



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGIA

**BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Guarea
kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) E *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae)**

GABRIELLI RIBEIRO LOPES DA SILVA

Foz do Iguaçu
2023

**BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Guarea
kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) E *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae)**

GABRIELLI RIBEIRO LOPES DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves

Coorientadora: Me. Maria Gabriela Azevedo Barros

Foz do Iguaçu
2023

GABRIELLI RIBEIRO LOPES DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Guarea
kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) E *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Latino-Americano de
Ciências da Vida e da Natureza da
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves
PPGIES – UNILA

Prof.^a Dra. Júlia Ronzella Ottoni
UDC

Me. Maria Gabriela Azevedo Barros
PPGIES - UNILA

Prof.^a Dra. Nathália Corrêa Chagas de Souza
UNILA

Foz do Iguaçu, 30 de outubro de 2023.

Dedico este trabalho à minha mãe,
Patrícia e à minha avó, Djanira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família que sempre esteve ao meu lado, me apoiando durante esta jornada: minha mãe, Patrícia, e minha avó materna, Djanira - as mulheres a quem devo toda minha vida e gratidão. Sem vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui. Também agradeço ao meu pai, Juarez, e ao meu irmão, Fellipe, meu companheiro de todas as horas; sempre estarei ao seu lado para o que precisar. Vocês são os bens mais preciosos que tenho em minha vida. Com profundo aperto no coração, peço desculpas pelos anos de ausência em que precisei estudar longe de casa e pelos momentos importantes de convivência que perdi devido à vida acadêmica.

À Prof.^a Dra. Caroline Gonçalves, agradeço pela confiança depositada em mim para atuar nos projetos de extensão e pesquisa desenvolvidos ao longo da graduação e por estar sempre disponível para ajudar de alguma forma. À Me. Maria Gabriela Barros, agradeço por ter cedido todos os fungos endofíticos usados neste trabalho e por todos os ensinamentos durante longas manhãs e tardes nos laboratórios, com toda a paciência do mundo, auxiliando-me nos experimentos, ensinando a usar os equipamentos e esclarecendo minhas dúvidas. Boa parte do que aprendi sobre a vida acadêmica foi devido a você. Também por todas as conversas sobre a vida, pelos cafés, pelas caronas... Muito obrigada, sobretudo por sua amizade, Gabi. Agradeço também a Rosane Grignet pela disposição em auxiliar nas atividades desenvolvidas no âmbito deste trabalho e por várias dicas muito úteis sobre o trabalho prático com microbiologia. Rô, espero ser tão organizada como você algum dia rrsrs.

Aos meus amigos de curso, Andres e Kiara, agradeço pela amizade e por estarem ao meu lado e compartilharem tanto os sofrimentos quanto diversas alegrias durante todo esse tempo. Vocês tornaram minha vida na faculdade mais feliz e menos solitária. À minha amiga Ariel, agradeço por todo apoio, companhia e atenção. Você é muito especial pra mim, Odara. Aos colegas da faculdade, agradeço pela colaboração e companhia.

Agradeço ao laboratório de epidemiologia da ESALQ/USP e à Prof.^a Dra. Júlia Ottoni por terem cedido todos os fungos fitopatogênicos que foram usados neste trabalho. Ao professor Dr. Michel Passarini, agradeço pela colaboração em análises microbiológicas. A todos os docentes, colaboradores, técnicos administrativos e de

laboratório, e pessoal terceirizado que de alguma forma auxiliaram direta ou indiretamente na construção deste trabalho. Agradeço à banca pela disponibilidade e por cada apontamento. Agradeço à Fundação Araucária pelas bolsas de pesquisa concedidas, à PRPPG e ao PPGIES pelos recursos e, por fim, à UNILA pelo apoio institucional.

RESUMO

Os impactos causados pela intensificação desenfreada das atividades humanas nos diversos ecossistemas do Planeta Terra tornam-se cada vez mais evidentes. A degradação ambiental, a poluição do solo, do ar e da água resultantes de práticas agrícolas não sustentáveis, especialmente o uso indiscriminado de agrotóxicos para o controle de patógenos, estão intrinsecamente ligados ao modelo de desenvolvimento predatório que prevalece atualmente. Para mitigar esses impactos e assegurar um futuro mais promissor para a humanidade, torna-se imperativa a adoção de práticas colaborativas voltadas ao desenvolvimento sustentável, alinhadas com os 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU) em 2015, no contexto da agenda 2030. Nesse contexto, os fungos endofíticos surgem como uma valiosa fonte de compostos bioativos com potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias verdes destinadas ao controle biológico de fitopatógenos na agricultura. O presente estudo concentrou-se na bioprospecção do potencial de controle dos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* por fungos endofíticos isolados de *Guarea Kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) e *Cabralea canjerana* Vell. Mart. (Meliaceae), por meio de ensaios de culturas pareadas, nos quais foi avaliado o potencial de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos pelos isolados endofíticos. Os resultados obtidos revelaram que vários desses isolados endofíticos apresentaram uma notável atividade de inibição no crescimento dos fitopatógenos, com destaque para alguns que demonstraram uma eficácia superior a 70%. Além disso, nove isolados exibiram halos de inibição contra *S. sclerotiorum*, o fitopatógeno responsável pelo mofo-branco, que afeta principalmente as culturas de soja, feijão e algodão. O diâmetro dos halos variou de 3,5 a 10,5 mm, sinalizando a produção de compostos bioativos e a atividade antagonista desses isolados. Esses nove isolados foram posteriormente submetidos a ensaios de disco-difusão em placa, utilizando extratos brutos em acetato de etila e em metanol, resultando na observação de halos de inibição contra *S. sclerotiorum* em dois dos extratos testados. Dessa forma, este estudo contribui significativamente para o avanço das tecnologias mais sustentáveis no controle de fitopatógenos, alinhando-se com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável estabelecidos pela ONU.

Palavras-chave: fitopatógenos; fungos endofíticos; antagonismo; bioprospecção; agroquímicos.

RESUMEN

Los impactos causados por la intensificación desenfrenada de las actividades humanas sobre los diversos ecosistemas del Planeta Tierra son cada vez más evidentes. La degradación ambiental, la contaminación del suelo, el aire y el agua resultante de prácticas agrícolas insostenibles, especialmente el uso indiscriminado de pesticidas para controlar patógenos, están intrínsecamente ligadas al modelo de desarrollo depredador que prevalece actualmente. Para mitigar estos impactos y asegurar un futuro más prometedor para la humanidad, es imperativo adoptar prácticas colaborativas orientadas al desarrollo sostenible, alineadas con los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) propuestos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en 2015, en el contexto de la agenda 2030. En este contexto, los hongos endófitos emergen como una valiosa fuente de compuestos bioactivos con potencial para el desarrollo de nuevas tecnologías verdes orientadas al control biológico de fitopatógenos en la agricultura. El presente estudio se centró en la bioprospección del potencial de control de los *fitopatógenos Alternaria alternata, Colletotrichum acutatum, Fusarium oxysporum y Sclerotinia sclerotiorum* por hongos endófitos aislados de *Guarea Kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) y *Cabralea canjerana* Vell. Mercado. (Meliaceae), mediante ensayos de cultivos emparejados, en los que se evaluó el potencial de inhibir el crecimiento micelial de fitopatógenos por aislados endofíticos. Los resultados obtenidos revelaron que varios de estos aislados endofíticos mostraron notable actividad inhibidora sobre el crecimiento de fitopatógenos, con énfasis en algunos que demostraron una eficacia superior al 70%. Además, nueve aislados presentaron halos de inhibición contra *S. sclerotiorum*, fitopatógeno responsable del moho blanco, que afecta principalmente a los cultivos de soja, frijol y algodón. El diámetro de los halos varió de 3,5 a 10,5 mm, lo que indica la producción de compuestos bioactivos y la actividad antagonista de estos aislados. Estos nueve aislados fueron posteriormente sometidos a ensayos de difusión en disco en placa, utilizando extractos crudos en acetato de etilo y metanol, lo que resultó en la observación de zonas de inhibición contra *S. sclerotiorum* en dos de los extractos probados. De esta manera, este estudio contribuye significativamente al avance de tecnologías más sostenibles en el control de fitopatógenos, en línea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible establecidos por la ONU.

Palabras clave: fitopatógenos; hongos endofíticos; antagonismo; bioprospección; agroquímicos.

ABSTRACT

The impacts caused by the unbridled intensification of human activities on the diverse ecosystems of Planet Earth are becoming increasingly evident. Environmental degradation, soil, air and water pollution resulting from unsustainable agricultural practices, especially the indiscriminate use of pesticides to control pathogens, are intrinsically linked to the predatory development model that currently prevails. To mitigate these impacts and ensure a more promising future for humanity, it is imperative to adopt collaborative practices aimed at sustainable development, aligned with the 17 Sustainable Development Goals (SDGs) proposed by the United Nations (UN) in 2015, in the context of the 2030 agenda. In this context, endophytic fungi emerge as a valuable source of bioactive compounds with potential for the development of new green technologies aimed at the biological control of phytopathogens in agriculture. The present study focused on bioprospecting the control potential of the phytopathogens *Alternaria alternata*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum* by endophytic fungi isolated from *Guarea Kunthiana* A. Juss. (Meliaceae) and *Cabralea canjerana* Vell. Mart. (Meliaceae), through paired culture assays, in which the potential to inhibit the mycelial growth of phytopathogens by endophytic isolates was evaluated. The results obtained revealed that several of these endophytic isolates showed notable inhibition activity on the growth of phytopathogens, with emphasis on some that demonstrated an efficacy greater than 70%. Furthermore, nine isolates exhibited inhibition halos against *S. sclerotiorum*, the phytopathogen responsible for white mold, which mainly affects soybean, bean and cotton crops. The diameter of the halos varied from 3.5 to 10.5 mm, signaling the production of bioactive compounds and the antagonistic activity of these isolates. These nine isolates were subsequently subjected to plate disk diffusion assays, using crude extracts in ethyl acetate and methanol, resulting in the observation of inhibition zones against *S. sclerotiorum* in two of the tested extracts. In this way, this study contributes significantly to the advancement of more sustainable technologies in the control of phytopathogens, in line with the Sustainable Development Goals established by the UN.

