



COMUNICADO
TÉCNICO

242

Fortaleza, CE
Junho, 2018

Embrapa

Fungos Endofíticos Associados às Plantas de *Catharanthus roseus* no Estado do Ceará

Francisca Samara Assunção Araújo
Francisco das Chagas Oliveira Freire
Francisco José Teixeira Gonçalves
Joilson Silva Lima
Maria Izabel Florindo Guedes

Fungos Endofíticos Associados às Plantas de *Catharanthus roseus* no Estado do Ceará¹

¹ Francisca Samara Assunção Araújo, farmacêutica, B. Sc., técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Francisco das Chagas Oliveira Freire, engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia/Micologia, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Francisco José Teixeira Gonçalves, engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, professor do Instituto Federal do Mato Grosso do Sul, Nova Andradina, MS; Joilson Silva Lima, engenheiro-agrônomo, doutor em Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE; Maria Izabel Florindo Guedes, engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, professora da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.

Introdução

Catharanthus roseus (L.) G. Don. ou vulgarmente conhecida como vinca-de-Madagascar, vinca-de-gato, maria-sem-vergonha e boa-noite, é uma planta originária da Ilha de Madagascar (no Oceano Índico), encontrando-se em processo de extinção em seu habitat natural em virtude da destruição de áreas para atividades agrícolas. Entretanto, sua disseminação para países tropicais e subtropicais tem garantido sua sobrevivência. Ademais, a descoberta de que a boa-noite é uma rica fonte de alcaloides tem contribuído para sua propagação.

Alcaloides isoindólicos encontrados nas folhas da boa-noite têm se mostrado

eficientes no tratamento de vários tipos de cânceres e em diabetes, além de uma eficiente ação anti-inflamatória. Atualmente, dois importantes anti-cancerígenos são produzidos comercialmente a partir de plantas de boa-noite: a Vimblastina (obtida a partir das folhas), usada no combate da leucemia, além de outros cânceres; e a Vincristina (obtida a partir das flores), com reconhecida eficiência contra linfomas, doença de Hodgkin, câncer de mama, leucemia linfocítica aguda, sarcomas de tecidos moles, mieloma múltiplo e neuroblastoma (Rasineni et al., 2010; Cancer Drug Information, 2012).

Plantas de boa-noite têm sido relatadas como hospedeiras de diversos fitopatógenos no Brasil

(Reis; Henrique, 2007; Freire, 2011). Entretanto, até o momento, são inexistentes as informações acerca da ocorrência de fungos endofíticos nessa planta no nosso país. A exemplo de outras plantas medicinais, a boa-noite também desperta interesse quanto à sua comunidade de fungos endofíticos. Nos últimos anos, esse grupo de fungos tem se destacado como excelentes produtores de substâncias de interesse para agricultura e para a indústria farmacêutica.

Aparentemente, o único trabalho que trata da presença de fungos endofíticos em plantas de boa-noite foi conduzido por Kharwar et al. (2008) na Índia. Actinomicetos endofíticos foram também isolados a partir de folhas de boa-noite (Kafur; Khan, 2011). No presente trabalho, são apresentados os fungos endofíticos isolados de plantas de *Catharanthus roseus* coletadas no estado do Ceará, bem como informações sobre metabólitos produzidos por um dos fungos associado à planta de boa-noite.

Fungos Isolados de Plantas de Boa-Noite

As plantas examinadas foram coletadas nos municípios cearenses de Acaraú, Boa Viagem, Fortaleza, Itaitinga, Pacajus, Santa Quitéria e Trairi, e processadas dentro de um período máximo de 24 horas após a

coleta, no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical. O isolamento ocorreu de acordo com a metodologia utilizada por Petrini (1997), com algumas modificações.

Com o auxílio de um furador metálico de 10 mm Ø, foram obtidos 100 discos foliares. Para ramos e raízes, foram obtidos 100 fragmentos de 1 cm de comprimento. Todos os fragmentos, antes de serem plaqueados, foram esterilizados superficialmente por 1 minuto em álcool absoluto durante 3 minutos em hipoclorito de sódio a 3% e novamente em álcool absoluto por 1 minuto, sendo em seguida lavados em água destilada e esterilizada.

