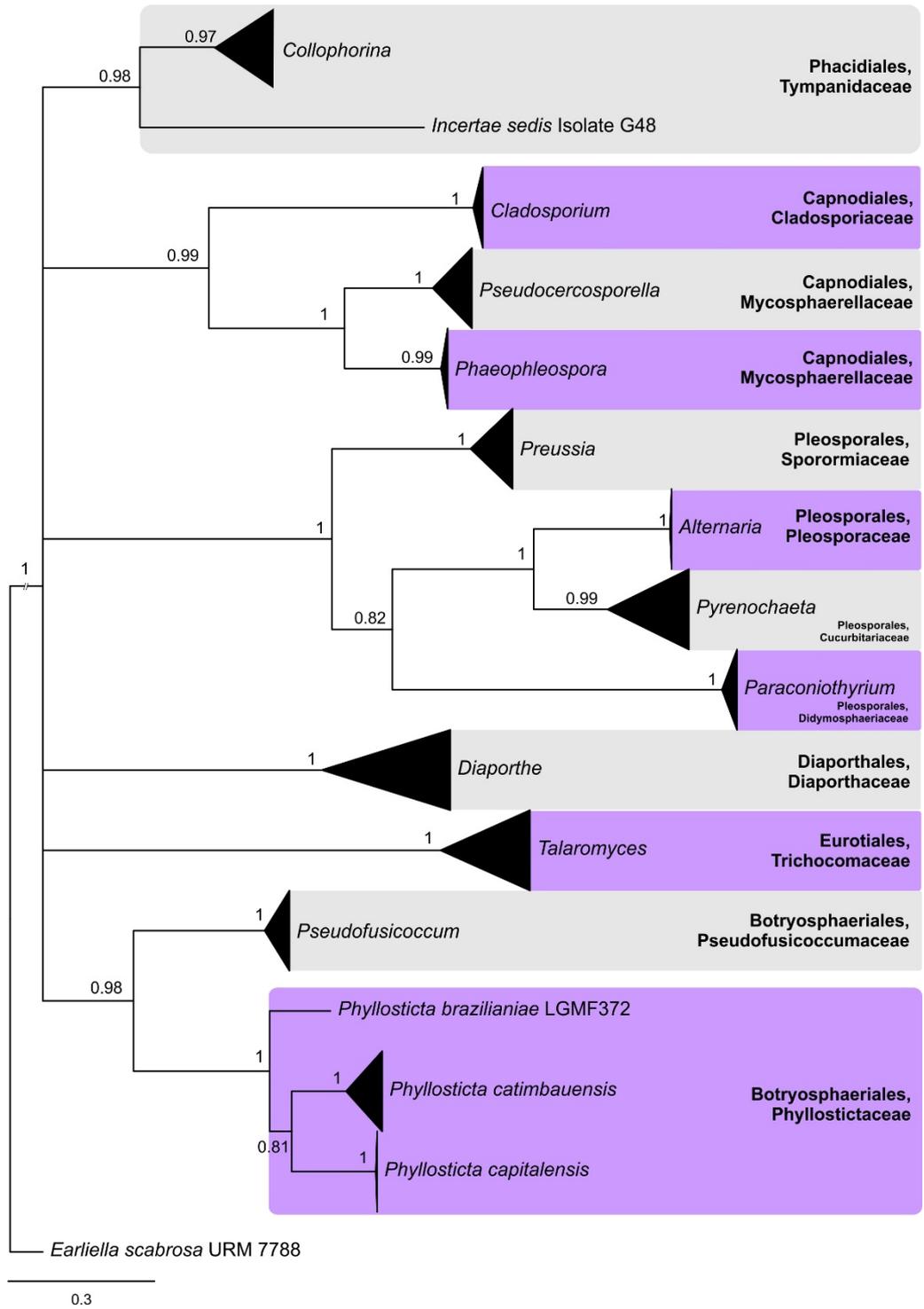


Figura 1. Árvore de Inferência Bayesiana obtida das sequências de ITS DNAr de fungos endofíticos isolados de folhas da *M. catimbauensis* da floresta tropical seca brasileira (Caatinga). *Earliella scabrosa* (URM 7788) foi usado como grupo externo. Foram considerados valores de probabilidade acima de 50% e posteriores de BI acima de 0,80 são mostrados nos nós.

Analisando a árvore filogenética, foi possível observar a existência de 18 táxons (Tabela 2) distribuídas nos seguintes gêneros: *Phaeophleospora*, *Phyllosticta*, *Pseudofusicoccum*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Pyrenochaeta*, *Cladosporium*, *Paraconiothyrium*, *Talaromyces*, *Preussia*, *Pseudocercospora*, e uma incluída na família Tympanidaceae. Os fungos endofíticos mais frequentemente isolados pertencem ao gênero *Phyllosticta* (45,10%), e *Diaporthe* foi considerado o segundo gênero mais frequente (11,76%). Outros quatro gêneros (*Phaeophleospora*, *Cladosporium*, *Paraconiothyrium* e *Preussia*) apresentaram baixa frequência (um ou dois isolados) e foram considerados como isolamentos raros.

Tabela 2. Frequência absoluta (Fa) e frequência relativa (Fr) das espécies fungos endofíticos isoladas de *Mandevilla catimbauensis*, planta endêmica do Parque Nacional do Vale do Catimbau.

Fungos endofíticos	Fa	Fr(%)
<i>Alternaria alternata</i> (complexo)	3	5,88
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (complexo)	2	3,92
<i>Diaporthe</i> sp.2 ( <i>heveae</i> )	1	1,96
<i>Diaporthe</i> sp.3 ( <i>anacardii</i> )	1	1,96
<i>Diaporthe</i> sp.4 ( <i>caatingaensis</i> )	1	1,96
<i>Diaporthe</i> sp.5	1	1,96
<i>Diaporthe</i> sp1. ( <i>acaciarum</i> )	2	3,92
<i>Phaeophleospora hymenocallidicola</i>	1	1,96
<i>Paraconiothyrium thysanolaena</i>	1	1,96
<i>Phaeophleospora eucalypticola</i>	1	1,96
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	14	27,45
<i>Phyllosticta catimbauensis</i>	9	17,65
<i>Preussia</i> sp.	1	1,96
<i>Pseudocercospora</i> sp.	3	5,88
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	3	5,88

<i>Pyrenochaeta</i> sp.	1	1,96
<i>Talaromyces borbonicus</i>	5	9,8
<i>Typanidaceae incertae sedis</i>	1	1,96

---

A curva de acumulação de espécies não atingiu o ponto de estabilização, e o esforço de amostragem não foi suficiente para recuperar toda riqueza estimada, usando o índice Chao (Chao 1) (Figura 2). Observando a curva de acumulação, é possível verificar que mesmo duplicando o número de amostras (indivíduos de *M. catimbauensis*), não seria possível representar toda a riqueza esperada para *M. catimbauensis*, ou seja, a amostragem não foi exaustiva. Entretanto, vale ressaltar que por se tratar de uma espécie de planta ameaçada de extinção, a realização de novas coletas para obtenção de um esforço amostral maior ficaria inviável.

A riqueza total de fungos endofíticos foi de 18 espécies e a riqueza estimada por indivíduo de *M. catimbauensis*, variou 1 a 7 espécies, com uma média de 1,9. A diversidade total de fungos endofíticos com base no índice de Shannon variou de 0,64 a 1,91 nas amostras, com uma média de 0,56. Já o valor total utilizando o índice de Fisher variou de 1,0 a 5,37, e a média foi de 3,26. Pode-se verificar com os resultados obtidos, que o método utilizado subestimou a diversidade de endófitos.

Entre os endófitos isolados de *M. catimbauensis*, constatou-se a presença de algumas leveduras, entretanto, não foi possível concluir sua identificação, pois não houve crescimento posterior em meio de cultura, impossibilitando o cultivo.

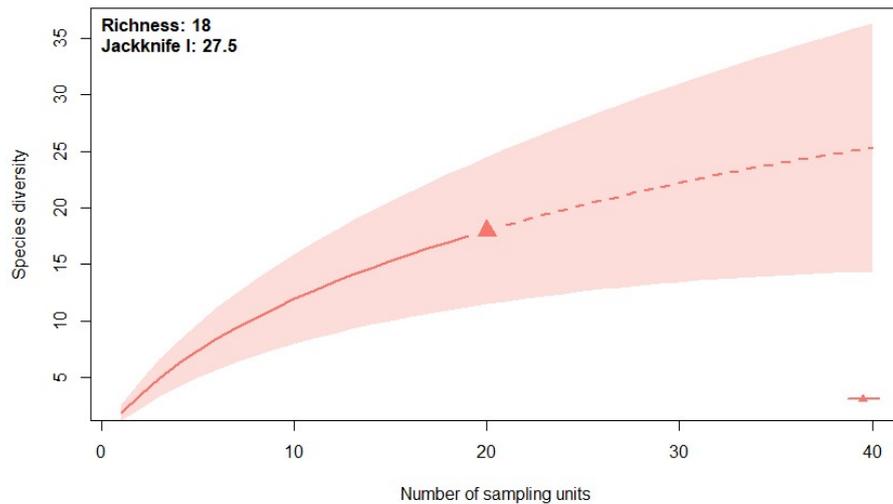


Figura 2. Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos isolados de *Mandevilla catimbauensis*, planta endêmica da floresta tropical seca do Brasil.

## Discussão

Durante muitos anos, os estudos de fungos endofíticos se concentravam, na maior parte, em plantas de regiões temperadas e florestas tropicais (Rodrigues e Petrini 1997; Arnold e Lutzoni 2007; Azevedo e Araújo 2007; Lima et al. 2013). No entanto, esse cenário tem sofrido mudanças e várias pesquisas estão sendo desenvolvidas com fungos endofíticos de plantas de ambientes áridos, revelando uma grande diversidade desses micro-organismos incluindo novidades taxonômicas (Murali et al. 2007; Khidir et al. 2010; Bezerra et al. 2012, 2013, 2017; Lopez et al. 2012; Zhou et al. 2015, Crous et al. 2017; Pádua et al. 2018; Silva et al. 2018).