Keywords: phytopathogens; endophytic fungi; antagonism; bioprospecting; agrochemicals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Percentual de propriedades rurais que utilizam agrotóxicos, por município (2017)	18
Figura 2 – Ensaio de culturas pareadas	24
Figura 3 – Análise da inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico	25
Figura 4 – Medição dos halos de inibição	26
Figura 5 – Extrações da massa fúngica	28
Figura 6 – Ensaio de disco-difusão.....	29
Figura 7 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e <i>A. alternata</i> (BA20).....	31
Figura 8 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e <i>A. alternata</i> (LRS).....	33
Figura 9 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e <i>C. acutatum</i>	35
Figura 10 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e <i>F. oxysporum</i>	37
Figura 11 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e <i>S. sclerotiorum</i>	39
Figura 12 – Crescimento do isolado GK C4.2.1 sobre os fitopatógenos	42
Figura 13 – Extratos que apresentaram halos de inibição após sete dias de ensaio de disco-difusão	45
Figura 14 – Controle dos ensaios de disco-difusão.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Total de registros de agrotóxicos, seus componentes e afins no Brasil, entre 2000 e 2023	16
Gráfico 2 – Inibição do crescimento de <i>A. alternata</i> (BA20).....	30
Gráfico 3 – Inibição do crescimento de <i>A. alternata</i> (LRS).....	32
Gráfico 4 – Inibição do crescimento de <i>C. acutatum</i>	34
Quadro 5 – Inibição do crescimento de <i>F. oxysporum</i>	36
Gráfico 6 – Inibição do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i>	38

Gráfico 7 – Halos de inibição contra <i>S. sclerotiorum</i>	40
Quadro 8 – Massa (mg) de extrato bruto obtido de extração do micélio em acetato de etila e em metanol	43
Gráfico 9 – Extrato obtido do sobrenadante (fase orgânica) em acetato de etila (sem emulsão).....	44
Gráfico 10 – Extrato obtido do sobrenadante (fase orgânica) em acetato de etila (com emulsão).....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fitopatógenos ensaiados neste trabalho	21
Quadro 2 – Massas secas (g) obtidas no crescimento em meio líquido de cada fungo endofítico.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação por escala de classes de antagonismo	27
Tabela 2 – Classificação dos fungos endofíticos (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982)	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BA20	Isolado 1 de <i>Alternaria alternata</i>
CC	<i>Cabrlea canjerana</i>
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
GK	<i>Guarea kunthiana</i>
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
LRS	Isolado 2 de <i>Alternaria alternata</i>
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
ONU	Organização Das Nações Unidas
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana
PPGIES	Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade
PRPPG	Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 AGROTÓXICOS.....	16
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	19
2.3 PRODUTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR EXTRATOS DA FAMÍLIA MELIACEAE E POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DESTA FAMÍLIA.....	20
2.4 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 ENSAIOS DE CULTURAS PAREADAS	24
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	27
3.3 ENSAIOS DE DISCO-DIFUSÃO	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1 ENSAIOS DE CULTURAS PAREADAS	30
4.2 EXTRATOS BRUTOS.....	42
4.3 ENSAIOS DE DISCO-DIFUSÃO	44
5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

No último século, profundas alterações nos ecossistemas têm sido provocadas pela intensificação das atividades antropogênicas e pela crescente demanda por recursos naturais impulsionada por pressões socioeconômicas. O desequilíbrio dos ecossistemas decorrente do aumento da concentração de gases de efeito estufa (GEE), de compostos químicos recalcitrantes, da geração e acúmulo de resíduos e da depleção de fontes não renováveis, afetam diretamente a qualidade e a sustentabilidade dos ecossistemas. Como consequência, podemos destacar a diminuição da biodiversidade, a extinção de espécies, a escassez de fontes de água potável, a degradação das terras, o aquecimento global, o aumento da ocorrência de desastres ambientais e de emergências de saúde (AURORA et al., 2018; WILKINSON et al., 2018).

Os impactos das mudanças ambientais sobre o planeta vêm sendo discutido em diferentes fóruns ao longo das últimas décadas e, em 2015, a Organização das Nações Unidas (ONU) adotou um plano de ação global para o desenvolvimento sustentável, convocando governos e sociedade civil para o enfrentamento dos desafios globais impostos pelas mudanças climáticas, desigualdades sociais e degradação ambiental. Tal plano, prevê a promoção de soluções que possibilitem o desenvolvimento social e econômico associado à proteção ambiental e do clima, assegurando que todas as pessoas de todos os lugares possam desfrutar de paz e prosperidade. Os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) consideram a interconexão e a interdependência entre a biosfera e os comportamentos humanos de forma que, para se assegurar as necessidades fundamentais para todos, se faz necessário o uso inteligente da ciência da sustentabilidade, da inovação e da tecnologia (SAITO et al., 2017).

Nesse contexto, existe a necessidade de busca de agroquímicos mais seguros, com menores riscos ambientais e toxicológicos, com biodegradabilidade e seletividade em seus modos de ações (KIM; HWANG, 2007). Assim, a busca por agentes antifúngicos, a partir de metabólitos microbianos é interessante devido às características metabólicas, que promovem a biossíntese de uma variada gama de estruturas químicas (KIM; HWANG, 2007), pelo fato dos microrganismos serem de fácil manipulação em laboratório e terem tempos de cultivo

reduzidos (SINGH, 2017), além de a manutenção das coleções terem um custo relativamente baixo (SHING et al., 2016), o que torna a bioprospecção de compostos bioativos muito promissora.

Nesta perspectiva, o emprego de tecnologias baseadas em microrganismos, devido ao papel central destes na manutenção e regulação dos ecossistemas, podem contribuir para que os ODS sejam atingidos, pois eles são fontes excepcionais de uma grande variedade de catalisadores, substâncias bioativas, biomateriais e bioenergia e agentes chaves na mitigação da poluição, na regulação do clima e dos solos, na reciclagem, na purificação das águas, segurança alimentar e em diferentes processos industriais (TIMMIS et al, 2017). Além disso, podem auxiliar na produção sustentável de alimentos, diminuindo o emprego de agrotóxicos e, conseqüentemente, contribuir para a preservação dos ecossistemas (ABHLASH, 2016).

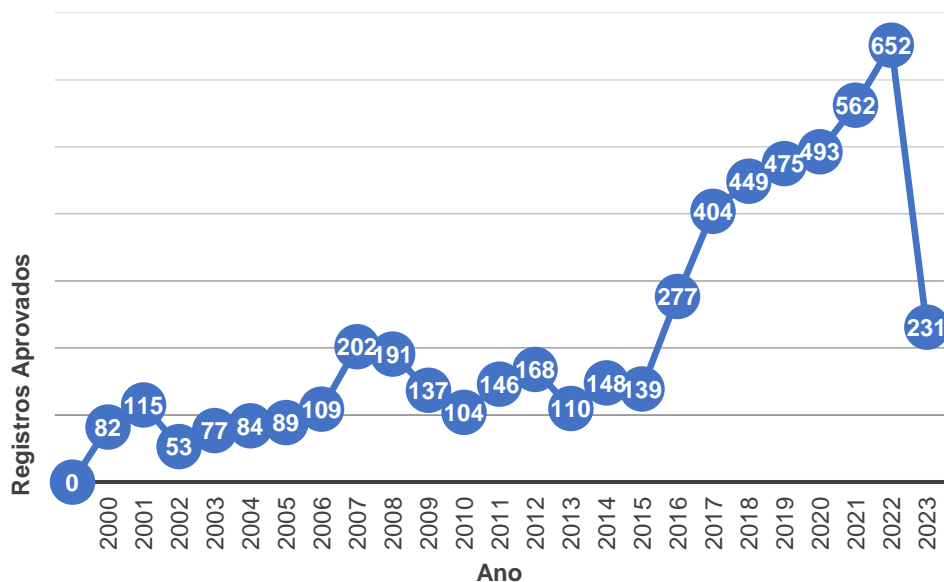
Em suma, a degradação ambiental, a poluição do solo, ar e água e as práticas agrícolas não sustentáveis são fatores fortemente conectados ao atual modelo predatório de desenvolvimento, e o uso generalizado de pesticidas encontra-se inserido nesse contexto. O futuro das próximas gerações, portanto, exige o estabelecimento de políticas públicas e ações ambiciosas e transformadoras. Dessa forma, os microrganismos são sistemas de suporte à biosfera e, conseqüentemente, podem contribuir e acelerar o desenvolvimento sustentável, exercendo, dentre outros, importante papel na agricultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS

De acordo com estimativas, 5,7 milhões de toneladas de agrotóxicos são usados por ano, a nível mundial, sendo os mais utilizados pertencentes principalmente às classes dos organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides e neonicotinoides, onde dentro da categoria de “agrotóxicos” estão os herbicidas, inseticidas, fungicidas, rodenticidas, moluscicidas, nematocidas e reguladores de crescimento de plantas (MAHMOOD et al., 2016), que são utilizados para controlar, matar e/ou repelir populações de organismos prejudiciais. No Brasil, observou-se um expressivo aumento no número de registros de agrotóxicos a partir de 2016 (Gráfico 1), com decaimento observado no ano de 2023.

Gráfico 1 – Total de registros de agrotóxicos, seus componentes e afins no Brasil, entre 2000 e 2023



Fonte: MAPA (2023)

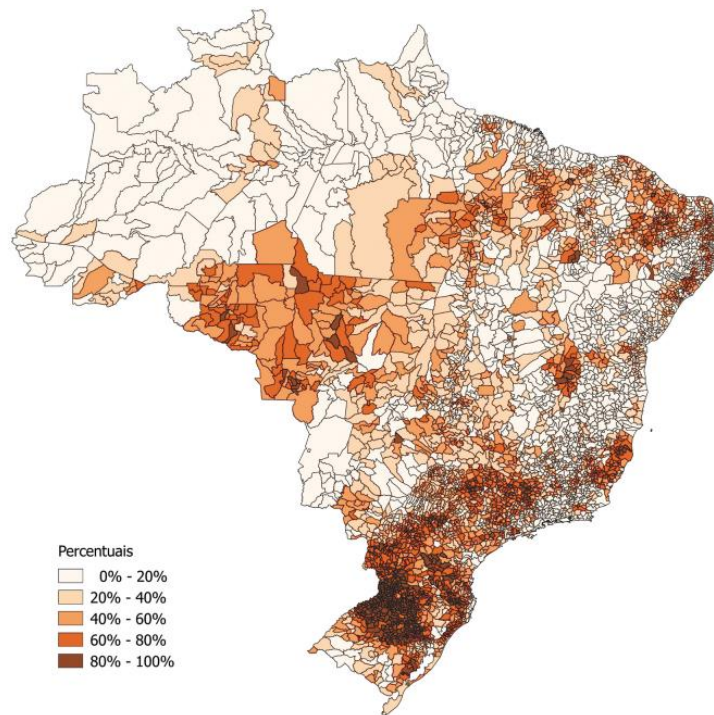
Cerca de 80 a 90% dos pesticidas aplicados podem se volatilizar com poucos dias de aplicação, o que pode gerar efeitos fora do alvo, que incluem danos à outras plantas, redução de espécies aquáticas e terrestres, impactos na sobrevivência

de espécies raras, contaminação de corpos d'água, ar e solo (MAHMOOD et al., 2016). Também é notável sua toxicidade ao solo, já que ao dizimar populações de microrganismos, nematoides e insetos, pode levar a ocorrência de outras populações, o que leva a um ciclo onde precisemos utilizar compostos ainda mais tóxicos, que consigam controlar essas populações resistentes ou, ainda, utilizar de outras estratégias como cultivares resistentes a pragas.

Em estudos no Rio Ikpoba, localizado próximo de áreas com intensa atividade agrícola no sul da Nigéria, verificou-se a presença de resíduos de agrotóxicos na biota do local, e também no sedimento e na água, causando bioacumulação e biomagnificação desses agrotóxicos ao longo dos níveis tróficos (TONGO et al., 2022). Dessa forma, os efeitos do uso desses agroquímicos, devido a sua não seletividade completa a cultura a qual foi aplicado, pode causar toxicidade a diversos organismos, incluindo seres humanos, por meio de ingestão de comida e água contaminados, respiração, e contato com a pele. Mesmo assim, trabalhadores rurais podem especialmente serem afetados, ao não apresentarem conhecimento satisfatório com relação ao uso adequado de agrotóxicos, como observado em um estudo realizado em Picos/Piauí, onde a maioria dos agricultores eram de baixa escolaridade e não utilizavam equipamentos de proteção individual (EPIs) durante o preparo da calda e na aplicação, apesar de saberem dos riscos aos quais estavam expostos (SANTANA et al., 2016), o que pode ser perigoso para a saúde desses trabalhadores.

Apesar disso, os percentuais de municípios que utilizam agrotóxicos são alarmantes, especialmente na região Sul do Brasil (Figura 1).

Figura 1 – Percentual de propriedades rurais que utilizam agrotóxicos, por município (2017)



Fonte: IPEA (2019)

Sendo utilizados, principalmente nas culturas de soja, milho, cana-de-açúcar, algodão herbáceo, café e outras (IPEA, 2019).