O plaqueamento ocorreu em câmara de fluxo laminar, sendo os fragmentos plaqueados em placas de Petri contendo 20 mL do meio sólido extrato-de-malte (AMA). Essas placas receberam cerca de 10 fragmentos cada e foram incubadas em câmara de crescimento regulado para 25 °C, e fotoperíodos alternados de 12 horas de escuro e luz. Após a formação das colônias, os fungos foram repicados para o meio de batata-cenoura-água a fim de estimular a esporulação.

A identificação foi baseada nas características morfológicas (Figura 1) dos isolados (Ellis, 1971, 1976; Petrini, 1986; Sutton, 1980), ou como no caso de *Eleutherascus peruvianus*, para o qual foi utilizada a análise molecular no Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), em UTRECHT, Holanda.

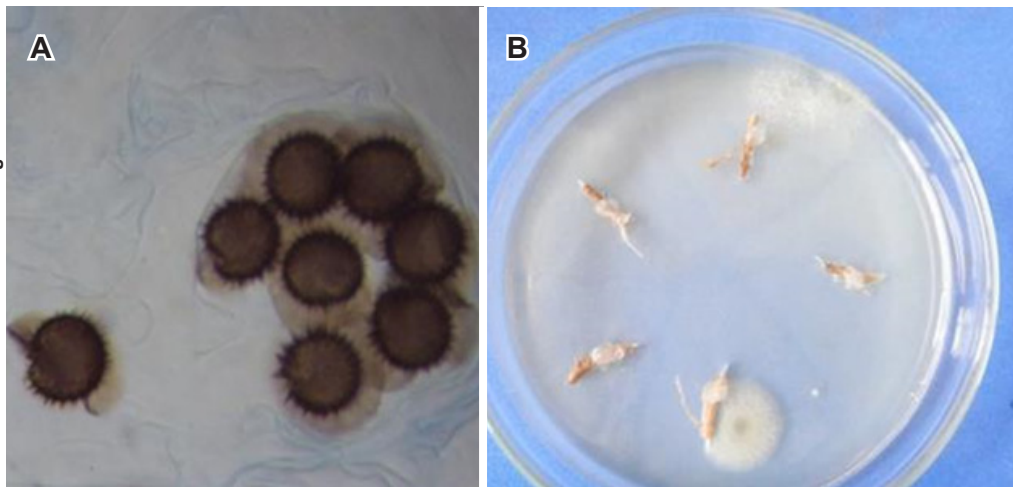


Figura 1. Micélio e ascocarpo (cleistotécio) de *E. peruvianus* exibindo ascósporos equinulados (A); *E. peruvianus* em raízes de *C. roseus* em meio de cultura (B).

A frequência de isolamento foi calculada com base na fórmula utilizada por Suryanarayanan et al. (2003):

$$FI (\%) = \frac{NFP}{NCFI \times 100}$$

Onde:

FI (%) = Frequência de isolamentos realizados;

NFP = Número de fragmentos plaqueados em placas de Petri;

NCFI = Número de colônias fúngicas identificadas.

Um total de 30 gêneros fúngicos foram isolados, sendo que o maior número de

gêneros foi verificado nas raízes e o menor número de gêneros observado em folhas (Tabela 1). A partir das raízes, foi isolado o ascomiceto *Eleutherascus peruvianus*, cuja ocorrência é inédita como endofítico, sendo também sua primeira ocorrência no Brasil. Com relação à produção de metabólitos, testes preliminares foram conduzidos com um isolado de *Nodulisporium* obtido de ramos. O extrato acetato de etila de *Nodulisporium* sp., obtido após sucessivas partições líquido-líquido, foi submetido a cromatografias líquidas de coluna em Sephadex LH-20 e de alta eficiência (HPLC), resultando no isolamento de duas α -pironas (1 e 2).

Tabela 1. Percentual de fungos endofíticos isolados a partir de folhas, ramos e raízes de plantas de boa-noite (*Catharanthus roseus*) coletadas no estado do Ceará.