Existe na literatura, alguns registros de fungos endofíticos relacionado as plantas da família Apocynaceae (Rodrigues et al. 2005; Huang et al. 2007b; Nithya e Muthumary 2011; Kuriakose et al. 2016; Venieraki et al. 2017). Palem et al. (2015), isolaram fungos endofíticos de caule, folhas, pétalas de flor e pedicelo de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), e obtiveram um total de 22 isolados. Na pesquisa de Yin e Sun (2011), um total de 10 fungos endofíticos foi isolado de raízes, caules e folhas de *Vinca minor* (Apocynaceae). Huang et al. (2007a) isolaram fungos de folhas e caules de *Nerium oleander* (Apocynaceae) e obtiveram um total de 42 isolados, destes, 20 foram isolados das folhas. Resultado superior foi verificado no presente estudo, no qual, foi possível isolar 66 fungos endofíticos de folhas de *M. catimbauensis* (Apocynaceae).

Em um estudo sobre a diversidade de fungos endofíticos de diferentes tecidos de *Bauhinia forficata* (Fabaceae) realizado por Bezerra et al. (2015), 95 endófitos foram isolados, dos quais, 18 foram obtidos do tecido das folhas. Sun et al. (2008), isolaram fungos de diferentes tecidos vegetais e constataram maior número de isolados endofíticos nos galhos, do que nas folhas das seis plantas estudadas (*Eucommia ulmoides*, *Forsythia suspense*, *F. giraldiana*, *F. ovata*, *Berberis poiretii*, *Rhus potanini*). Singh et al. (2017) também isolaram fungos de diferentes tecidos de *Tectona grandis* (Lamiaceae), e obtiveram nas folhas a maior diversidade de fungos endofíticos.

A maioria dos fungos endofíticos isolados no presente estudo foi pigmentado (*Phyllosticta*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Pseudofusicoccum*, etc). Os pigmentos produzidos pelos fungos (melanina, carotenoides) podem conferir ao vegetal, tolerância a condições adversas, proteção contra estresses, radiação UV, impacto ambiental e patogenicidade (Khidir et al. 2010; Gupta et al. 2015). Além disso, quando esses fungos estão associados as raízes, podem auxiliar as plantas na absorção de água (Barrow et al. 2007). Os fungos pigmentados foram isolados em estudos com várias espécies de plantas de ambientes áridos (Gehlot et al. 2008; Bezerra et al. 2013; Massimo et al. 2015).

Gêneros como *Phyllosticta*, *Diaporthe* (*Phomopsis*), *Colletotrichum*, já foram isolados como os mais frequentes endófitos de folhas de diversas espécies de plantas tropicais (Suryanarayanan et al. 2001; Murali et al. 2007; Sing et al. 2017). Suryanarayanan et al. (2002), estudaram a ocorrência e a distribuição de fungos endofíticos de florestas tropicais e observaram que os gêneros mais frequentemente isolados foram *Colletotrichum*, *Phyllosticta* e *Phomopsis*. Semelhante ao estudo citado anteriormente, o gênero mais frequentemente isolado durante essa pesquisa foi *Phyllosticta*, seguido de *Diaporthe*. Sing et al. 2017, verificaram que o gênero mais frequente no isolamento de *Tectona grandis* (Lamiaceae) foi *Diaporthe*, e *Phomopsis longicolla* foi a espécie mais frequente. Diferindo dos estudos anteriores, Bezerra et al. (2012) e Freire et al. (2015) estudaram uma espécie de Cactaceae da Caatinga, não recuperaram espécies relacionadas aos gêneros citados.

De acordo Imbrahim et al. (2017), a taxa de colonização dos fungos endofíticos das folhas de árvores decíduas tendem a ser alta (80% a 100%). A taxa de colonização das folhas de *M. catimbauensis* foi considerada baixa (11,78%), quando comparada ao estudo de Zhou et al. (2015), que isolaram fungos endofíticos

de diferentes plantas de ambiente geotérmico, e obtiveram uma taxa de colonização fúngica variando entre as seis espécies vegetais testadas de 43,75% a 75,63%. O fato da taxa de colonização dos fragmentos de folhas de *M. catimbauensis* ter sido considerada baixa pode ser devido a presença de látex na composição do vegetal. O látex de algumas plantas da família Apocynaceae já foi descrito na literatura com ação antitumoral e antifúngica (SOUSA et al., 2010).

Nascimento et al. (2015), obtiveram uma taxa de colonização de 32,1% em folhas de *Calotropis procera*. Pádua et al. (2018), verificaram que a taxa de colonização de *Myracrodruon urundeuva* na Caatinga (10,41%) foi inferior a encontrada nos Brejos de Altitude (39,58%). Na pesquisa de Pieterse et al. (2018), fungos endofíticos de plantas da África do Sul apresentaram uma taxa de colonização de 52,6%.

Alguns autores afirmam que a diversidade de fungos endofíticos nos vegetais pode ser influenciada por diversos fatores, como o tipo e a idade dos tecidos vegetais, mudanças climáticas, relação entre fungo-planta hospedeira e etc. (Nascimento et al. 2015; Koide et al. 2017). Isso pode explicar a diferença na quantidade de fungos encontrados nas folhas de *M. catimbauensis*, quando comparada a de outras pesquisas.

No presente estudo, foi possível identificar isolados pertencentes a três classes, Eurotiomycetes, Sordariomycetes e Dothideomycetes. Resultado semelhante foi encontrado na pesquisa de Huang et al. (2016), onde isolaram fungos pertencentes as três classes anteriormente citadas, além de Leotiomycetes e Pezizomycetes. Doust et al. (2017) obtiveram dominância de isolados pertencentes a Dothideomycetes e Sordariomycetes, evidenciando um resultado similar ao encontrado neste estudo.

A curva de acumulação obtida no presente estudo mostrou que a comunidade de fungos endofíticos não foi recuperada em sua totalidade, e que o ponto de estabilização não foi alcançado. Semelhantemente a esse estudo, algumas pesquisas com fungos endofíticos de plantas de ambientes diversos, incluindo a floresta tropical seca, não conseguiram recuperar a totalidade dos fungos endofíticos (Murali et al. 2007; Bezerra et al. 2013; Silva-Hughes et al. 2015; Dastogeer et al. 2017).

Embora uma parcela da comunidade de fungos endofíticos de *M. catimbauensis* tenha sido recuperada nesse estudo, a descoberta de uma nova

espécie do gênero *Phyllosticta*, a qual, foi publicada por Crous et al. (2017) com o nome de *Phyllosticta catimbauensis*, foi importante para enriquecer esse estudo. Além disso, a importância da descoberta de vários táxons de fungos presentes em *M. catimbauensis* mostra que esse estudo é pioneiro em relatar fungos endofíticos dessa planta ameaçada de extinção. Essa descoberta encoraja ainda mais pesquisas com fungos endofíticos de ambientes secos, e alerta quanto a importância de estudar plantas de áreas endêmicas, além de estimular a realização de isolamento com novas ocorrências, o que poderá contribuir para a informação de espécies ainda não relatadas.

## **Conclusão**

Na pesquisa realizada constatou-se que a comunidade de fungos endofíticos presentes nas folhas de *M. catimbauensis* é diversa. Vários gêneros de fungos endofíticos foram identificados. Esse trabalho, serviu de base para um artigo de uma nova espécie do gênero *Phyllosticta* (*Phyllosticta catimbauensis*), ou seja, foi importante para catalogar e divulgar a existência não só da nova espécie, mas também, de todos os isolados encontrados. Esse é o primeiro estudo de fungos endofíticos nessa planta endêmica do Parque Nacional do Vale do Catimbau. Essa pesquisa servirá como base para realização de mais estudos, com o objetivo de aumentar o conhecimento acerca das espécies endofíticas, conhecer possíveis potenciais biotecnológicos desses endófitos e também traçar estratégias de conservação para o vegetal, tendo em vista ser uma planta que merece atenção por está enquadrada na categoria vulnerável a extinção.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsa de estudo registrada no processo IBPG- 0970-5. 05/14, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da

Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade Federal de Pernambuco. Também agradecemos a todos do laboratório de Micologia Ambiental do departamento de Micologia da UFPE, pela ajuda técnica em algumas etapas dessa pesquisa.

## Referências

Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK, Lacava PT (2002) Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. p. 86. Piracicaba, CALQ.

Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3):541–549. <http://www.jstor.org/stable/27651135>

Azevedo JL, Araújo WL (2007) Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds.) *Fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton 189-207

Banerjee D, Manna S, Mahapatra S, Pati BR (2009) Fungal endophytes in three medicinal plants of lamiaceae. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56:243-250. <http://doi.org/10.1556/AMicr.56.2009.3.4>

Barrow JR, Lucero ME, Reyes-Vera I, Havstad KM (2007) Endosymbiotic fungi structurally integrated with leaves reveals a lichenous condition of C4 grasses. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 43:65-70. <http://doi.org/10.1007/s11627-006-9007-4>

Bezerra JDP, Santos MGS, Svedese VM, Lima DMM, Fernandes MJS, Paiva LM, Almeida-Cortez JS, Souza-Motta CM (2012) Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 1989–1995. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-1001-2>.

Bezerra JDP, Santos MGS, Barbosa RN, Svedese VM, Lima DMM, Fernandes MJS, Gomes BS, Paiva LM, Almeida-Cortez JS, Souza-Motta CM (2013) Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis* 60(2):53-63. <http://doi.org/10.1007/s13199-013-0243-1>.