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Fungos são alvo de pesquisas e interesse em diversas áreas e ganharam notoriedade após a descoberta da penicilina em 1929, um importante aliado da medicina durante a segunda guerra mundial, produzida pelo fungo *Penicillium notatum* (CRAGG; NEWMAN, 2001). Os fungos endofíticos colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos, beneficiando o hospedeiro ao mesmo tempo que se beneficia desta interação. Esses microrganismos existem associados aos mais diversos ambientes, seja em comunidades naturais ou antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

De forma a responder a estresses bióticos e abióticos e criar resistência a esses, os fungos endofíticos produzem compostos bioativos com potencial de aplicação em diversas áreas, como agricultura, meio ambiente, biomedicina, energia e biocatálise (YAN et al., 2018). Como exemplo, encontra-se o Taxol (Paclitaxel ®), que é uma substância anticancerígena produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Esses metabólitos podem ser tóxicos a patógenos, podendo estar envolvidos na ação antagonista contra eles. Dessa forma, o controle de fitopatógenos pode ser beneficiado por meio do controle biotecnológico, através da utilização de fungos antagonistas, como alguns encontrados em espécies de fungos endofíticos. Tais microrganismos podem utilizar de diversas estratégias para diminuir ou até mesmo inibir o crescimento de fitopatógenos, como por exemplo, antibiose, produção de antibióticos, micoparasitismo, competição por nutrientes, indução de resistência na planta, dentre outras (YAN et al., 2018). Nesse contexto, para o desenvolvimento de um bioproduto ou a utilização agroecológica de compostos microbianos bioativos é essencial a utilização de técnicas interdisciplinares de bioprospecção, isolamento e caracterização.

2.3 PRODUTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR EXTRATOS DA FAMÍLIA MELIACEAE E POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DESTA FAMÍLIA

Diversos compostos já foram isolados de fungos endofíticos da família Meliaceae, como terpenoides, alcaloides, quinonas e outros compostos aromáticos e apresentaram atividades antimicrobianas contra microrganismos que impactam na indústria de alimentos, como *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides* e contra bactérias de importância médica, como *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de apresentarem também outras atividades, como antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, sendo esses de classes como triterpenoides, sesquiterpenoides, alcaloides, flavonoides, quinonas e outros compostos (MULYANI; SINAGA; SUPRATMAN, 2023).

Com relação às espécies de plantas das quais foram isolados os fungos utilizados nesse trabalho, *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. é uma espécie de angiosperma da família Meliaceae, nativa do Brasil, com distribuição em todas as regiões do país (FLORES, 2020). É conhecida pelo nome popular de cedro-canjerana. Os triterpenos e limonóides isolados das frutas e sementes de *C. canjerana* apresentaram atividade contra larvas de *Spodoptera frugiperda* e extratos brutos e extratos de frações de etanol, hexano e acetato de etila; das frutas e folhas, apresentaram atividades contra coleópteros da espécie *Acanthoscelides obtectus*; além de extratos etanoicos e hexânicos de folhas e frutas, que apresentaram atividade contra ninfas de *Rhodnius neglectus* (MAGRINI et al., 2015). Não foram encontradas na literatura informações sobre biodiversidade de fungos endofíticos isolados dessa espécie. Já *Guarea kunthiana* A. Juss. é uma espécie de angiosperma da família Meliaceae, nativa do Brasil, com distribuição em todas as regiões do país (FLORES, 2020). É conhecida pelos nomes populares de peloteira, cedro-bravo, jító, dentre outros. O extrato das folhas vem mostrando algumas atividades biológicas, como larvicida (SARAMENTO et al., 2016) e carrapaticida (SILVA et al., 2016). Não foram encontradas na literatura informações sobre biodiversidade de fungos endofíticos isolados dessa espécie.

2.4 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Doenças em plantas são responsáveis por cerca de 10 a 15% de perdas anuais nas culturas de maiores importâncias na agricultura mundial, representando prejuízos econômicos de centenas de bilhões de dólares. Dessas doenças, de 70 a 80% são causadas por fungos patogênicos (PENG et al., 2021). A fitopatogenicidade pode decorrer da produção de metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos fitopatogênicos, por exemplo, que atuam em diversas estruturas da planta hospedeira, ocasionando: interferência na fotossíntese; inibição da produção de ácidos nucleicos e proteínas; enzimas degradadoras de parede celular; produção de reguladores de crescimento que causam distúrbios na homeostase das plantas hospedeiras e em seus mecanismos de defesa; secreção de proteínas efetoras que afetam em diversos processos de sinalização, interferindo na resposta imune e aumentando a patogenicidade do fungo; viroses fúngicas de DNA ou RNA que impactam negativamente as plantas hospedeiras; dentre outros mecanismos (PENG et al., 2021). Nesse sentido, fitopatógenos são agentes causais de doenças em culturas de interesse comercial, como os ensaiados neste trabalho, conforme observa-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Fitopatógenos ensaiados neste trabalho

Fitopatógeno	Exemplos de culturas afetadas	Doenças
<i>Alternaria alternata</i>	Tomate, maçã, laranja, limão, tangerina, dentre outras.	Mancha de <i>Alternaria</i>
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Citros em geral, morango, maçã, dentre outras.	Podridão floral dos citros, antracnose
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate, melão, feijão, banana, algodão, grão-de-bico, dentre outras.	Murcha de <i>Fusarium</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Soja, algodão, batata, cenoura, dentre outras.	Mofa branco, podridão algodoeira, podridão mole aquosa, podridão do caule, gota, podridão da coroa, ferrugem da flor

Fonte: Autora (2023).

O que torna importante os estudos de bioprospecção do potencial antagonista de microrganismos diversos, com vista na menor utilização de agrotóxicos para controle de tais fitopatógenos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a bioprospecção de fungos endofíticos isolados de *Guarea kunthiana* A. Juss. e *Cabralea canjerana* e de seus extratos brutos quanto ao potencial de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

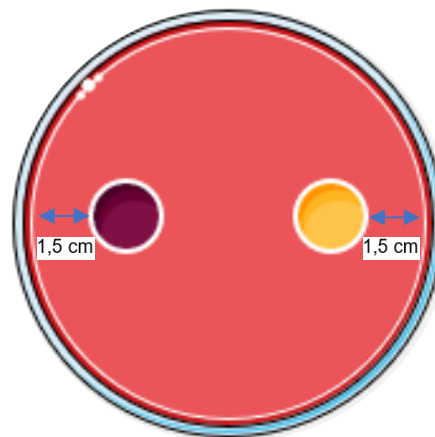
- Avaliar a porcentagem de inibição de crescimento micelial de 13 fungos endofíticos, sendo 10 isolados de *Guarea kunthiana* A. Juss. e 3 isolados de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. contra os fitopatógenos *Alternaria alternata* (dois isolados, “BA20” e “LRS”), *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, por meio de ensaios de culturas pareadas;
- Avaliar a presença de halos de inibição entre fungo endofítico e fitopatogênico nos ensaios de culturas pareadas;
- Obter extratos brutos dos fungos endofíticos mais promissores;
- Avaliar o potencial de inibição dos extratos brutos obtidos por meio de ensaios de disco-difusão.

3 METODOLOGIA

3.1 ENSAIOS DE CULTURAS PAREADAS

Foi utilizada a metodologia adaptada de Bell, Wells e Markham (1982), onde discos de 8 mm do fungo endofítico e do fungo fitopatogênico foram inoculados em polos opostos de placas de Petri de 90 mm contendo meio de cultivo extrato de malte (20 g.L^{-1} de extrato de malte Acumedia® e 10 g.L^{-1} de ágar Kasvi®). Ambos os discos foram inoculados distantes cerca de 1,5 cm das bordas das placas (Figura 2), que foram incubadas a 28°C por 7 dias. Os fungos fitopatogênicos foram obtidos do laboratório de epidemiologia/ ESALQ-USP e cedidos pela Prof.^a Dra. Júlia Ottoni, já os fungos endofíticos foram isolados de plantas do Refúgio Biológico Bela Vista/ Foz do Iguaçu, para utilização em trabalhos anteriores, e cedidos pela Me. Maria Gabriela Barros.

Figura 2 – Ensaio de culturas pareadas



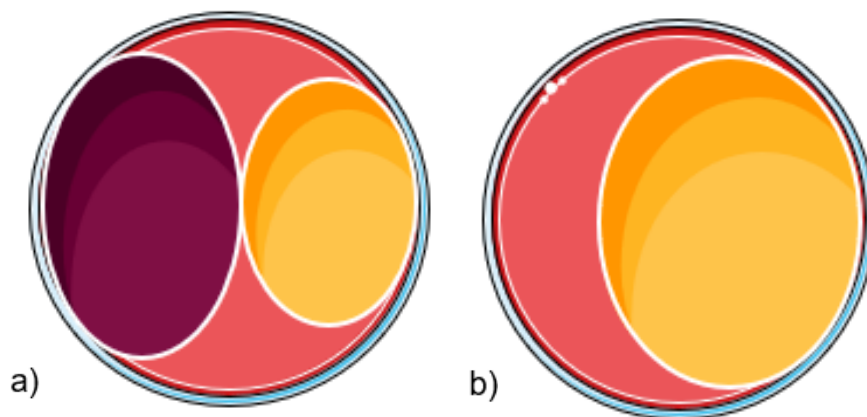
Fonte: Autora (2023).

Ensaio de culturas pareadas são utilizados para determinar a variabilidade do potencial de antagonismo entre microrganismos (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982). Os efeitos de antagonismo podem ocorrer devido à produção de compostos bioativos produzidos por microrganismos, que funcionam como defesas químicas contra predadores, competidores e/ou patógenos regulando o crescimento microbiano, interagindo com receptores ou modulando a atividade de enzimas importantes no

metabolismo (GLOER, 1995). Outros fenômenos como a interferência pelas hifas e replacement após contato micelial (crescimento de um fungo sobre o outro, sem inibição mútua inicial) também podem ser associados a produção de agentes antifúngicos (GLOER, 1995). Contudo, os parâmetros dos ensaios *in vitro*, como temperatura e fornecimento de nutrientes são controlados e os resultados podem não representar exatamente o grau de controle biológico observável na natureza, onde há variações de temperatura, luminosidade, umidade e exposição a outros microrganismos, que podem influenciar tanto no desenvolvimento das plantas quanto dos microrganismos (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982).

Ao final dos ensaios de culturas pareadas, as placas foram fotografadas e sucederam-se três avaliações. Foram determinadas as porcentagens de inibição dos crescimentos miceliais dos fungos fitopatogênicos através da análise das imagens por meio do *ImageJ*®, que é um software de domínio público, de fácil utilização e com vasto kit de ferramentas para processamento de imagens, como análise de partículas, função e dinâmica de células e organelas, histogramas, tumores, plantas, dentre outras (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). Para isso, mediu-se a área de crescimento micelial de cada fungo fitopatogênico quando pareado com os isolados endofíticos em comparação ao controle, onde foi inoculado apenas cada fungo fitopatogênico (Figura 3).

Figura 3 – Análise da inibição do crescimento micelial do fungo fitopatogênico
a) Pareamento entre fungo endofítico e fitopatógeno b) Controle com fitopatógeno

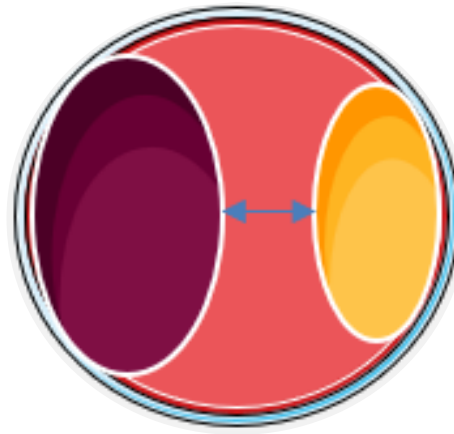


Fonte: Autora (2023).

Foi utilizada a fórmula %Inibição: (crescimento micelial do fitopatógeno no controle – crescimento micelial do fitopatógeno no tratamento)/ crescimento micelial do fitopatógeno no controle x 100 (QUIROGA; SAMPIETRO; VATTUONE, 2001).