Tecido	Fungos isolados	Frequência de isolamento (%)
Folhas	<i>Alternaria</i> sp.	0,1
	<i>Aspergillus</i> sp.	0,5
	<i>Colletotrichum</i> sp.	8,7
	<i>Glomerella</i> sp.	0,1
	<i>Guignardia</i> sp.	9,7
	<i>Macrophomina</i> sp.	0,4
	<i>Nigrospora sphaerica</i>	0,1
	<i>Nodulisporium</i> sp.	0,7
	<i>Sporormiella</i> sp.	8,0
	NI (Não identificados)	4,6
	Fungos totais isolados em folhas	32,9
Ramos	<i>Acremonium</i> sp.	0,2
	<i>Alternaria</i> sp.	0,2
	<i>Aspergillus</i> sp.	0,4
	<i>Bipolaris</i> sp.	0,1
	Botryosphaeriaceae	0,5
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0,1
	<i>Colletotrichum</i> sp.	5,5
	<i>Curvularia lunata</i>	0,1
	<i>Eurotium</i> sp.	0,1
	<i>Fusarium</i> spp.	0,3
	<i>Glomerella</i> sp.	1,9
	<i>Guignardia</i> sp.	8,9
	<i>Nigrospora sphaerica</i>	0,1
	<i>Nodulisporium</i> sp.	0,4
	<i>Penicillium</i> sp.	0,2

Continua.

Tabela 1. Continuação.

Tecido	Fungos isolados	Frequência de isolamento (%)
Ramos	<i>Phoma</i> sp.	0,4
	<i>Phomopsis</i> sp.	0,5
	<i>Sporormiella</i> sp.	12,1
	<i>Torula</i> sp.	0,1
	NI (Não identificados)	4,5
	Fungos totais isolados em ramos	36,6
Raízes	<i>Aspergillus</i> sp.	2,4
	<i>Colletotrichum</i> cf. <i>capsici</i>	0,1
	<i>Curvularia</i> sp.	0,1
	<i>Eleutherascus peruvianus</i>	0,1
	<i>Fusarium</i> spp.	4,7
	<i>Geotrichum candidum</i>	0,1
	<i>Heteroconium</i> sp.	0,2
	<i>Chaetomium</i> sp.	0,2
	<i>Chaetomium globosum</i>	0,1
	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	0,1
	<i>Macrophomina</i> sp.	6,1
	<i>Nigrospora sphaerica</i>	0,1
	<i>Paecilomyces</i> sp.	0,1
	<i>Penicillium</i> sp.	0,5
	<i>Phoma</i> sp.	0,1
	<i>Sporormiella</i> sp.	4,4
	<i>Stagonospora</i> sp.	1,2
	<i>Scytalidium</i> sp.	0,1
	<i>Thichoderma</i> sp.	0,1
	<i>Torula</i> sp.	5,1
	NI (Não identificados)	4,5
	Fungos totais isolados em raízes	30,4

O extrato foi analisado por meio de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono-13, utilizando-se técnicas uni e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC). A α -pirona 2 foi identificada como uma Cladobotrina, enquanto a outra é totalmente inédita na literatura química mundial (Figura 2).

A Cladobotrina foi primeiramente isolada do fungo *Cladobotryum varium*. Cladobotrinas apresentaram atividade antifúngica contra o basidiomiceto com atividade medicinal *Ganoderma*

lucidum (Tezuka et al., 1994). Como os fungos *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* e *Pestalotiopsis*, isolados no presente trabalho, mostraram-se também eficientes produtores do anticancerígeno Taxol, substância encontrada, inicialmente, apenas na planta asiática *Taxus brevifolia* (Kumaran et al., 2011; Li et al., 1998; Pandi et al., 2011), testes para avaliar a capacidade anticancerígena e antimicrobiana dessa e de outras substâncias, já estão em andamento no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

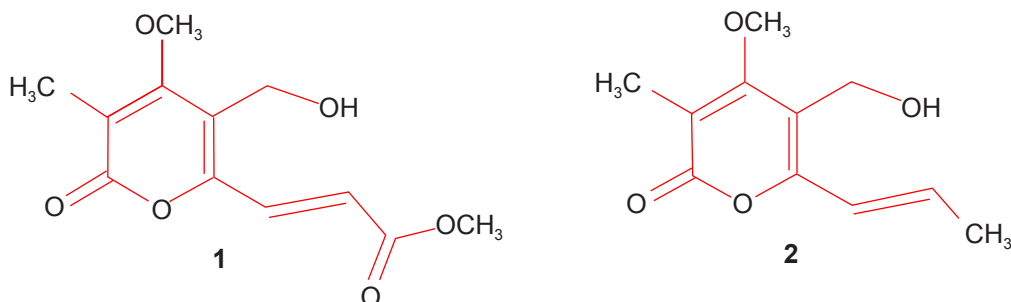


Figura 2. Estrutura química das duas α -pironas (α -pironas 1 e 2) obtidas a partir de metabólitos do fungo *Nodulisporium* sp., endofítico em plantas de boa-noite (*C. roseus*) coletadas no estado do Ceará.