Bezerra JD P et al (2015) Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Braz J Microbiol* 46(1): 49-57. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246120130657>

Bezerra JDP, Oliveira RJV, Paiva LM, Silva GA, Groenewald JZ, Crous PW, Souza-Motta CM (2016) Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov. (class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. *Mycol Progress* 16(4): 297-309. <http://doi.org/10.1007/s11557-016-1254-0>

Bezerra JDP, Sandoval-Denis M, Paiva LM, et al. (2017) New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. *IMA Fungus* 8: 77–97. <http://doi:10.5598/ima fungus.2017.08.01.06>

Chow YY, Ting ASY. (2015) Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J of Adv Res* 6: 869–876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2014.07.005>

Crous, PW et al. (2017) Fungal Planet description sheets: 625-715. *Persoonia* 39:270-467. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.11>

Cruz, R, Lima JS, Fonseca JC, Fernandes MJS, Lima DMM, Duda GP, Moreira KA, Souza-Motta CM (2013) Diversity of filamentous fungi of area from Brazilian Caatinga and high-level tannase production using mango (*Mangifera indica* L.) and surinam cherry (*Eugenia uniflora* L.) leaves under SSF. *Adv in Microbiol* 3: 52-60. <http://doi.org/10.4236/aim.2013.38A009>

Cruz R, Ramos SMS, Fonseca JC, Souza-Motta CM, Moreira KA (2017) Anthropization effects on the filamentous fungal community of the Brazilian Catimbau National Park. *Rev Bras Cienc Solo* 41: 1-13. <http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbcs20160373>

Dastogeer KMG, Li H, Sivasithamparam K, Jones MGK, Wylie SJ (2017) Host specificity of endophytic mycobiota of wild nicotiana plants from arid regions of Northern Australia. *Microbial Ecology*, 75(1), 74–87. <http://doi.org/10.1007/s00248-017-1020-0>.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA (2002) Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: UNESP.

Doust NH, Akbarinia M, Safaie N, Yousefzadeh H, Bálint M (2017) Community analysis of Persian oak fungal microbiome under dust storm conditions. *Fungal Ecology* 29: 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.05.002>

Fernandes EG, Pereira OL, Silvia CC, Bento CBP, Queiroz MV (2015) Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. Microbiol Res 181: 84-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.05.010>

Figtree (2018) Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Version v.1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Fisher RA, Corbet AS, Williams CB (1943) 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. <http://doi.org/10.2307/1411>

Freire KTLS, Araujo GR, Bezerra JDP, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Paiva LM, Souza-Motta CM (2015) Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (COCKERELL, 1896) (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE). Gaia Scientia 9: 104-110.

Gehlot P, Bohra N, Purohit D (2008) Endophytic mycoflora of inner bark of *Prosopis cineraria*-a key stone tree species of Indian desert. American Eurasian Journal Botany 1:01–04.

Gunatilaka AAL (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. J Nat Prod 69: 509–526. <http://doi.org/10.1021/np058128n>.

Gupta VK, Sreenivasaprasad S, Mach RL (2015) Fungal bio-molecules: sources, applications and recent developments. 1st edn. Wiley-Blackwell, India 117–136.

Hsieh TC et al. (2018) Interpolation and extrapolation for species diversity. <http://chao.stat.nthu.edu.tw/blog/software-download/>

Huang Y, Cai Z, Hide KD, Corke H, Sun M (2007a) Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. World J Microbiol Biotechnol 23:1253–1263. <http://doi.org/10.1007/s11274-007-9357-z>

Huang Y, Cai Z, Xing J, Corke H, Sun M (2007b) A Potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants. Economic Botany 61(1): 14-30. <http://doi.org/10.1663/0013-0001>

Huang YL, Devan MM, U'ren JM, Furr SH, Arnold AE (2016) Pervasive effects of wildfire on foliar endophyte communities in montane forest trees. Microb. Ecol. 71, 452-468. <http://doi.org/10.1007/s00248-015-0664-x>

Ibrahim M, Sieber TN, Schlegel M (2017) Communities of fungal endophytes in leaves of *Fraxinus ornus* are highly diverse. Fungal Ecology 29: 10-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.05.001>

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2009) Sistemática Vegetal. Um enfoque filogenético, 3rd edn. Artmed, Porto Alegre.

Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple sequence alignment Software, version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Khidir HH et al. (2010) A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *J Arid Environ* 74:35-42. <http://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.07.014>

Koide RT, Ricks KD, Davis ER. 2017. Climate and dispersal influence the structure of leaf fungal endophyte communities of *Quercus gambelii* in the eastern Great Basin, USA. *Fungal Ecology* 30: 19-28. <https://doi.org/10.1016/J.FUNECO.2017.08.002>.

Köppen W. (1948) Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra. Fondo de Cultura Económica, México.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis, version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>, 2016.

Kuriakose GC, Palem PPC, Jayabaskaran C (2016) Fungal vincristine from *Eutypella* spp - CrP14 isolated from *Catharanthus roseus* induces apoptosis in human squamous carcinoma cell line -A431. *BMC Complement Altern Med* 16(1). <http://doi.org/10.1186/s12906-016-1299-2>

Larran S, Perelló A, Simón MR, Moreno V (2002) Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 683-686. <https://doi.org/10.1023/A:1016857917950>. 2002.

Leal IR et al. *Ecologia e Conservação da Caatinga*. 2. Ed. Recife: UFPE, 2005.

Lima TEF, Oliveira RJV, Neves RP, Bezerra JL, Cavalcanti MAQ (2013) Endophytic yeast of *Coffea arabica* and *Vitis labrusca* cv. Isabel from Pernambuco, Brazil. *Nova Hedwigia* 96(3-4):463-469. <http://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0080>

Lopez BR, Tinoco-Ojanguren, C, Bacilio M, Mendoza A, Bashan Y (2012) Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *Environ Exp Bot* 81:26– 36. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.014>

Maia LC et al. (2015) Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* 66: 1033-1045. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566407>

Massimo NC, Nandi DMM, Arendt KR, Wilch MH, Riddle JM, Furr SH, Steen C, U'ren JM, Sandberg DC, Arnold AE (2015) Fungal endophytes in aboveground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. *Microb Ecol* 70(1):61–76. <http://doi.org/10.1007/s00248-014-0563-6>

Melo JIM (2012) Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. *Biotemas* 25: 109-120. <http://doi.org/10.5007/2175-7925.2012v25n4p109>

Mendiburu F. 2017. *Agricolae* tutorial, version 1.2-8. pp. 97.

Milne I, Wright F, Rowe G, Marshall DF, Husmeier D, McGuire G (2004) TOPALi: software for automatic identification of recombinant sequences within DNA multiple alignments. *Bioinformatics* 20: 1806-1807. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth155>. 2004.

Murali TS, Suryanarayanan TS, Venkatesan, G (2007) Fungal endophytes communities in two tropical forest of southern India: diversity and host affiliation. *Mycological Progress* 6:191-199. <http://doi.org/10.1007/s11557-007-0540-2>

Nascimento TL, Oki Y, Lima DMM, Almeida-Cortez JS, Fernandes GW, Souza-Motta CM (2015) Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecol* 14:79–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.004>

Nithya K, Muthumary J (2011) Bioactive metabolite produced by *Phomopsis* sp., an endophytic fungus in *Allamanda cathartica* Linn. *Recent Research in Science and Technology* 3(3): 44-48. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/636>.

Oksanen J et al. (2018) *Community Ecology Package, Version 2.5-2*. <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>

Pádua APSL, Freire KTLS, et al. (2018) Fungal endophyte diversity from leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian tropical dry forest and their capacity to produce L-asparaginase. *Acta Bot Bras.* (Aceito para publicação).

Palem PPC, Kuriakose GC, Jayabaskaran C (2015) An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. *Plos One*, 10(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0144476>

Pieterse K, Avelinga TAS, Jacobs A, Don A, Cowan DA, Pires IMO, Silva AV, Santos MGS, Bezerra JDP, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Souza-Motta CM, Paiva LM (2018) Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma Floresta Tropical Seca no Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia* 9(2): 163-169.

Pires IMO et al. (2015) Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma Floresta Tropical Seca no Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia* 9(2):155-161.

Rocha LGM et al. (2010) Parques nacionais brasileiros: problemas fundiários e alternativas para sua resolução. *Rev Sociol Polít* 18(36): 205-226.

Rodal MJL, Andrade KVS, Sales MF, Gomes APS (1998) Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. *Rev Bras Biol* 58: 517-526. <http://doi.org/10.1590/s0034-71081998000300017>

Rodrigues KF, Petrini O (1997) Biodiversity of endophytic fungi in Tropical Regions. Hyde, K.D. (ed.). *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong, China: Hong Kong University Press 57-69,

Rodrigues KF, Costa GL, Carvalho MP, Epifânio RA (2005) Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. *World J Microbiol Biotechnol* 21:1617–1621. <http://doi.org/10.1007/s11274-005-8344-5>

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>. 2003.

Sales MF, Kinoshita LS, Simões AO (2006) Eight new species of *Mandevilla* Lindley (Apocynaceae, Apocynoideae) from Brazil. *Novon* 16: 112–128. [http://dx.doi.org/10.3417/1055-3177\(2006\)16\[112:ensoml\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.3417/1055-3177(2006)16[112:ensoml]2.0.co;2)

Santos IP, Bezerra JDP, Souza-Motta CM, Cavalcanti MS, Lima VLM (2015) Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. *Afr J Microbiol Res* 9(18): 1227-1235. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7369>

Shannon C, Weaver W (1949). *The mathematical theory of communication*. Urbana and Chicago, University of Illinois Press.

Silva LF, et al. (2018) *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, bromeliad endemic from the Brazilian tropical dry forest, and their potential to L-asparaginase production. *World J Microbiol Biotechnol* (Aceito para publicação).

Silva-Hughes AF, Wedge DE, Cantrell CL, et al. 2015. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiol Res* 175: 67-77. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2015.03.007>.

Simões AO, Endress ME, Niet VT, Kinoshita LS, Conti E (2004) Tribal and intergeneric relationships of Mesechiteae (Apocynoideae, Apocynaceae): evidence from three noncoding plastid DNA regions and morphology. *Am J Bot* 91: 1409-1418. <http://www.jstor.org/stable/4123938>

Sing DK, Sharma VK, Kumar J et al. (2017) Diversity of endophytic mycobiota of tropical tree *Tectona grandis* Linn.f.: Spatiotemporal and tissue type effects. *Scientific Reports* 7: 3745. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-03933-0>

Sousa EL, Grangeiro ARS, Bastos IVGA, Rodrigues, G. C. R, Silva MJ, Anjos FBR, Souza IA, Souza CL (2010) Atividade anti-tumor de folhas de *Himatanthus drasticus* (mart.) Plumel - Apocynaceae (janaguba) no tratamento de tumor Sarcoma 180. *Braz J of Pharmaceutic Sci*,46:2.

Souza-Silva RF, Rapini A, Morales JF (2010) *Mandevilla catimbauensis* (Apocynaceae), A new species from the semi-arid Region, Pernambuco, Brazil. *Ed J of Botany* 67(01):1. <http://doi.org/10.1017/S0960428609990230>

Stone JK, Bacon W, White JF. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon, C. W.; White, J. F. editors. *Microbial endophytes*. New York: Dekker.