Também foram medidos os tamanhos dos halos de inibição observados, com uso de régua milimetrada, considerando a distância entre a borda do micélio do fungo endófito e a borda do micélio do fungo fitopatogênico, tomando como ponto de partida para a medição, o disco de fitopatógeno inoculado, conforme observa-se na Figura 4.

Figura 4 – Medição do tamanho do halo de inibição



Fonte: Autora (2023).

Foi também avaliada a variabilidade de interações de antagonismo entre endófito e fitopatógeno foi agrupada em escala de classes de antagonismo, que variam de 1 a 5 (Tabela 2), com base em Bell, Wells e Markham (1982).

Tabela 1 – Classificação por escala de classes de antagonismo. Score < ou = a 2: Antagonista; Score > ou = a 3: Não tão antagonista.

Classificação	Legenda
1	Endofítico cresceu completamente sobre o patógeno e cobriu a toda a superfície do meio de cultura.
2	Endofítico cresceu pelo menos 2/3 da superfície do meio de cultura.
3	Endofítico e fitopatógeno colonizaram, aproximadamente cada um, metade da superfície do meio de cultura (mais que 1/3 e menos que 2/3) e nenhum deles parece dominar o outro.
4	Fitopatógeno colonizou pelo menos 2/3 da superfície do meio de cultura e parece resistir a invasão pelo endofítico.
5	Fitopatógeno cresceu completamente sobre o endofítico e cobriu toda a superfície do meio de cultura.

Fonte: (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982)

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

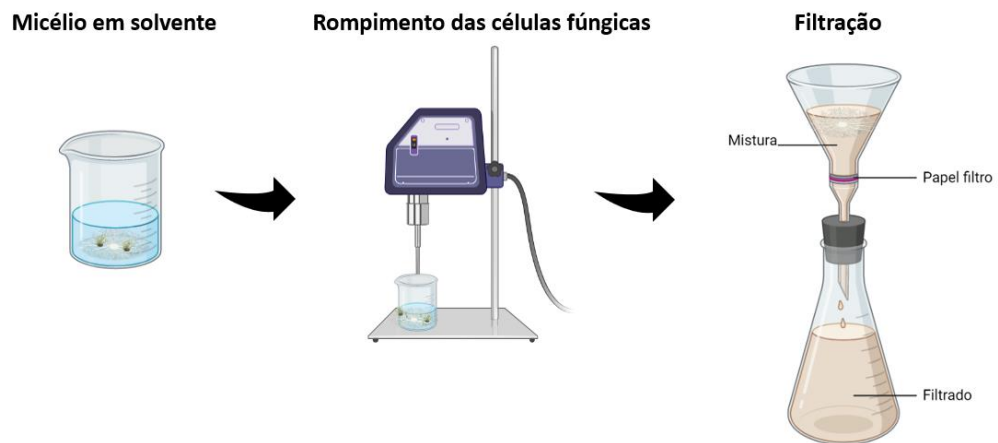
Para obtenção dos extratos brutos, três discos de ágar contendo micélio do fungo endofítico de 8 mm de diâmetro foram inoculados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido extrato de malte e incubados em shaker Limatec® a 150 RPM, por 7 dias a 28 °C. Após este período, adicionou-se 50 mL de acetato de etila e a mistura resultante foi filtrada a vácuo.

Foram obtidos extratos brutos tanto do sobrenadante quanto da massa fúngica seca (micélios). Para isso, o sobrenadante passou por uma extração líquido-líquido, com as fases orgânicas e aquosas sendo mantidas na capela de exaustão de gases Spencer® até que o solvente evaporasse. A massa fúngica, obtida na filtração, foi seca em estufa a 40 °C, pesada e, em seguida, recuperada após a raspagem do papel filtro.

Foram feitas duas extrações (Figura 5). A primeira com uso de 50 mL de acetato de etila Dinâmica® e a segunda com uso de 50 mL de metanol SAL R®

(SHARMA; PRAMANIK; AGRAWAL, 2016). Assim, inicialmente foram transferidos para béquer contendo o material fúngico seco, 50 mL de acetato de etila. Em seguida, o material foi colocado em sonicador ultrassônico Eco-Sonics ® por 10 minutos a 75% de potência, de forma a romper as células pela implosão de microbolha.

Figura 5 – Extrações da massa fúngica



Fonte: Autora (2023).

O material obtido foi filtrado em papel filtro analítico, e mantido em capela de exaustão de gases a temperatura ambiente até a evaporação do solvente utilizado. O mesmo procedimento, e com o mesmo material fúngico submetido anteriormente à extração com acetato de etila, foi adotado para a extração com metanol.

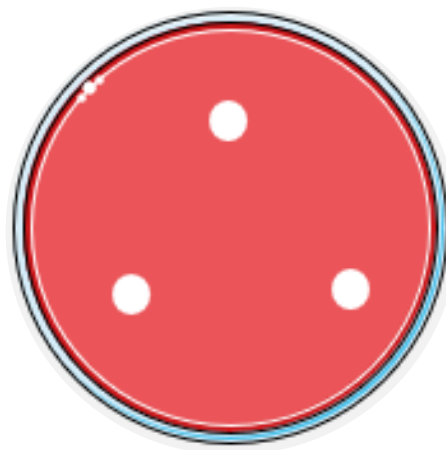
Quando secos, tanto os extratos obtidos da massa fúngica quanto do sobrenadante, foram lavados com pequenas quantidades de solvente, transferidos para pequenos frascos e novamente colocados na capela de exaustão de gases. Essa etapa foi importante para concentração do extrato em frascos menores. Os extratos obtidos foram pesados em balança analítica Even ® e armazenados em geladeira a 4°C.

3.3 ENSAIOS DE DISCO-DIFUSÃO

Para o preparo da solução de esporos do fitopatógeno a ser utilizada nos ensaios de disco-difusão em ágar, o fitopatógeno foi inicialmente cultivado em placa de Petri contendo meio de cultivo extrato de malte a 28°C por 7 dias. Após, a placa foi lavada com 50 mL de solução salina (0,85% NaCl e 0,05% de Tween80 estéril) (SAMSON et al., 2014) e raspada com o auxílio de uma alça fúngica. A mistura foi então filtrada com uso de funil e gaze estéreis. Para os ensaios foi utilizada solução de esporos, com densidade óptica DO_{600} na faixa entre 0,09 a 0,11 de absorbância, que corresponde a concentração de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL (NCCLS, 2002). Foi utilizado como branco a solução salina.

Cada extrato foi ressuspenso em metanol na concentração de 5 mg/mL (HERNÁNDEZ-CEJA et al., 2021) e assim foi inoculado 20 μ L de cada extrato em discos brancos estéreis (6 mm de diâmetro) de papel e deixados a temperatura ambiente até a evaporação do solvente. Em placas de Petri de 90 mm contendo meio de cultura extrato de malte, foi inoculado 1 mL da solução de esporos do fitopatógeno e espalhados com o uso de alça de Drigalski. Após 30 minutos, os discos de papel, filtro contendo cada extrato, foram acomodados nas placas de Petri (Figura 6). Foi utilizado um controle absoluto (meio de cultura e suspensão de esporos) e um controle para o metanol (meio de cultura, suspensão de esporos e discos com metanol). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata. Cada placa foi incubada a 28° C por 7 dias.

Figura 6 – Ensaio de disco-difusão



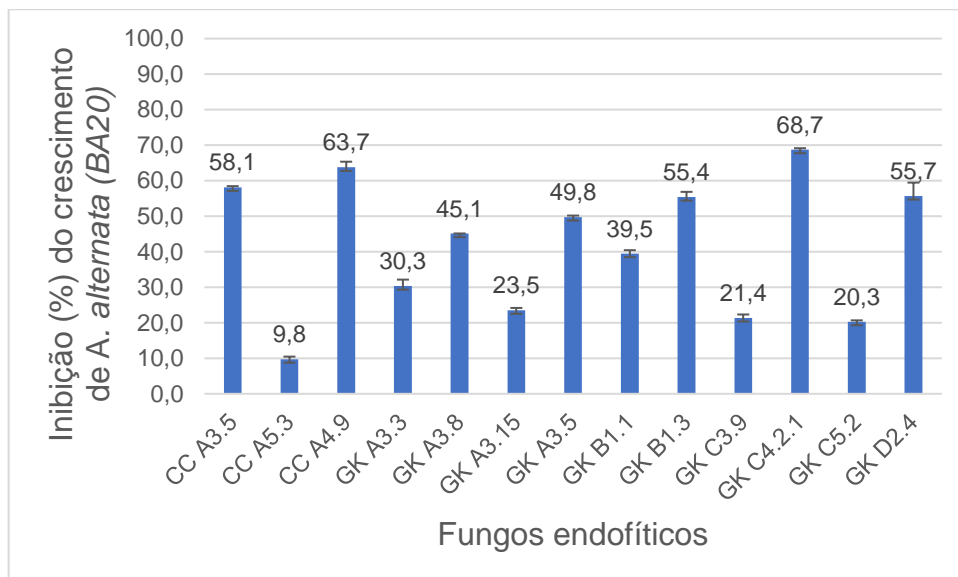
Fonte: Autora (2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ENSAIOS DE CULTURAS PAREADAS

Nos ensaios contra *A. alternata* (BA20) cinco isolados inibiram a área do crescimento micelial desse fitopatógeno em mais de 50%, conforme observa-se no Gráfico 2.

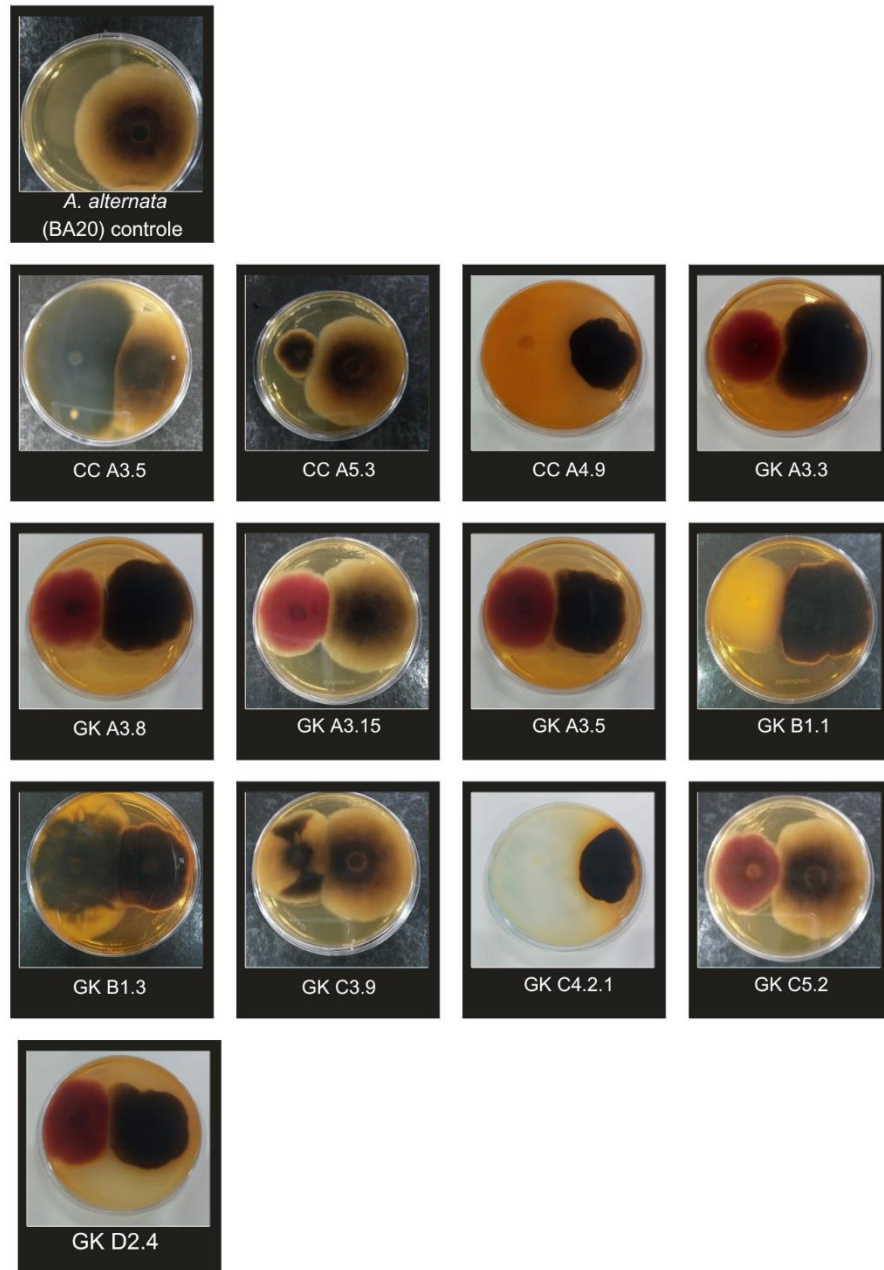
Gráfico 2 – Inibição do crescimento de *A. alternata* (BA20)



Fonte: Autora (2023).