Considerações finais

Os resultados obtidos sugerem um enorme potencial no que se refere à obtenção de metabólitos bioativos a partir dos fungos endofíticos isolados de plantas de boa-noite. Deve-se considerar, ademais, que muitos fungos endofíticos, ao longo dos milhões de

anos de coevolução com as plantas hospedeiras, incorporou parte do DNA vegetal, passando a produzir os mesmos metabólitos que seus hospedeiros. Isso tem sido comprovado com inúmeros fungos endofíticos, principalmente com relação à mais poderosa substância utilizada atualmente no combate ao câncer – o Taxol.

Quanto ao aspecto da diversidade micológica, uma enorme variabilidade morfológica foi encontrada em fungos da família Botryosphaeriaceae, com possíveis novas espécies inéditas mundialmente.

Referências

- CANCER DRUG INFORMATION. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/vincristinesulfate/print>>. Acesso em 24 Junho de 2012.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Wallingford: CAB International, 1971. 608 p.
- ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Wallingford: CAB International, 1976. 507 p.
- FREIRE, F. C. O. **Patógenos associados à boa-noite (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado técnico, 172). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48121/1/COT11008.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2017.
- KAFUR, A.; KHAN, A. B. Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 302-306, 2011.
- KHARWAR, R. N.; VERMAL, V. C.; STROBEL, G.; EZRA, D. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Current Science**, v. 95, n. 2, p. 228-233, 2008.
- KUMARAN, R. S.; JUNG, H.; KIM, H. J. In vitro screening of taxol, an anticancer drug produced by the fungus, *Colletotricum capsici*. **Engineering Life Science**, v. 11, n. 3, p. 264-271, 2011.
- LI, J. Y.; SIDHU, R. S.; BOLLON, A.; STROBEL, G. A. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. **Mycological Research**, v. 100, n. 4, p. 461-464, 1998.
- PANDI, M.; KUMARAN, R. S.; CHOI, Y.-K.; KIM, H. J.; MUTHUMARY, J. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1428-1435, 2011.
- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J.; van den HEUVEL, J. (Ed.). **Microbiology of phyllosphere**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 175-187.
- PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematic, ecology and evolution**. Minnesota: APS, 1997. p. 87-100.
- RASINENI, K.; BELLAMKONDA, R.; SINGAREDDY, S. R.; DESIREDDY, S. Antihyperglycemic activity of *Catharanthus roseus* leaf powder in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 3, p. 195-201, 2010.
- REIS, A.; HENRIQUE, I. M. **Phytophthora nicotianae e Rhizoctonia solani: dois novos patógenos da vinca no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2007. 19 p. (Embrapa Hortaliças. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 30).
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Slough: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1980. 696 p.

SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T. S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, v. 85, n. 4, p. 489-492, 2003.

TEZUKA, Y.; HUANG, Q.; KIKUCHI, T.; NISHI, A.; TUBAKI, K. Studies on the metabolites of mycoparasitic fungi I - metabolites of *Cladobotryum varium*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 12, p. 2612-2617, 1994.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
60511-110, Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
(2018): on-line



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa

Eveline de Castro Menezes

Membros

Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra,

Luiz Augusto Lopes Serrano, Marlon Vagner

Valentim Martins, Kirley Marques Canuto,

Rita de Cassia Costa Cid,

Eliana Sousa Ximenes

Supervisão editorial

Ana Elisa Galvão Sidrim

Revisão de texto

José Cesamildo Magalhães Cruz

Normalização bibliográfica

Rita de Cassia Costa Cid

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Arilo Nobre de Oliveira

Foto da capa

Francisco das Chagas Oliveira Freire