Sun JQ, Guo LD, Zang W, Ping WX, Chi DF (2008) Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Science in China*51(8): 751-759. <http://doi.org/10.1007/s11427-008-0091-z>

Suryanarayanan TS, Kumaresan V, Johnson JA (2001) Fungal endophytes: the tropical dimension. In *Trichomycetes and other fungal groups*. Edited by J.K. Misra and B.W. Horn. Science Publishers, Inc., Enfield, NH 197–207

Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G (2002) Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Can J Bot* 80: 818–826. <http://doi.org/10.1139/b02-069>

Van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson, V. (1998) PCR in studies of AM fungi: from studies to application. *Mycorrhiza manual* 387–400. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60268-9\\_24](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-60268-9_24)

Venieraki A, Dimou M, Katinakis P (2017) 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. <http://doi.org/10.1515/hppj-2017-0006>

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds.) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York, Academic Press 315-322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>, 1990.

Yin H, Sun YH (2011) Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. *Phytomedicine* 18: 802–805. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.005>

Zhou WN, White JF, Soares MA, Torres MS, Zhou ZP, LI HY (2015) Diversity of fungi associated with plants growing in geothermal ecosystems and evaluation of their capacities to enhance thermotolerance of host plants. *Journal of Plant Interactions* 10(1): 305–314. <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2015.1101495>

## CAPÍTULO II

### **Potencial biotecnológico para produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de *Mandevilla catimbauensis* (Apocynaceae) planta endêmica da floresta tropical seca do Brasil**

Gianne R. Araújo-Magalhães<sup>1</sup>, Jadson D. P. Bezerra<sup>2</sup>, Karla T. L. S. Freire<sup>2</sup>, Leticia F. Silva<sup>2</sup>,  
Gualberto Agamez Montalvo<sup>3</sup>, Laura M. Paiva<sup>2</sup>, Cristina M. Souza-Motta<sup>2</sup>, Adalberto Pessoa- Junior<sup>4</sup>,  
Keila A. Moreira<sup>5</sup>

gianne.rizzuto@gmail.com

jadsondpb@hotmail.com

kkfreire@hotmail.com

ticiafs@hotmail.com

gsagamez@gmail.com

mesquitapaiva@terra.com.br

souzamotta@yahoo.com.br

pessoajr@usp.br

moreirakeila@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, Brasil.

<sup>5</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

\*Autor correspondência: Keila Aparecida Moreira, Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG, Avenida Bom Pastor, s/n.º, Bairro Boa Vista - CEP: 55292-272 - Garanhuns – PE, Tel: (87) 3764-5568  
e-mail: moreirakeila@hotmail.com

## Resumo

A produção de L-asparaginase foi estudada em 20 isolados de 10 gêneros de fungos endofíticos de *M. catimbauensis*, planta endêmica da Caatinga. No total de 14 fungos apresentaram capacidade de produzir a enzima ( $0,48 \text{ U g}^{-1}$  –  $2,22 \text{ U g}^{-1}$ ). *Phyllosticta catimbauensis* exibiu capacidade de produção significativa ( $2,22 \text{ U g}^{-1}$ ), e foi selecionada para realizar um planejamento fatorial  $2^3$  com quatro pontos centrais com objetivo de melhorar a produção de L-asparaginase. Variáveis como concentração de L-asparagina, pH e quantidade de inóculo (biomassa fúngica) foram consideradas importantes no planejamento. Após o planejamento fatorial a produção enzimática foi de  $2,25 \text{ U g}^{-1}$ , utilizando 1,5 g de L-asparagina, pH 5 e 1,5 g de inóculo. Posteriormente, foi realizada uma sequência experimental baseada nos resultados do planejamento anterior e foi possível obter um aumento significativo na produção de L-asparaginase de  $3,50 \text{ U g}^{-1}$ , utilizando 3,5 g de L-asparagina, pH 4,2 e 1 g de inóculo. Esse estudo demonstra que alguns endófitos de *M. catimbauensis* possui potencial biotecnológico para produção de L-asparaginase, e que *Phyllosticta catimbaunesis* é a espécie com melhor potencial de produção. As informações contidas nesse estudo, são fundamentais para o conhecimento de novas fontes eucarióticas produtoras de L-asparaginase.

**Palavras chave:** Enzima. L-asparagina. Planejamento fatorial.

## Introdução

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas, de maneira simbiótica, colonizam tecidos vegetais, sem prejudicar o hospedeiro (Peixoto Neto et al. 2002). Através da relação simbiótica com a planta hospedeira, os microrganismos são capazes de produzir diversos compostos com a finalidade de promover o crescimento vegetal, proteger contra insetos herbívoros, além de proporcionar uma maior resistência a micro-organismos fitopatogênicos (Waqas et al. 2012; Zhou et al. 2016.) Em contrapartida, a planta hospedeira pode oferecer um ambiente favorável, com maior estrutura espacial, disponibilidade de nutrientes e proteção (Peixoto Neto et al. 2004).

Estudos demonstram que a floresta tropical seca brasileira conhecida como Caatinga, abriga uma diversidade de fungos endofíticos. Esses fungos foram relatados em plantas da família Cactaceae, Fabaceae, Bromeliaceae e Apocynaceae (Bezerra et al. 2013, 2017; Freire et al. 2015; Crous et al. 2017; Pádua et al. 2018; Silva et al. 2018). Estudos com esses endófitos enriquecem o conhecimento a cerca dos fungos que habitam ambientes secos, e contrariam pesquisas que afirmam existir uma maior diversidade de fungos endofíticos em plantas de floresta temperadas e tropicais úmidas (Rodrigues e Petrini 1997; Chandra 2012; Lima et al. 2013).

Pesquisas com resultados promissores foram realizadas com o objetivo de estudar a capacidade biotecnológica dos fungos endofíticos de ambientes secos, na produção de biomoléculas de interesse industrial, como por exemplo, a enzima L-asparaginase (Santos et al. 2015; Pádua et al. 2018; Silva et al. 2018).

A L-asparaginase é uma enzima utilizada como fármaco no tratamento quimioterápico de diversos cânceres em humanos e animais (Loureiro 2010; Schleis et al. 2011; Devi e Azmi 2012; Guilleme et al. 2013). Seu mecanismo de ação age na redução extracelular do aminoácido L-asparagina, as células neoplásicas não são capazes de produzir L-asparagina sintetase suficiente para a manutenção e rápido crescimento, o que compromete as funções celulares resultando na inibição da síntese protéica e indução por apoptose das células tumorais (Guilleme et al. 2013).

A L-asparaginase comercializada para o tratamento quimioterápico é de origem bacteriana, produzida por *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953; Dye 1969; Samson et al. 2005). O uso dessa enzima a longo

prazo em pacientes, pode causar reações alérgicas, hipersensibilidade e até anafilaxia (Sarquis et al. 2004).

Além de seu uso como fármaco, a L-asparaginase também é utilizada na indústria alimentícia, na redução dos níveis de acrilamida nos alimentos termicamente tratados (Hendriksen et al. 2009; Kornbrust et al. 2009). A acrilamida é um composto químico cancerígeno e neurotóxico para os seres humanos e outros animais. A enzima age reduzindo por hidrólise o nível de asparagina livre, sem atingir os demais aminoácidos, resultando na remoção de um dos precursores essenciais para formação de acrilamida (Hendriksen et al. 2009). A L-asparaginase comercializada na indústria de alimentos tem origem fúngica, e é proveniente das espécies *Aspergillus oryzae* e *A. niger* (Krishnakumar e Visvanathan 2014).

Os estudos sobre novas fontes microbianas de produção da L-asparaginase tendem a aumentar nos próximos anos, uma vez que, é preciso suprir a demanda nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (Gurunathan e Sahdevan 2010; Jha et al. 2012; Lopes et al. 2015). Não existe na literatura relatos de estudos sobre o potencial biotecnológico para produção de L-asparaginase por fungos endofíticos isolados de *Mandevilla catimbaunesis*, planta da família Apocynaceae. Essa espécie foi descrita por Souza-Silva et al. (2010), e é uma planta da floresta tropical seca brasileira (Caatinga), exclusiva do Parque Nacional do Vale do Catimbau e possui distribuição restrita no parque.

Diante do exposto anteriormente, esse estudo teve como objetivo, investigar o potencial biotecnológico para produção de L-asparaginase, dos fungos endofíticos previamente isolados de *M. catimbauensis*, uma planta endêmica da Caatinga, ameaçada de extinção e ausente de estudos sobre o potencial biotecnológico dos seus endófitos.

## **Material e Métodos**

### **Seleção dos fungos endofíticos**

Foram selecionados aleatoriamente 20 isolados de fungos endofíticos de *Mandevilla catimbauensis* (Souza-Silva et al. 2010) (Apocynaceae) coletada no Parque Nacional do Vale do Catimbau-PE (Tabela 1).

**Tabela 1.** Fungos endofíticos selecionados para produção de L-asparaginase isolados de *Mandevilla catimbuensis*.

<b>Espécies</b>	<b>Número de depósito na URM ou número do isolado</b>
<i>Alternaria</i> (complexo)	G22
<i>Alternaria</i> (complexo)	G7
<i>Cladosporium</i> (complexo)	G45
<i>Collophorina</i> (Tympanidaceae incerte sedis)	G48
<i>Diaporthe</i> sp.	G30
<i>Diaporthe</i> sp.	G25
<i>Phyllosticta catimbauensis</i>	URM7672 – G8
<i>P. catimbauensis</i>	G12
<i>P. catimbauensis</i>	URM 7673 – G16
<i>P. catimbauensis</i>	G20
<i>P. capitalensis</i>	G13
<i>P. catimbauensis</i>	URM 7674 - G14
<i>P. capitalensis</i>	G21
<i>Preussia</i> sp.	G37
<i>Pseudocercospora</i> sp.	G46
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	G6
<i>P. stromaticum</i>	G41
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	G24
<i>Talaromyces borbonicus</i>	G60
<i>T. borbonicus</i>	G61

#### Produção de L-asparaginase em fermentação submersa

A enzima L-asparaginase foi produzida em meio de cultura Czapek Dox's modificado (CDM) (Gulati, Saxena e Gupta 1997), constituído por glicose (2,0 g L<sup>-1</sup>), L-asparagina (10,0 g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,52 g L<sup>-1</sup>), KCl (0,52 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,52 g L<sup>-1</sup>), CuNO<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O (0,01 g L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g L<sup>-1</sup>), pH 6,2. Na etapa de pré-fermentação, 100 mL do meio CDM contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL) foram utilizados, com modificação apenas na quantidade de glicose (14 g L<sup>-1</sup>) e adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 g L<sup>-1</sup>) ao meio de cultura. Discos de 5mm de culturas fúngicas com sete dias de crescimento foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (250 mL) e incubados a 30 °C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período, todas as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e a biomassa micelial foi utilizada na etapa de fermentação.