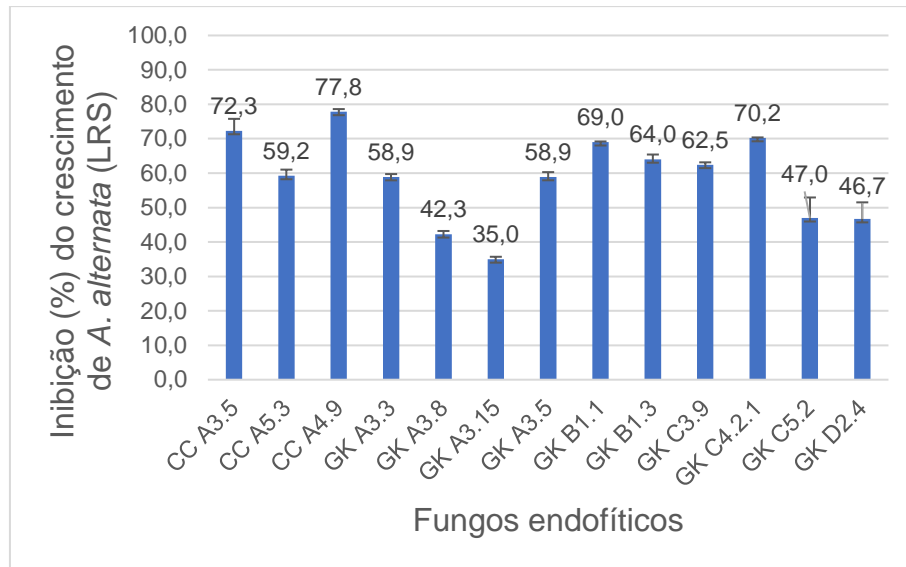
O isolado C4.2.1 apresentou o maior potencial de inibição, já o menor potencial foi notado com o isolado CC A5.3. Não foram observados halos de inibição em nenhum dos ensaios (Figura 7). Utilizando metodologia semelhante, Nozaki e colaboradores (2018) observaram que isolados de *Trichoderma* spp. foram capazes de inibir o crescimento da colônia de *Alternaria solani* de 33% a 100% quando em confronto direto em placa.

Figura 7 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e *A. alternata* (BA20). À esquerda na placa, fungo endofítico, à direita na placa *A. alternata* (BA20)



Fonte: Autora (2023).

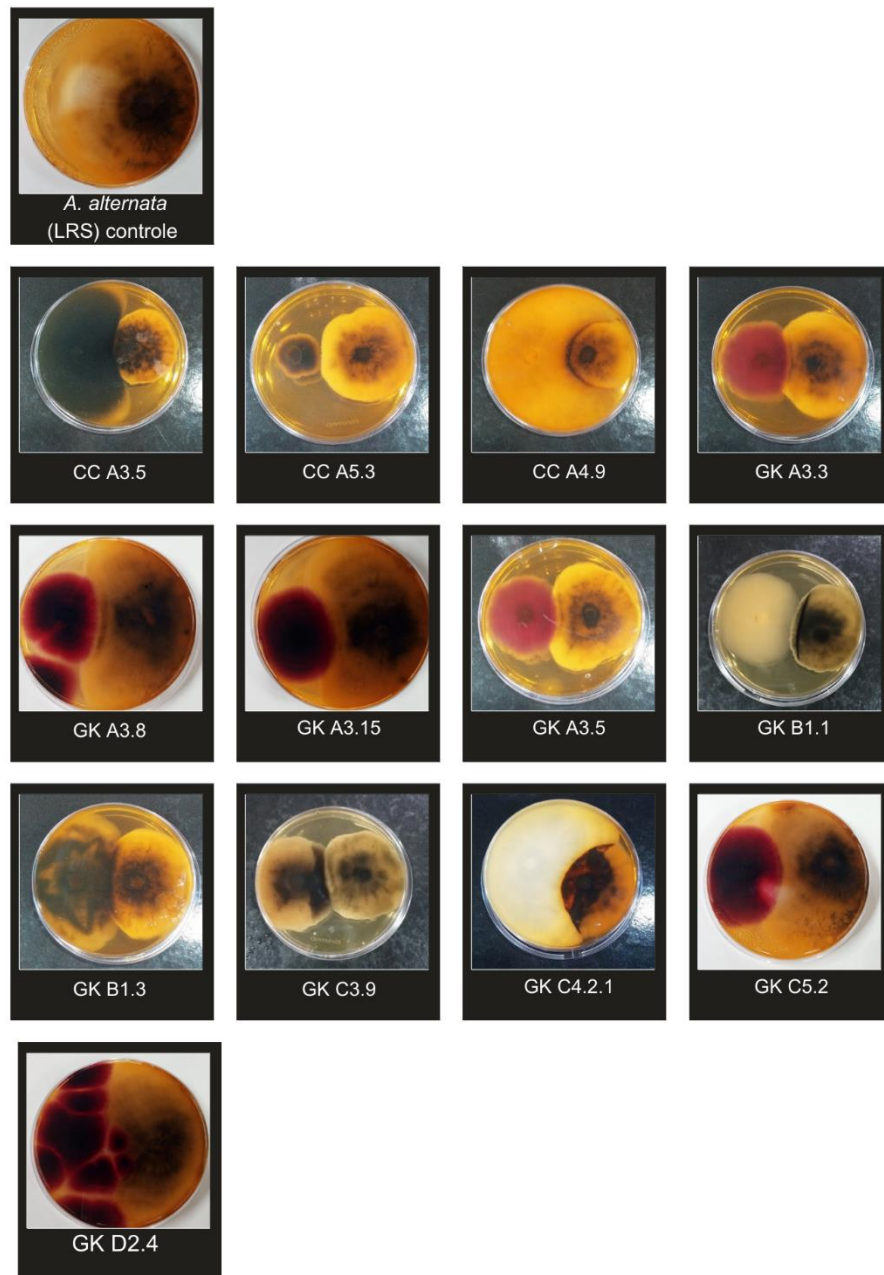
Nos ensaios contra *A. alternata* (LRS) observou-se que nove isolados inibiram o crescimento micelial desse fitopatógeno em mais de 50%, dentre esses, destacam-se os isolados CC A4.9, CC A4.5 e GK C4.2.1, que inibiram em mais de 70% e o isolado GK A3.15 foi o que menos inibiu o crescimento do fitopatógeno (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Inibição do crescimento de *A. alternata* (LRS)

Fonte: Autora (2023).

Não foram observados halos de inibição em nenhum dos ensaios (Figura 8). Ademais, nos ensaios com os isolados CC A4.9 e GK B1.1, verificou-se a presença de pigmentação na borda do fitopatógeno mais próxima desse isolado.

Figura 8 – Ensaios de culturas pareadas entre isolados endofíticos e *A. alternata* (LRS). À esquerda na placa, fungo endofítico, à direita na placa *A. alternata* (LRS)

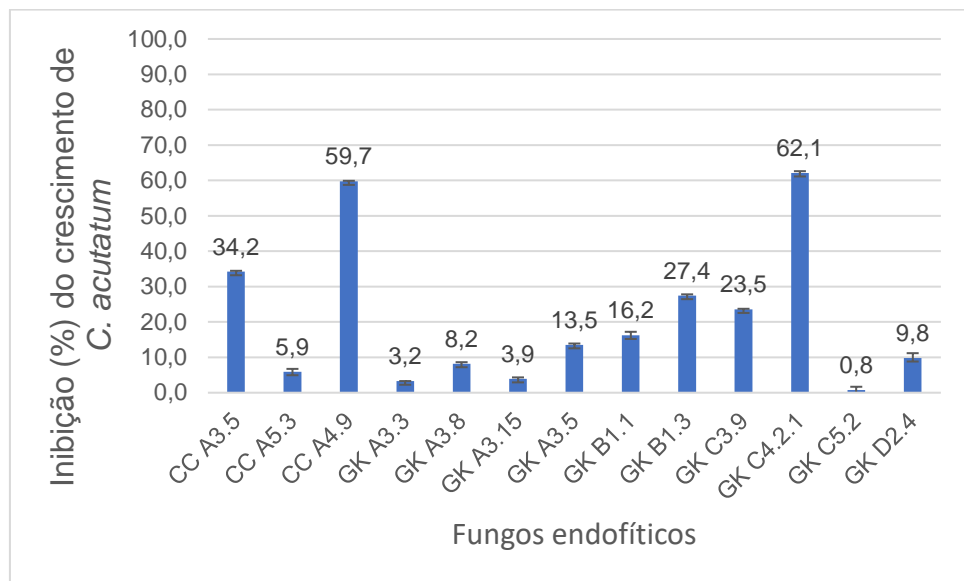


Fonte: Autora (2023).

Nos ensaios contra C. acutatum, observou-se que esse fitopatógeno foi um dos que mais se mostrou resistente aos fungos endofíticos durante os ensaios de culturas pareadas, com algumas exceções, como de dois isolados que apresentaram potencial de inibição da área de crescimento micelial do fitopatógeno de mais de 50%. Seis isolados apresentaram menor potencial antagonista, inibindo o crescimento de *C.*

acutatum em no máximo 10 % (Gráfico 4). Estudos de Zivkovic e colaboradores (2010) também com microrganismos demonstraram forte atividade antagonista de espécies de *Streptomyces noursei* e *Streptomyces natalensis* contra os fungos *C. acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides*, que foram capazes de inibir o crescimento micelial e de germinação de conídios desses fungos, principalmente por antibiose.