Na etapa de fermentação, a biomassa coletada na pré-fermentação, foi inoculada em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do meio CDM. Em

seguida incubados a 30 °C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1. O micélio obtido foi utilizado para quantificar a atividade enzimática (Loureiro et al. 2012).

#### Quantificação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi quantificada de acordo com Drainas e Pateman (1977) modificado. A solução para determinar a atividade foi composta de 1,5 mL Tris-HCl (20 mM, pH 8,6), 0,2 mL solução de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL solução de hidroxilamina (1 M) e 0,1 g de biomassa fúngica. O tampão Tris-HCl foi adicionado a biomassa de cada cultura (0,1 g), em seguida, o material foi homogeneizado e agitado no vórtex. Apenas nas amostras foram adicionadas as soluções de L-asparagina e hidroxilamina. Tanto as amostras quanto os brancos (biomassa e Tris-HCl) foram incubados a 37 °C, 150 rpm, por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado à mistura, 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl [10% (p/v) de FeCl<sub>3</sub> mais ácido tricloroacético a 5% (p/v) em 0,66 mM de HCl] em todas as amostras e brancos. Posteriormente, nos brancos foram acrescentadas as soluções de L-asparagina e hidroxilamina e centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos. Após centrifugação, foi realizada a leitura dos sobrenadantes das amostras em espectrofotômetro a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de β-hidroxâmico aspártico por minuto a 37 °C. Todas as análises foram comparadas ao branco da amostra.

#### Seleção das melhores condições de produção de L-asparaginase

Um planejamento experimental estatístico (2<sup>3</sup> com quatro pontos centrais) (Myers e Montgomery 1995; Box et al. 2005) foi desenvolvido, com o objetivo de verificar a influência das variáveis para a produção de L-asparaginase do melhor produtor enzimático (Tabela 2). Foram avaliadas as influências das variáveis: concentração de L-asparagina, pH, e concentração de inóculo.

Nesta etapa, as condições da pré-fermentação foram as mesmas descritas anteriormente. A fermentação ocorreu em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do meio CDM modificado foram utilizados, onde as variáveis utilizadas foram ajustadas em cada frasco de acordo com o planejamento seguido (Tabela 2). Estes frascos foram incubados por 120 horas a 30 °C e 120 rpm. Após a incubação, a

biomassa foi filtrada e utilizada para quantificar a atividade L-asparaginásica (Drainas e Pateman 1977).

**Tabela 2.** Planejamento fatorial estatístico  $2^3$  com quatro pontos centrais para seleção das melhores condições de produção de L-asparaginase pelo endófito *Phyllosticta catimbauensis*

Ensaio	L-asparagina (%)	pH	Inóculo (g)
1	0,5	5,0	0,5
2	1,5	5,0	0,5
3	0,5	7,0	0,5
4	1,5	7,0	0,5
5	0,5	5,0	1,5
6	1,5	5,0	1,5
7	0,5	7,0	1,5
8	1,5	7,0	1,5
9	1	6,0	1
10	1	6,0	1
11	1	6,0	1
12	1	6,0	1

Com base nos resultados obtidos no planejamento fatorial, foi realizada uma sequência experimental com o objetivo de aumentar a produção enzimática (Tabela 3).

**Tabela 3.** Sequência experimental para melhor produção de L-asparaginase pelo endófito *Phyllosticta catimbauensis*

Ensaio	Asparagina (%)	pH	Inóculo (g)
1	1,5	5	1
2	1,5	4,6	1
3	2,5	4,6	1
4	2,5	4,2	1
5	3,5	4,2	1
6	4,5	4,2	1

#### Análise estatística

Todos os resultados obtidos de atividade enzimática dos fungos endofíticos de *M. catimbauensis* foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Este teste foi utilizado para verificar a existência de diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as atividades enzimáticas produzidas pelos endófitos.

Para os resultados obtidos na otimização da produção de L-asparaginase, utilizou-se o teste F (ANOVA). Este teste foi realizado para verificar e avaliar a relação entre as variáveis independentes selecionadas e a produção enzimática. O

software R (R Core Team 2015) foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas.

## Resultados

Dos 20 fungos endofíticos testados para produção de L-asparaginase, 14 isolados apresentaram capacidade de produzir a enzima com valores variando de  $0,48 \text{ U g}^{-1}$  –  $2,22 \text{ U g}^{-1}$ . Com base nos resultados obtidos no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível verificar a existência de oito grupos (A-H) de acordo com a produção enzimática apresentada. O valor de p obtido no teste foi 0,0056, sendo possível afirmar que pelo menos um grupo dos isolados foi estatisticamente diferente dos demais. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. Os maiores valores estatisticamente diferentes foram classificados no grupo A e foram obtidos dos isolados G8 e G45 ( $2,22 \text{ U g}^{-1}$  e  $2,11 \text{ U g}^{-1}$ ), respectivamente. Outro grupo também se destacou quanto a produção enzimática (grupo B) apresentando atividades variando de  $0,80 \text{ U g}^{-1}$  a  $1,11 \text{ U g}^{-1}$ . Os isolados *Alternaria* (complexo) (G7), *P. capitalensis* (G13), *Alternaria* (complexo) (G22), *P. stromaticum* (G41), *Collophorina* (Tympanidaceae incerte sedis) (G48) e *T. borbonicus* (G61) não apresentaram capacidade de produzir a enzima L-asparaginase (grupo H).

**Tabela 4.** Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de *Mandevilla catimbauensis*

Espécies	Número de depósito URM ou Isolado	Média da atividade das absorbâncias ( $\text{U g}^{-1}$ )
<i>P. catimbauensis</i>	URM 7672 - G8	2,22 <sup>a</sup>
<i>Cladosporium</i> (complexo)	G45	2,11 <sup>a</sup>
<i>T. borbonicus</i>	G60	1,11 <sup>b</sup>
<i>Preussia</i> sp.	G37	0,95 <sup>b</sup>
<i>Diaporthe</i> sp.	G30	0,80 <sup>b</sup>
<i>P. catimbauensis</i>	URM 7673 - G16	0,99 <sup>bc</sup>
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	G24	0,79 <sup>bc</sup>
<i>P. capitalensis</i>	G21	0,76 <sup>cd</sup>
<i>P. catimbauensis</i>	G20	0,75 <sup>de</sup>
<i>P. stromaticum</i>	G6	0,61 <sup>ef</sup>
<i>P. catimbauensis</i>	URM 7674 - G14	0,57 <sup>ef</sup>
<i>Diaporthe</i> sp.	G25	0,56 <sup>fg</sup>

<i>P. catimbauensis</i>	G12	0,48 <sup>g</sup>
<i>Pseudocercospora</i> sp.	G46	0,48 <sup>g</sup>
<i>Alternaria</i> (complexo)	G22	0,00 <sup>h</sup>
<i>Alternaria</i> (complexo)	G7	0,00 <sup>h</sup>
<i>Collophorina</i> (Tympanidaceae incerte sedis)	G48	0,00 <sup>h</sup>
<i>P. capitalensis</i>	G13	0,00 <sup>h</sup>
<i>P. stromaticum</i>	G41	0,00 <sup>h</sup>
<i>T. borbonicus</i>	G61	0,00 <sup>h</sup>

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p = 0,0056$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente uma da outra. Os endófitos listados (grupo H) não apresentaram atividade de L-asparaginase

Entre todos os isolados testados, o endófito *P. catimbaunesis* URM 7672 destacou-se por apresentar maior produção de L-asparaginase. Por isso, foi selecionado para realizar a etapa posterior de seleção das melhores condições de produção enzimática, sendo submetido a um modelo de planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Uma informação relevante sobre esse endófito, é que essa espécie (*Phyllosticta catimbaunesis*) foi recentemente descoberta e publicada por Crous et al. (2017), e até o presente momento, não existem estudos sobre seu potencial biotecnológico.

No planejamento fatorial realizado para melhorar a produção da L-asparaginase, foi possível obter uma produção enzimática variando de 2,25 U g<sup>-1</sup> a 0,61 U g<sup>-1</sup> (Tabela 5). As melhores condições de produção foram obtidas no ensaio seis, com 1,5 g de L-asparagina, pH 5 e 1,5 g de inóculo.

**Tabela 5.** Produção enzimática de *Phyllosticta catimbauensis* URM 7672 em um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com quatro pontos centrais

Ensaio	Asparagina (g)	pH	Inóculo (g)	Atividade (U g <sup>-1</sup> )
1	0,5	5	0,5	0,61
2	1,5	5	0,5	2,03
3	0,5	7	0,5	1,07
4	1,5	7	0,5	1,38
5	0,5	5	1,5	1,46
6	1,5	5	1,5	2,25
7	0,5	7	1,5	0,67
8	1,5	7	1,5	1,81
9	1	6	1	1,7
10	1	6	1	1,85
11	1	6	1	1,46

12                      1                      6                      1                      1,54

---

De acordo com os valores obtidos no planejamento fatorial, foi realizada uma sequência experimental com as variáveis ajustadas para a obtenção de uma maior produção enzimática (Tabela 6).

**Tabela 6.** Sequência experimental para aumentar a produção enzimática do endófito *Phyllosticta catimbauensis* URM 7672

Ensaio	Asparagina (%)	pH	Inóculo (g)	Atividade (U g <sup>-1</sup> )
1	1,5	5	1	2,33
2	1,5	4,6	1	2,49
3	2,5	4,6	1	1,13
4	2,5	4,2	1	3,47
5	3,5	4,2	1	3,5
6	4,5	4,2	1	2,91

Foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Tabela 7) para determinar se existiu diferença estatisticamente significativa entre a produção enzimática dos diferentes tratamentos realizados, obtendo-se um valor de p de 0,0155. Foi possível observar a formação de três grupos distintos (A-C). Os melhores valores de produção enzimática foram encontrados nos ensaios 4 e 5 (3,47 U g<sup>-1</sup> e 3,50 U g<sup>-1</sup>) respectivamente. De acordo com o teste não existiu diferença significativa entre esses valores de atividade. Ambos os ensaios possuíam o mesmo pH (4,2) e concentração de inóculo (1 g), porém, diferiram apenas na concentração de asparagina, onde no ensaio 4 tinha 2,5 g e no ensaio 5 foi de 3,5 g. Pelo fato de não haver diferença significativa entre os ensaios, pode-se considerar que o ensaio quatro por utilizar uma menor quantidade de substrato L-asparagina (2,5 g) foi considerado o melhor.

**Tabela 7.** Atividade da L-asparaginase por *Phyllosticta catimbauensis* URM 7672 obtida através das melhores condições da sequência experimental

Ensaio	Atividade Absorbâncias 1	Atividade Absorbâncias 2	Atividade Absorbâncias 3	Média das atividades das

	(U g <sup>-1</sup> )	(U g <sup>-1</sup> )	(U g <sup>-1</sup> )	Absorbâncias (U g <sup>-1</sup> )
1	2,32	2,26	2,41	2,33 <sup>bc</sup>
2	2,05	2,34	3,09	2,49 <sup>b</sup>
3	1,05	1,13	1,22	1,13 <sup>c</sup>
4	3,23	3,74	3,43	3,47 <sup>a</sup>
5	3,54	3,03	3,94	3,50 <sup>a</sup>
6	2,55	3,09	3,09	2,91 <sup>ab</sup>

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p = 0,0155$ ). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente uma da outra.

## Discussão

Estudos sobre a produção de L-asparaginase por fungos endofíticos tem aumentado ao longo dos últimos anos, com o intuito de obter uma enzima com menores efeitos colaterais, oriunda de uma fonte eucariota e com aplicação nos diversos setores industriais (Kumar et al. 2005, 2013; Theantana et al. 2009; Nagarajan et al. 2014; Chow e Ting et al. 2015; Silva et al. 2018). A maioria dos fungos endofíticos isolados de *M. catimbauensis* utilizados no presente estudo, possuem capacidade de produzir a enzima L-asparaginase.

A produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de plantas da Caatinga foi relatada por Santos et al. (2015), Pádua et al. (2018) e Silva et al. (2018), destacando como melhores produtores enzimáticos os isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Diaporthe* e *Talaromyces*, respectivamente. Esses resultados diferem dos encontrados no presente estudo, no qual, os melhores produtores de L-asparaginase pertencem aos gêneros *Phyllosticta* e *Cladosporium*. Chow e Ting (2015) estudaram a produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de plantas com propriedades anticancerígenas e constataram que isolados de *Fusarium* e *Penicillium* se destacaram na produção da enzima.

Theantana et al. (2007) estudando fungos endofíticos de plantas da Tailândia, obtiveram níveis de produção de L-asparaginase variando entre 0,014 e 1,530 U mL<sup>-1</sup>. Krishnapura e Belur (2016) encontraram em suas pesquisas com fungos endofíticos uma produção de L-asparaginase muito superior, variando entre 54,17 e 155,93 U mL<sup>-1</sup>. Os autores citados anteriormente utilizaram metodologias de quantificação enzimática distinta (técnica de nesslerização e utilização do filtrado) das utilizadas nessa pesquisa. Sabendo disso, para que haja uma comparação com os resultados obtidos no presente estudo, deve-se levar em consideração as técnicas utilizadas para determinação da enzima.

Durante essa pesquisa, foi utilizada a biomassa fúngica para verificar a produção enzimática através da quantificação do  $\beta$ -hidroxâmico ácido aspártico. Através desse método, foi possível obter uma produção inicial de L-asparaginase por *P. catimbauensis* de  $2,22 \text{ U g}^{-1}$ . Pádua et al. (2018) testaram a produção de L-asparaginase por um isolado de *Phyllosticta* sp. e obtiveram uma atividade enzimática de  $0,57 \text{ U g}^{-1}$ , além disso, utilizando a mesma técnica de quantificação, constaram uma maior produção enzimática por *Diaporthe* sp ( $2,41 \text{ U g}^{-1}$ ). Semelhantemente, Silva et al. (2018) obtiveram uma atividade enzimática de  $2,30 \text{ U g}^{-1}$  pelo endófito *Talaromyces* cf. *cecidicola*.

A produção enzimática por fungos filamentosos pode sofrer influência de diversos fatores como pH, temperatura, disponibilidade de água, nutrientes, oxigênio, fontes de carbono e nitrogênio (Gurunathan e Sahadevan 2011). Além disso, os diferentes componentes do meio de cultura, as condições de fermentação e a taxa de agitação também podem interferir na produção da enzima (Dias e Sato 2016).

Gurunathan e Sahadevan (2011) estudaram vários modelos estatísticos para a melhor condição de produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus*, verificaram que o nitrato de sódio, a sacarose e a L-asparagina são componentes significativos no processo de produção enzimática. No presente estudo, no modelo experimental aplicado, foram consideradas como variáveis importantes, a concentração de L-asparagina, o pH e quantidade de biomassa fúngica.

De acordo com Bedaiwy et al. (2016), as melhores condições de produção de L-asparaginase com a espécie *Aspergillus tamaris* ( $11,11 \text{ U mL}^{-1}$ ), foi utilizando o pH 7, temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e concentração de L-asparagina de 1%. No planejamento realizado, utilizando pH 5, 1,5% de L-asparagina e uma quantidade de inóculo de 1,5 g, constatou-se que não houve um aumento significativo na produção da enzima ( $2,25 \text{ U/g}$ ). Planejamento semelhante foi realizado por Silva et al. (2018) e verificaram que a melhor produção enzimática obtida por *Talaromyces* cf. *cecidicola* ( $1,02 \text{ U g}^{-1}$ ), foi utilizando pH 7, concentração de L-prolina de 0,5% e quantidade de inóculo de 3,5 g.

Niharika e Supriya (2014) verificaram que *Fusarium oxysporum* obteve a melhor produção enzimática utilizando 1% de L-asparagina, pH 5 ( $105,0 \text{ U mL}^{-1}$ ) e que a sacarose e a glicose foram as melhores fontes de carbono para produção de L-asparaginase. Na sequência experimental realizada para melhorar a produção

enzimática, a melhor condição encontrada ( $3,50 \text{ U g}^{-1}$ ) foi utilizando o pH 4,2, concentração de L-asparagina de 3,5% e quantidade de inóculo de 3,5 g. Essa diferença entre os valores das variáveis, sugere que cada microrganismo tem um comportamento específico para produção da enzima.

## **Conclusão**

Os resultados desse estudo revelam que os fungos endofíticos de *M. catimbauensis* possuem potencial para produzir a enzima L-asparaginase. Sendo a primeira investigação sobre o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *M. catimbauensis*, planta endêmica da floresta tropical seca brasileira. A espécie fúngica *P. catimbauensis* recentemente descrita e publicada se destacou quanto à produção enzimática. Essa pesquisa dará suporte e direcionamento aos pesquisadores para estudos mais aprofundados sobre novas fontes produtoras de L-asparaginase. São necessários estudos mais detalhados sobre as melhores condições de produção enzimática, cinética e bioquímica, para futuramente conseguir obter uma enzima purificada e viável para comercialização, tendo em vista, toda a importância industrial dessa enzima.

## **Agradecimentos**

Agradecemos a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsa de estudo registrada no processo IBPG- 0970-5. 05/14, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Programa de Pós Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade Federal de Pernambuco. Também agradecemos a todos do laboratório de Micologia Ambiental do departamento de Micologia da UFPE, pela ajuda técnica em algumas etapas dessa pesquisa.

## Referências

- Bedaiwy, M.Y. et al. 2016. Optimal conditions for production of L -asparaginase from *Aspergillus tamaritii*. *Egypt. Jour. Exp. Biol. (Botany)*. 12(2):229–237.
- Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Barbosa, R.N., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Gomes, B.S., Paiva, L.M., Almeida-Cortez, J.S., Souza-Motta, C.M. 2013. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis*. 60(2):53–63.
- Box, G.E.P., Hunter, J.S., Hunter, W.G. 2005. *Statistics for experimenters: design, Innovation, and Discovery*. Wiley, New Jerse.
- Burkholder, W.H., Mcfadden, L.A., Dinock, A.V.A. 1953. Bacterial blight of *chrysanthemums*. *Phytopathology*, 43:522-526,
- Chandra, S. 2012. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *App Microb Biotech*. 95:47–59.
- Chow, Y.Y., Ting, A.S.Y. 2015. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J of Adv Res*. 6: 869–876.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2014.07.005>
- Crous, P.W., Wingfield, M.J., Burgess, T.I. et al. 2017. Fungal Planet description sheets: 625–715. *Persoonia*. 39:270–467.
- Devi, S., Azmi, W. 2012. One step purification of glutaminase free L-asparaginase from *Erwinia carotovora* with anticancerous activity. *Int J Life Sci Pharma Res*. 2(3):36–45.
- Drainas C, Kinghorn J.R., Pateman J.A. 1977. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*. 98(2):493–501.
- Dye, D.W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. *N. Z. J. Scie Technol*. 12:223-236.

Freire, K.T.L.S., Araújo, G.R., Bezerra, J.D.P., Barbosa, R.N., Silva, D.C., Svedese, V.M., Souza-Motta, C.M. 2015. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica*. (L.) Mill.(Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). Gaia Scientia. 9(2):104–110.

Guilleme, C.M., Delgado, R.F., Navarro, J.S., Aguirre, I.A., Solà, S.R., Codina, J.S.T. et al. 2013. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. An Pediatr. 79(5):329. e1–329.e11.

Gulati, R., Saxena, R.K, Gupta, R. 1997. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. Lett Appl Microbiol. 24(1):23–26.