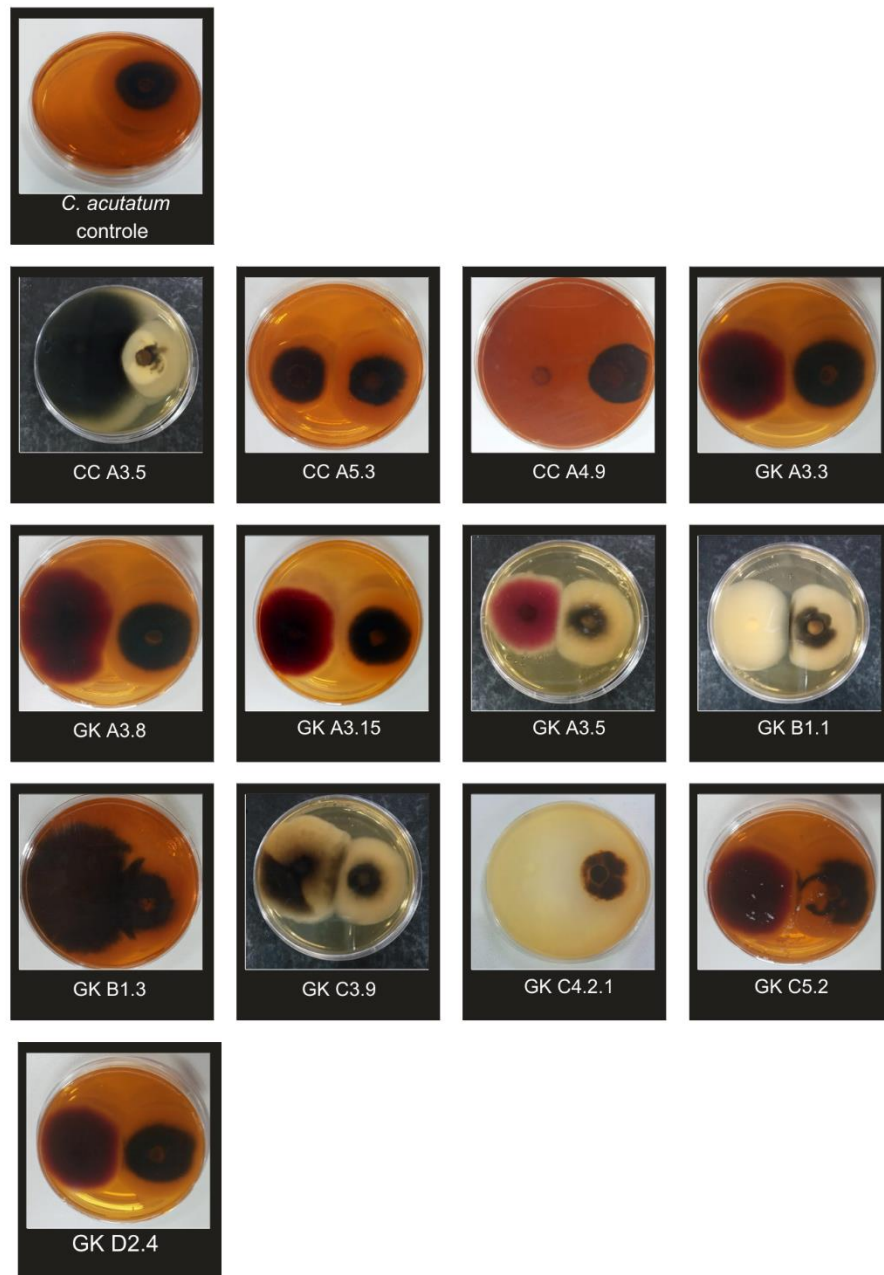
Gráfico 4 – Inibição do crescimento de *C. acutatum*



Fonte: Autora (2023).

Não foram observados halos de inibição em nenhum dos ensaios (Figura 9). Ademais, nos isolados endofíticos GK B1.1 e B1.3 observou-se pigmentação escura na borda do fitopatógeno. A mudança de pigmentação do micélio é considerada como decorrente de metabólitos difusíveis produzidos por espécies em crescimento excessivo (BADALYAN; INNOCENTI; GARIBYAN, 2002)

Figura 9 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e *C. acutatum*. À esquerda na placa, fungo endofítico, à direita na placa *C. acutatum*

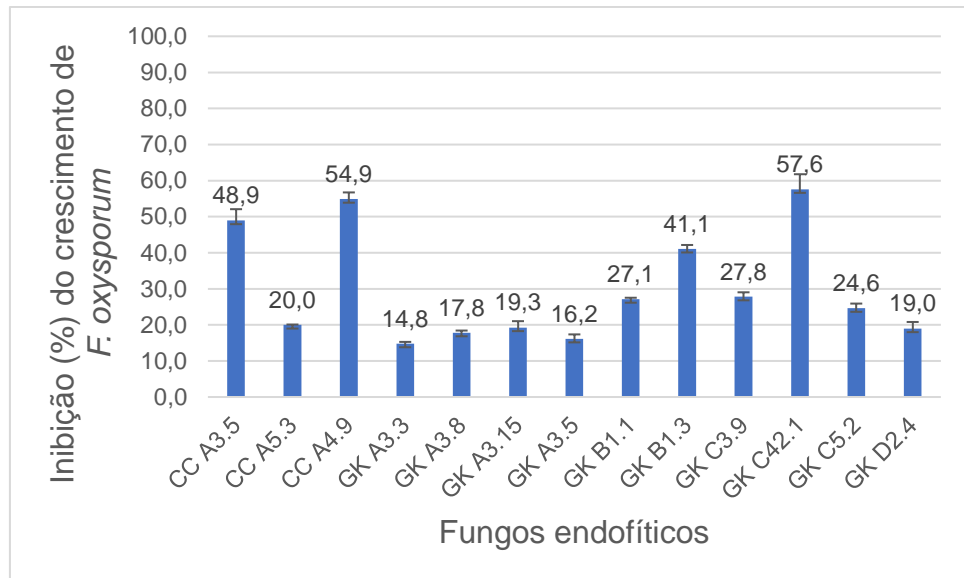


Fonte: Autora (2023).

O fungo *F. oxysporum* também se mostrou resistente aos fungos endofíticos em relação aos demais fitopatógenos analisados neste estudo. Entretanto, os isolados GK C4.2.1 e CC A4.9 foram capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno em mais de 50% (Gráfico 5). Não foram observados halos de inibição em nenhum dos ensaios (Figura 10). Utilizando metodologia semelhante, foi verificada a inibição do

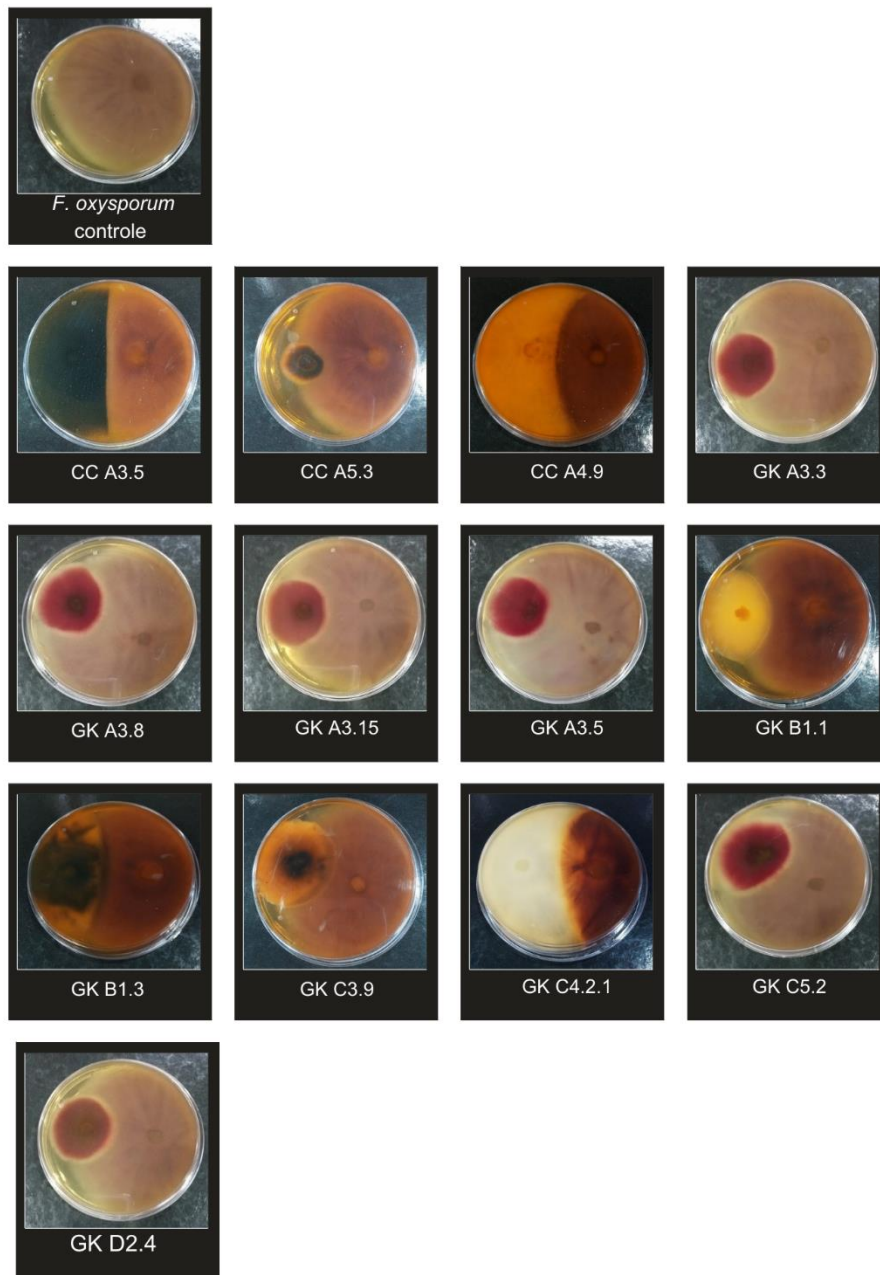
crescimento de *F. oxysporum* de 70 a 81%, por cepas de *Trichoderma* isoladas de solo de Mata Atlântica (MEDEIROS et al., 2020).

Gráfico 5 – Inibição do crescimento de *F. oxysporum*



Fonte: autora.

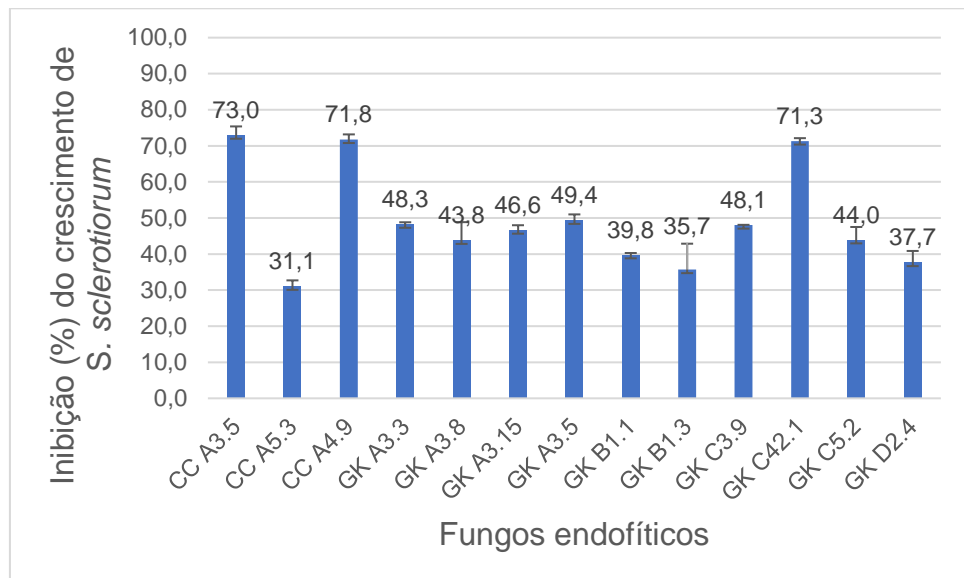
Figura 10 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e *F. oxysporum*. À esquerda na placa, fungo endofítico, à direita na placa *F. oxysporum*



Fonte: Autora (2023).

Nos testes contra *S. sclerotiorum*, a inibição do crescimento desse fitopatógeno, variou entre 31,1% e 73,0% (Gráfico 6).

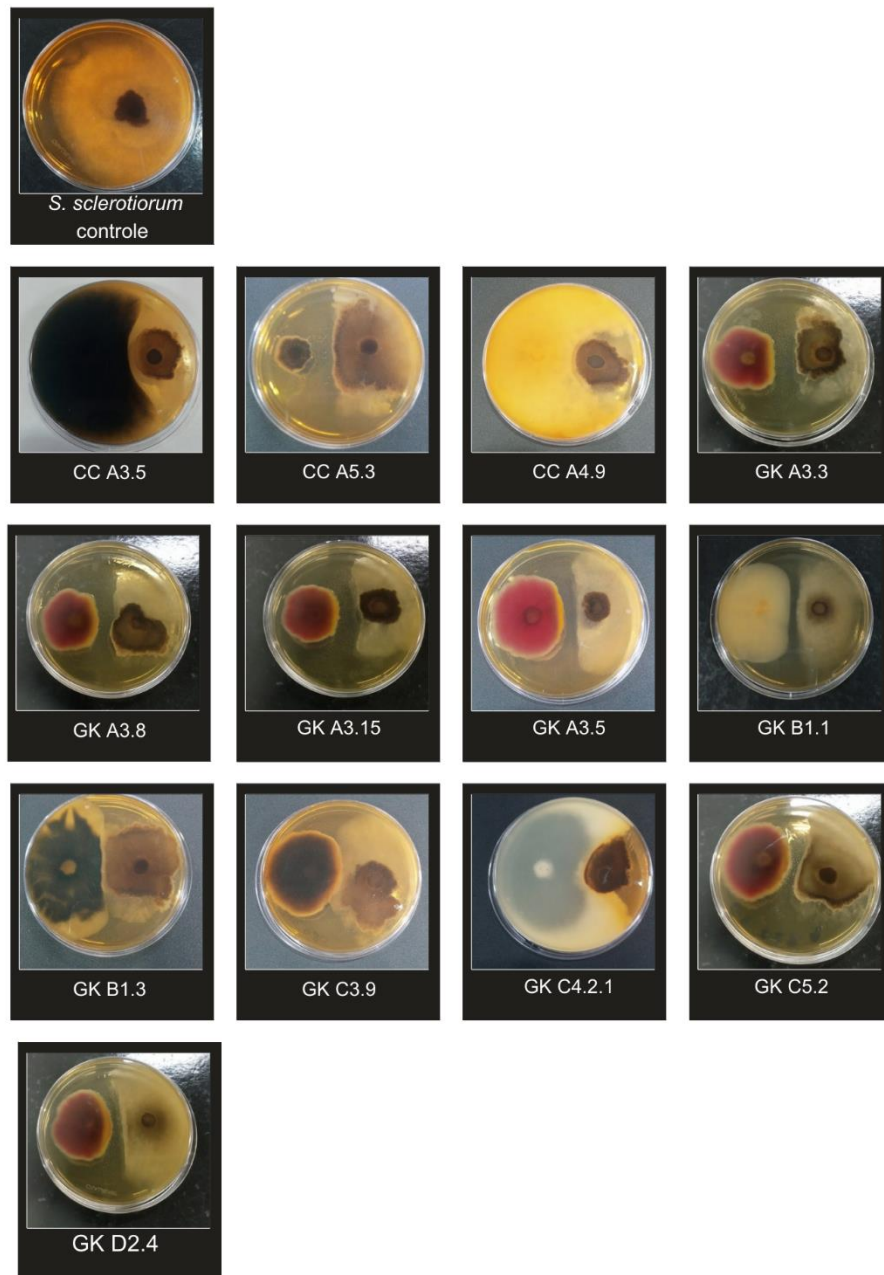
Gráfico 6 – Inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*



Fonte: Autora (2023).

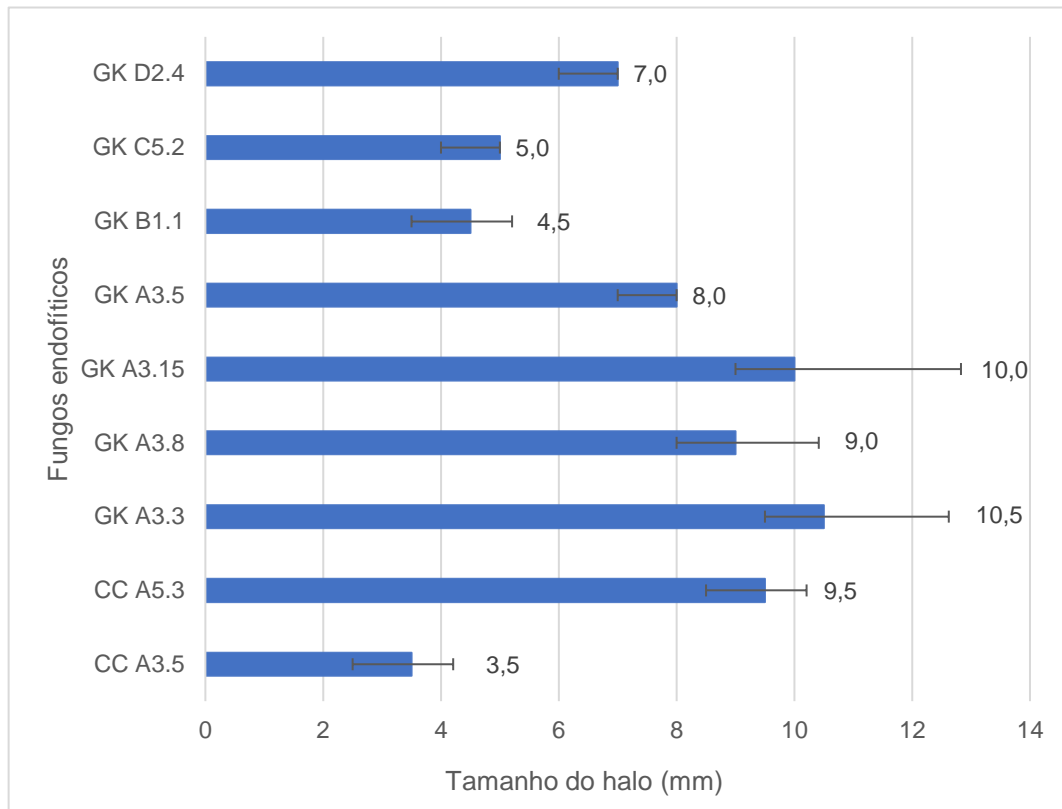
Diversos estudos na literatura demonstraram atividade antagonista contra *S. sclerotiorum*. Incluindo trabalhos com isolados de *Trichoderma* spp., variando de 86,0% a 94,0% de inibição de crescimento micelial (ETHUR; CEMBRANEL; SILVA, 2001). Ademais, nos testes com cada um dos 13 isolados endofíticos contra *S. sclerotiorum*, foi verificada a presença de halos de inibição em 9 deles (Figura 11).

Figura 11 – Ensaio de culturas pareadas entre isolados endofíticos e *S. sclerotiorum*. À esquerda na placa, fungo endofítico, à direita na placa *S. sclerotiorum*



Fonte: Autora (2023).

O tamanho dos halos variou de 3,5 a 10,5 mm (Gráfico 7), e a presença deles pode sugerir o envolvimento de substâncias difusíveis no antagonismo a distância (GLOER, 1995).

Gráfico 7 – Halos de inibição contra *S. sclerotiorum*

Fonte: Autora (2023).

De maneira semelhante, fungos endofíticos isolados de *Symphytum officinale* (Boraginaceae), sendo eles *Candida pseudotropicalis*, *Trichophyton* sp., *Candida tropicalis* e *Chrysosporium* sp., apresentaram atividade antagonista contra *S. sclerotiorum*, nestes ensaios observou-se a inibição de crescimento micelial do *S. sclerotiorum* de 46,7%, a 50,0 % (ROCHA et al., 2009). A presença de halos de inibição em alguns ensaios também foi considerado pelos autores como indicativo de antibiose.

Não obstante, nos isolados endofíticos GK A3.3, GK A3.8, GK A3.15, GK A3.5, GK C5.2 e GK D2.4 verificou-se a presença de coloração marrom-amarelada na borda do endofítico mais próxima do *S. sclerotiorum*, algo também relatado por Badalyan; Innocenti; Garibyan (2002), em ensaios com *Fusarium culmorum* quando pareado com *Lentinula edodes* e com *Coriolus versicolor* e também entre *Rhizoctonia cerealis* e *Kühneromyces mutabilis*.

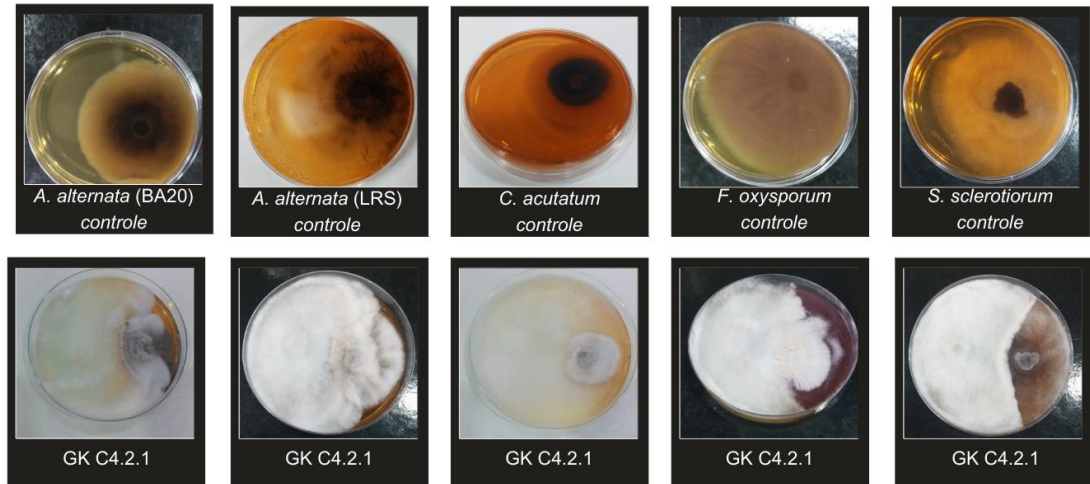
Conforme se observa na Tabela 2, os resultados da classificação em escala de classes de antagonismo propostas por Bell, Wells e Markham (1982) apontam que o isolado GK C4.2.1 apresenta atividade antagonista contra todos os fitopatógenos testados e o pareamento observado entre esse fungo endofítico e os fitopatógenos *A. alternata*, *C. acutatum* e *F. oxysporum* foi do tipo *replacement* após contato micelial (BADALYAN; INNOCENTI; GARIBYAN, 2002), que é o crescimento de um fungo sobre o outro sem inibição mútua inicial. Esse comportamento foi observado apenas no pareamento com esse endofítico e pode estar associado a produção de agentes antifúngicos (GLOER, 1995). Já no pareamento do isolado GK C4.2.1 com *S. sclerotiorum*, apesar de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno em 71%, observou-se que este isolado não foi capaz de crescer sobre o fitopatógeno, que apresentou certa resistência (Figura 12). As observações nos ensaios com os isolados CC A3.5 e CC A4.9 indicam atividade antagonista contra *A. alternata* (BA20), *A. alternata* (LRS), *C. acutatum* e *S. sclerotiorum*. Os resultados observados nos ensaios com o isolado B1.3 sugerem atividade antagonista contra *A. alternata* (LRS) e *C. acutatum*. De acordo com a classificação utilizada, os demais isolados foram considerados não tão antagonistas. No entanto, nove deles apresentaram halos de inibição nos ensaios de culturas pareadas, com comportamento do tipo *deadlock* à distância (BADALYAN; INNOCENTI; GARIBYAN, 2002), onde foi observada inibição mútua e nenhum dos microrganismos foi capaz de crescer sobre o outro.