Gurunathan, B. Sahadevan, R. 2011. Design of Experiments and Artificial Neural Network Linked Genetic Algorithm for Modeling and Optimization of L-asparaginase Production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. Biotech and Bioprocess Engin. 16: 50-58.

Hendriksen, H.V., Kornbrust, B.A., Østergaard, P.R., Stringer, M.A. 2009. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. J Agric Food Chem. 57(10):4168–4176.

Jha, S.K., Pasrija, D., Sinha, R.K., Singh, H.R., Nigam, V.K., Vidyarthi, A.S. 2012. Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects. Int J Pharm Sci Res 3(9):3076–3090.

Krishnakumar, T., Visvanathan, R. 2014. Acrylamide in food products: a review. J Food Process Technol. 5(7):1–9.

Krishnapura, P.R., Belur, P.D. 2016. Partial purification and characterization of L-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. Jour Molec Catal B: Enzym. 124, 83–91. doi:10.1016/j.molcatb.2015.12.007

Kornbrust, B.A., Stringer, M.A., Lange, N.E.K., Hendriksen, H.V. 2009. Asparaginase—an enzyme for acrylamide reduction in food products. In: Whitehurst RJ, Oort MV (eds) Enzymes in food technology, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, pp 59–87.

Kumar, D.S., Lau, C.S., Wan, J.M., Yang, D., Hyde, K.D. 2005. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothès*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. Life Scie 78: 147–156.

Kumar, N.S.M., Manonmani, H.K. 2013. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *W Jour Microbiol Biotech.* 29(4):577-587.

Lima, T.E.F., Oliveira, R.J.V., Neves, R.P., Bezerra, J.L., Cavalcanti, M.A.Q. 2013. Endophytic yeast of *Coffea arabica* and *Vitis labrusca* cv. Isabel from Pernambuco, Brazil. *Nov Hedw.* 96(3-4):463-469. <http://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0080>

Lopes, A.M. et al. 2015. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit revie biotech.* 1-18.

Loureiro, C.B. 2010. Purificação, conjugação e avaliação "in vitro" da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7. A). 2010. 24 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

Loureiro, C.B., Borges, K.S., Andrade, A.F., Tone, L.G., Said, S. 2012. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. *Adv Microbiol* 2:138–145.

Myers, R.H., Montgomery, D.C. 1995. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Wiley, Hoboken.

Nagarajan, A., Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Gummadi, S.N. 2014. Screening and isolation of novel glutaminase free L-asparaginase from fungal endophytes. *Res Jour Microbiol.* 9: 163–176.

Niharika, Y., Supriya, S. 2014. Production of L-Asparaginase by *Fusarium oxysporum* using submerged fermentation. *Int J Pharma Scie Inv.* 3:32-40.

Pádua, A.P.S.L., Freire, K.T.L.S., et al. 2018. Fungal endophyte diversity from leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian tropical dry forest and their capacity to produce L-asparaginase. *Acta Bot Bras.*

Peixoto Neto, P.A.S., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. 2002. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotec Ciên Desenvol.* 29:62-76.

Peixoto Neto, P.A.S., Azevedo, J.L., Caetano, L.C. 2004. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 3(4):69-72.

Rodrigues, K.F., Petrini, O. 1997. Biodiversity of Endophytic Fungi in Tropical Regions. Hyde, K.D. (ed.). Biodiversity of Tropical Microfungi. Hong Kong, China: Hong Kong University Press 57-69.

Samson, R. et al. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. Inter J of Syst and Evo Microbiol. 55:1415-1427.

Sarquis, M.I.M., Oliveira, E.M.M., Santos, A.S., Costa, G.L.D. 2004. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(5):489–492.

Silva, L.F. et al. 2018. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, bromeliad endemic from the Brazilian tropical dry forest, and their potential to L-asparaginase production. World J Microbiol Biotecnol.

Santos, M.G.S., Bezerra, J.D.P., Svedese, V.M., Sousa, M.A., Silva, D.C.V., Maciel, M.D.H.C., Paiva, L.M., Porto, A.L.F., Souza-Motta, C.M. 2015. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. Sydowia. 67:147–156.

Schleis et al. Asparaginase-associated pancreatitis in a dog. 2011. The Can veter. 52(9):1009-1012.

Souza-Silva, R.F. et al. 2010. *Mandevilla Catimbauensis* (Apocynaceae), A New Species From The Semi-Arid Region, Pernambuco, Brazil. Edinb J of Bot. 67(1).

Theantana, T., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2007. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. KMITL Scie and Techn J. 7(1):13-18.

Theantana et al. 2009. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. *Inte J of Integ Biol.* 7(1):1-8.

Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Lee, I.J. 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Mol.* 17(9):10754–10773.

Zhou, W., Starr, J.L., Krumm, J.L., Sword, G.A. 2016. The fungal endophyte *Chaetomium globosum* negatively affects both above-and belowground herbivores in cotton. *FEMS Microbiol Ecol.* 92(10):1–15.

## **Apêndice**



## Fungal Planet description sheets: 625–715

P.W. Crous<sup>1,2</sup>, M.J. Wingfield<sup>3</sup>, T.I. Burgess<sup>4</sup>, A.J. Carnegie<sup>5</sup>, G.E.St.J. Hardy<sup>4</sup>,  
D. Smith<sup>6</sup>, B.A. Summerell<sup>7</sup>, J.F. Cano-Lira<sup>8</sup>, J. Guarro<sup>8</sup>, J. Houbraken<sup>1</sup>, L. Lombard<sup>1</sup>,  
M.P. Martín<sup>9</sup>, M. Sandoval-Denis<sup>1,69</sup>, A.V. Alexandrova<sup>10</sup>, C.W. Barnes<sup>11</sup>, I.G. Baseia<sup>12</sup>,  
J.D.P. Bezerra<sup>13</sup>, V. Guarnaccia<sup>1</sup>, T.W. May<sup>14</sup>, M. Hernández-Restrepo<sup>1</sup>, A.M. Stchigel<sup>8</sup>,  
A.N. Miller<sup>15</sup>, M.E. Ordoñez<sup>16</sup>, V.P. Abreu<sup>17</sup>, T. Accioly<sup>18</sup>, C. Agnello<sup>19</sup>, A. Agustin Colmán<sup>17</sup>,  
C.C. Albuquerque<sup>20</sup>, D.S. Alfredo<sup>18</sup>, P. Alvarado<sup>21</sup>, G.R. Araújo-Magalhães<sup>22</sup>, S. Arauzo<sup>23</sup>,  
T. Atkinson<sup>24</sup>, A. Barili<sup>16</sup>, R.W. Barreto<sup>17</sup>, J.L. Bezerra<sup>25</sup>, T.S. Cabral<sup>26</sup>, F. Camello  
Rodríguez<sup>27</sup>, R.H.S.F. Cruz<sup>18</sup>, P.P. Daniëls<sup>28</sup>, B.D.B. da Silva<sup>29</sup>, D.A.C. de Almeida<sup>30</sup>,  
A.A. de Carvalho Júnior<sup>31</sup>, C.A. Decock<sup>32</sup>, L. Delgat<sup>33</sup>, S. Denman<sup>34</sup>, R.A. Dimitrov<sup>35</sup>,  
J. Edwards<sup>36</sup>, A.G. Fedosova<sup>37</sup>, R.J. Ferreira<sup>38</sup>, A.L. Firmino<sup>39</sup>, J.A. Flores<sup>16</sup>, D. García<sup>8</sup>,  
J. Gené<sup>8</sup>, A. Giraldo<sup>1</sup>, J.S. Góis<sup>40</sup>, A.A.M. Gomes<sup>17</sup>, C.M. Gonçalves<sup>13</sup>, D.E. Gouliamova<sup>41</sup>,  
M. Groenewald<sup>1</sup>, B.V. Guéorguiev<sup>42</sup>, M. Guevara-Suarez<sup>8</sup>, L.F.P. Gusmão<sup>30</sup>, K. Hosaka<sup>43</sup>,  
V. Hubka<sup>44</sup>, S.M. Huhndorf<sup>45</sup>, M. Jadan<sup>46</sup>, Ž. Jurjević<sup>47</sup>, B. Kraak<sup>1</sup>, V. Kučera<sup>48</sup>,  
T.K.A. Kumar<sup>49</sup>, I. Kušan<sup>46</sup>, S.R. Lacerda<sup>50</sup>, S. Lamlertthong<sup>51</sup>, W.S. Lisboa<sup>17</sup>, M. Loizides<sup>52</sup>,  
J.J. Luangsa-ard<sup>53</sup>, P. Lysková<sup>54</sup>, W.P. Mac Cormack<sup>55</sup>, D.M. Macedo<sup>56</sup>, A.R. Machado<sup>13</sup>,  
E.F. Malysheva<sup>37</sup>, P. Marinho<sup>57</sup>, N. Matočec<sup>46</sup>, M. Meijer<sup>1</sup>, A. Mešić<sup>46</sup>, S. Mongkolsamrit<sup>53</sup>,  
K.A. Moreira<sup>22</sup>, O.V. Morozova<sup>37</sup>, K.U. Nair<sup>58</sup>, N. Nakamura<sup>59</sup>, W. Noisripoom<sup>53</sup>,  
I. Olariaga<sup>60</sup>, R.J.V. Oliveira<sup>13</sup>, L.M. Paiva<sup>13</sup>, P. Pawar<sup>58</sup>, O.L. Pereira<sup>17</sup>, S.W. Peterson<sup>61</sup>,  
M. Prieto<sup>62</sup>, E. Rodríguez-Andrade<sup>8</sup>, C. Rojo De Blas<sup>63</sup>, M. Roy<sup>64</sup>, E.S. Santos<sup>65</sup>,  
R. Sharma<sup>58</sup>, G.A. Silva<sup>13</sup>, C.M. Souza-Motta<sup>13</sup>, Y. Takeuchi-Kaneko<sup>59</sup>, C. Tanaka<sup>59</sup>,  
A. Thakur<sup>58</sup>, M.Th. Smith<sup>1</sup>, Z. Tkalčec<sup>46</sup>, N. Valenzuela-Lopez<sup>8,66</sup>, P. van der Kleij<sup>67</sup>,  
A. Verbeken<sup>33</sup>, M.G. Viana<sup>65</sup>, X.W. Wang<sup>68</sup>, J.Z. Groenewald<sup>1</sup>

### Key words

ITS nrDNA barcodes  
LSU  
novel fungal species  
systematics

**Abstract** Novel species of fungi described in this study include those from various countries as follows: **Antarctica:** *Cadophora antarctica* from soil. **Australia:** *Alfaria dandenongensis* on *Cyperaceae*, *Amphosoma persooniae* on *Persoonia* sp., *Anungitea nullicana* on *Eucalyptus* sp., *Bagadiella eucalypti* on *Eucalyptus globulus*, *Castanediella eucalyptigena* on *Eucalyptus* sp., *Cercospora dianellicola* on *Dianella* sp., *Cladoriella kinglakensis* on *Eucalyptus regnans*, *Cladoriella xanthorrhoeae* (incl. *Cladoriellaceae* fam. nov. and *Cladoriellales* ord. nov.) on *Xanthorrhoea* sp., *Cochlearomyces eucalypti* (incl. *Cochlearomyces* gen. nov. and *Cochlearomycetaceae* fam. nov.) on *Eucalyptus obliqua*, *Codinaea lambertiae* on *Lambertia formosa*, *Diaporthe obtusifoliae* on *Acacia obtusifolia*, *Didymella acaciae* on *Acacia melanoxylon*, *Dothidea eucalypti* on *Eucalyptus dalrympleana*, *Fitzroyomyces cyperi* (incl. *Fitzroyomyces* gen. nov.) on *Cyperaceae*, *Murramarangomyces corymbiae* (incl. *Murramarangomyces* gen. nov., *Murramarangomycetaceae* fam. nov. and *Murramarangomycetales* ord. nov.) on *Corymbia maculata*, *Neonanungitea eucalypti* (incl. *Neonanungitea* gen. nov.) on *Eucalyptus obliqua*, *Neoconiothyrium persooniae* (incl. *Neoconiothyrium* gen. nov.) on *Persoonia laurina* subsp. *laurina*, *Neocrinula lambertiae* (incl. *Neocrinulaceae* fam. nov.) on *Lambertia* sp., *Ochroconis podocarpi* on *Podocarpus grayae*, *Paraphysalospora eucalypti* (incl. *Paraphysalospora* gen. nov.) on *Eucalyptus sieberi*, *Pararamichloridium livistonae* (incl. *Pararamichloridium* gen. nov., *Pararamichloridiaceae* fam. nov. and *Pararamichloridiales* ord. nov.) on *Livistona* sp., *Pestalotiopsis dianellae* on *Dianella* sp., *Phaeosphaeria gahniae* on *Gahnia aspera*, *Phlogicylindrium tereticornis* on *Eucalyptus tereticornis*, *Pleopassalora acaciae* on *Acacia obliquinervia*, *Pseudodactylaria xanthorrhoeae* (incl. *Pseudodactylaria* gen. nov., *Pseudodactylariaceae* fam. nov. and *Pseudodactylariales* ord. nov.) on *Xanthorrhoea* sp., *Pseudosporidesmium lambertiae* (incl. *Pseudosporidesmiaceae* fam. nov.) on *Lambertia formosa*, *Saccharata acaciae* on *Acacia* sp., *Saccharata epacridis* on *Epacris* sp., *Saccharata hakeigena* on *Hakea sericea*, *Seiridium persooniae* on *Persoonia* sp., *Semifissispora tooloomensis* on *Eucalyptus dunnii*, *Stagonospora lomandrae* on *Lomandra longifolia*, *Stagonospora victoriana* on *Poaceae*, *Subramaniomyces podocarpi* on *Podocarpus elatus*, *Sympoventuria melaleuca* on *Melaleuca* sp., *Sympoventuria regnans* on *Eucalyptus regnans*, *Trichomerium eucalypti* on *Eucalyptus tereticornis*, *Vermiculariopsisella eucalypticola* on *Eucalyptus dalrympleana*, *Verrucoconiothyrium acaciae* on *Acacia falciformis*, *Xenopassalora petrophiles* (incl. *Xenopassalora* gen. nov.) on *Petrophile* sp., *Zasmidium dasypogonis* on *Dasypogon* sp., *Zasmidium gahniicola* on *Gahnia sieberiana*. **Brazil:** *Achaetomium lippiae* on *Lippia gracilis*, *Cyathus isometricus* on decaying wood, *Geastrum carriense* on soil, *Lycoperdon demoulinii* (incl. *Lycoperdon* subg. *Arenicola*) on soil, *Megatomentella cristata* (incl. *Megatomentella* gen. nov.) on unidentified plant, *Mutinus verrucosus* on soil, *Paraopeba schefflerae* (incl. *Paraopeba* gen. nov.) on *Schefflera morototoni*, *Phyllosticta catimbauensis* on *Mandevilla catimbauensis*, *Pseudocercospora angularis* on *Prunus persica*, *Pseudophialophora sorghi* on *Sorghum bicolor*, *Spumula piptadeniae* on *Piptadenia paniculata*. **Bulgaria:** *Yarrowia parophonii* from gut of *Parophonus hirsutulus*. **Croatia:** *Pyrenopeziza velebitica* on *Lonicera borbasiana*. **Cyprus:** *Peziza halophila* on coastal dunes.

*Phyllosticta catimbauensis*



Fungal Planet 646 – 20 December 2017

## *Phyllosticta catimbauensis* G.R. Araújo-Magalhães, J.D.P. Bezerra, A.R. Machado, Souza-Motta & K.A. Moreira, *sp. nov.*

**Etymology.** Name refers to the Catimbau National Park, a protected area of the Brazilian tropical dry forest where this fungus was isolated as endophyte from *Mandevilla catimbauensis*.

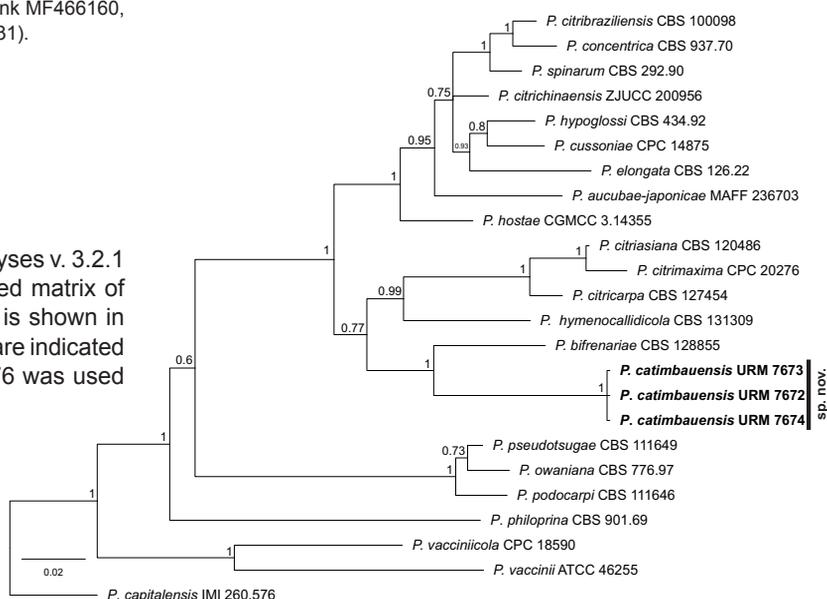
**Classification** — *Phyllostictaceae*, *Botryosphaerales*, *Dothi-deomycetes*.

**Conidiomata** pycnidial, solitary or aggregated, dark brown to black, erumpent, globose to subglobose, 160–280 µm diam, exuding hyaline to crystalline conidia masses; wall of medium brown thick-walled cells of *textura angularis*. **Conidiophores** hyaline, smooth, 0–1-septate, densely aggregated, cylindrical, reduced to conidiogenous cells, or with one supporting cell, that can be branched at the base. **Conidiogenous cells** terminal, sub-cylindrical to ampulliform, hyaline, smooth, 9.5–10.5 × 3–3.5 µm; proliferating several times percurrently at apex. **Conidia** (8.5–)9.5(–10.5) × 5.5–6 µm, solitary, hyaline, aseptate, thin- and smooth-walled, granular, ellipsoid, globose, subglobose, broadly ellipsoidal or obovoid, tapering towards a narrow truncate base, 2.5–3.5 µm diam, enclosed in a persistent mucoid sheath, 1.5–2.5 µm thick, and bearing a hyaline, apical mucoid appendage, 3–6.5 × 1–1.5 µm, flexible, unbranched, tapering towards an acutely rounded tip. **Spermatia** aseptate, dumbbell-shaped, 5.5–9.5 × 1.5–2 µm.

**Culture characteristics** — Colonies covering Petri dishes after 2 mo at 25 °C. On PDA, colonies with irregular margins, and sparse aerial mycelium, surface grey to dark grey and reverse olivaceous-grey to dark grey. On MEA, surface yellowish to dark brown and reverse amber to buff. On OA surface and reverse grey to dark grey.

**Typus.** BRAZIL, Pernambuco state, Buíque municipality, Catimbau National Park (S8°36'35" W37°14'40"), as endophyte from *Mandevilla catimbauensis* (*Apocynaceae*), May 2015, G.R. Araújo (holotype URM 90488, culture ex-type URM 7672; ITS, LSU, *actA* and *tef1* sequences GenBank MF466160, MF466163, MF466157 and MF466155, MycoBank MB822131).

Bayesian inference analysis conducted with MrBayes v. 3.2.1 at CIPRES science gateway using a concatenated matrix of *actA*, *tef1* and ITS sequences. The new species is shown in **bold**. Bayesian posterior probabilities above 0.60 are indicated at the nodes. *Phyllosticta capitalensis* IMI 260.576 was used as outgroup.



**Colour illustrations.** *Mandevilla catimbauensis* in the Catimbau National Park; conidiomata; conidiogenous cells; spermatia, and conidia. Scale bars = 10 µm.

Gianne R. Araújo-Magalhães & Keila A. Moreira, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: gianne.rizzuto@gmail.com & moreirakeila@hotmail.com  
 Jadson D.P. Bezerra, Alexandre R. Machado & Cristina M. Souza-Motta, Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: jadsondpb@gmail.com, alexandrerm.agro@yahoo.com.br & cristina.motta@ufpe.br