Tabela 2 – Classificação dos fungos endofíticos (BELL; WELLS; MARKHAM, 1982)

Fungos endofíticos	<i>A. alternata</i> (BA 20)	<i>A. alternata</i> (LRS)	<i>C. acutatum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
CC A3.5	2	2	2	3	2
CC A5.3	3	4	3	4	4
CC A4.9	2	2	2	3	2
GK A3.3	3	3	3	4	3
GK A3.8	3	3	3	4	3
GK A3.15	3	3	3	4	3
GK A3.5	3	3	3	4	3
GK B1.1	3	3	3	4	3
GK B1.3	2	3	2	3	3
GK C3.9	3	3	3	4	3
GK C4.2.1	1	1	1	1	2
GK C5.2	3	3	3	4	3
GK D2.4	3	3	3	4	3

Fonte: Autora (2023).

Figura 12 – Crescimento do isolado GK C4.2.1 sobre os fitopatógenos. À esquerda na placa, endofítico; à direita na placa, fitopatígeno.



Fonte: Autora (2023).

4.2 EXTRATOS BRUTOS

Os extratos brutos obtidos apresentaram diferentes massas, devido às características de crescimento de cada isolado, conforme observa-se no Quadro 2.

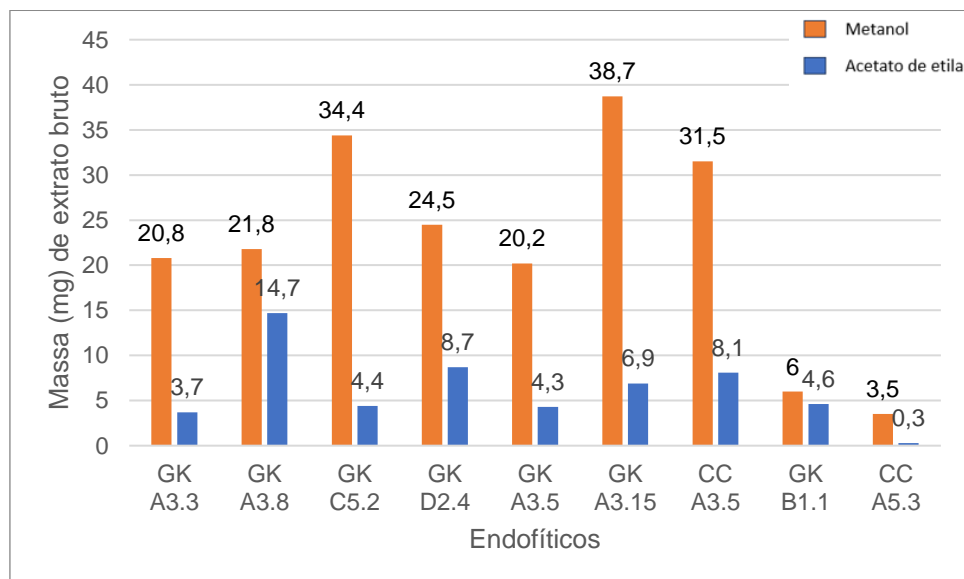
Quadro 2 – Massas secas (g) obtidas no crescimento em meio líquido de cada fungo endofítico

Fungos endofíticos	Massa seca (g)
GK A3.3	0,2554
GK A3.8	0,2861
GK C5.2	0,3078
GK D2.4	0,2671
GK A3.5	0,315
GK A3.15	0,275
CC A3.5	0,3114
GK B1.1	0,1571
CC A5.3	0,0961

Fonte: Autora (2023).

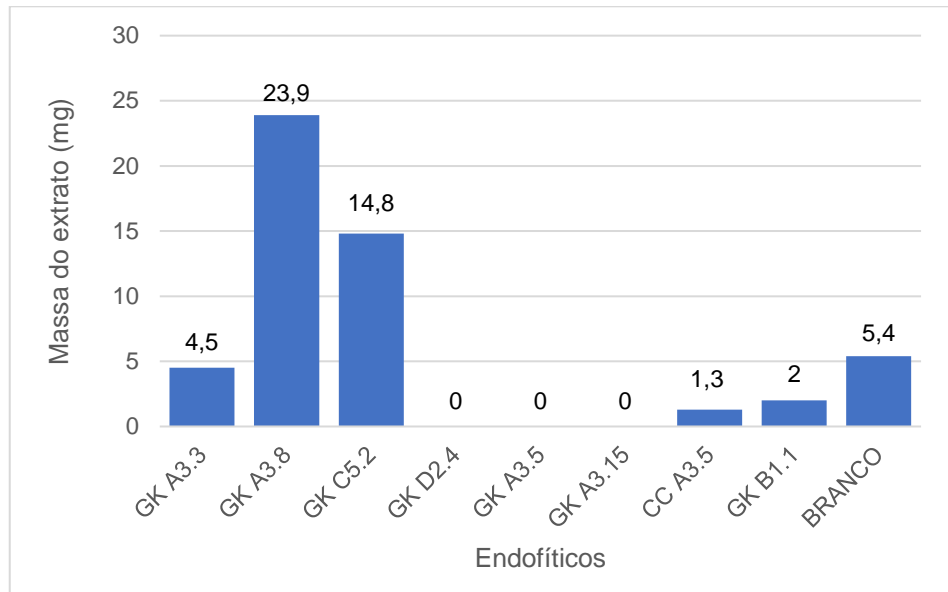
Foram obtidos 30 extratos no total, sendo esses derivados das extrações do micélio em acetato de etila e em metanol (Gráfico 8); e da fase orgânica do sobrenadante, sem formação de emulsão (Gráfico 9) e com formação de emulsão (Gráfico 10), já que os compostos bioativos podem ser secretados tanto para o meio extracelular, devendo ser extraídos do meio de cultura, quanto estarem contidos internamente nos fungos, exigindo extração química dos micélios (CANUTO et al., 2012). A presença de emulsão pode ser atribuída a questões que favoreceram à sua formação, como agitação, temperatura e solubilidade. Todos os extratos foram utilizados nos testes de disco difusão em placa, para observar se apresentam halos de inibição contra os fitopatógenos.

Gráfico 8 – Massa (mg) de extrato bruto obtido de extração do micélio em acetato de etila e em metanol



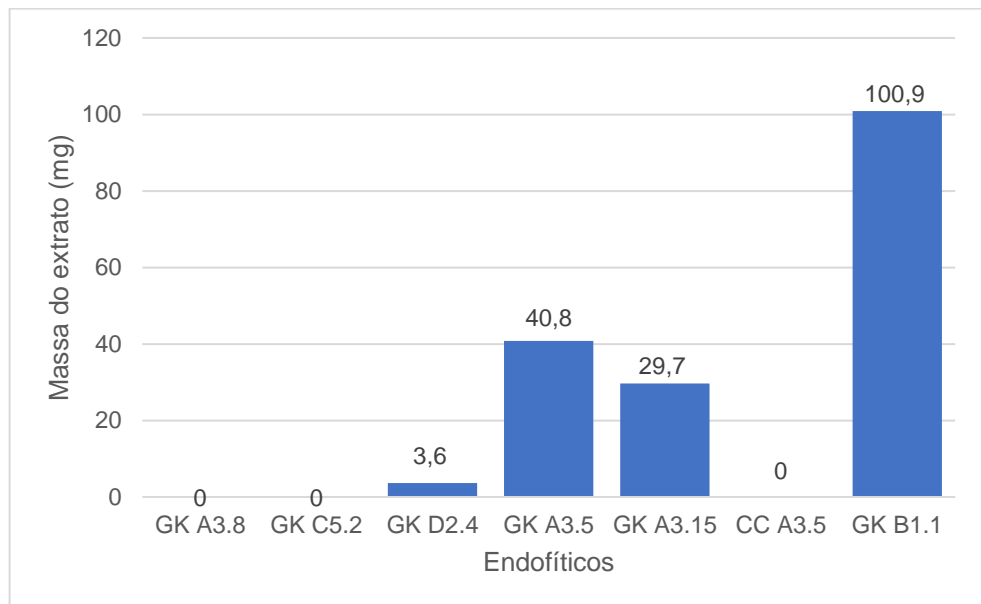
Fonte: Autora (2023).

Gráfico 9 – Extrato obtido do sobrenadante (fase orgânica) em acetato de etila (sem emulsão)



Fonte: Autora (2023).

Gráfico 10 – Extrato obtido do sobrenadante (fase orgânica) em acetato de etila (com emulsão)

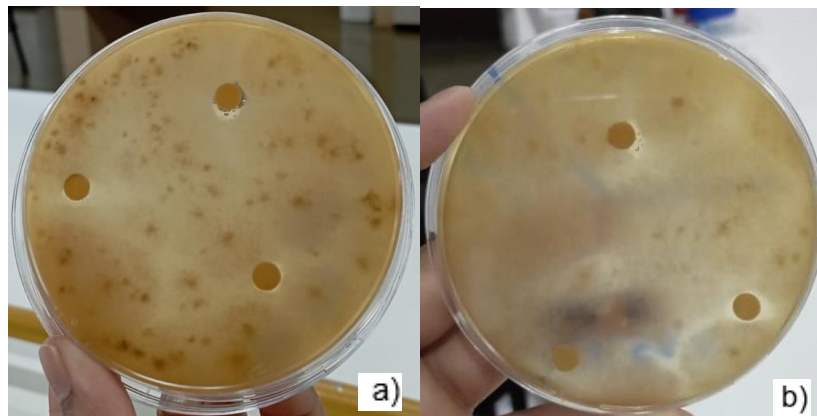


Fonte: Autora (2023).

4.3 ENSAIOS DE DISCO-DIFUSÃO

Inicialmente, notou-se a formação de halo de inibição após quatro dias de cultivo, com alguns extratos: GK A3.8 (acetato de etila) GK A3.5 (metanol), GK A3.8 (acetato de etila), GK A3.5 (acetato de etila), GK D2.4 (emulsão em acetato de etila), GK C5.2 (acetato de etila), GK A3.15 (acetato de etila) e CC A5.3 (acetato de etila). Após sete dias de ensaios, apenas os extratos derivados da extração do micélio em acetato de etila dos isolados GK D2.4 e GK C5.2 apresentaram halos de inibição, como observa-se na figura 13.

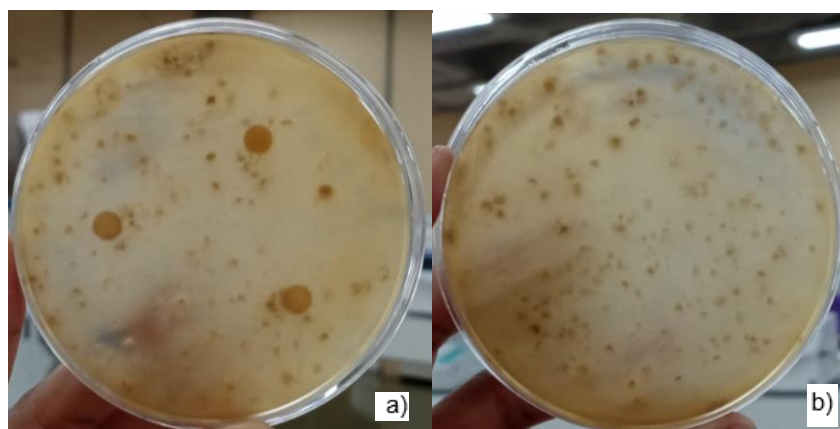
Figura 13 – Extratos que apresentaram halos de inibição após sete dias de ensaio de disco-difusão. a) GK D2.4 (acetato de etila) b) GK C5.2 (acetato de etila)



Fonte: Autora (2023).

Figura 14 – Controles dos ensaios de disco-difusão.

a) Controle com metanol b) controle com *S. sclerotiorum*



Fonte: Autora (2023).

Os halos de inibição podem ser devido a produção de metabólitos antifúngicos responsáveis pela inibição de *S. sclerotiorum* e as concentrações de extratos brutos utilizados, bem como a natureza dos solventes podem ter influenciado no tamanho de cada halo observado.

5 CONCLUSÕES

Considerando os impactos ambientais relacionados às práticas agrícolas tradicionais, o presente trabalho propôs realizar uma bioprospecção da atividade antagonista de fungos endofíticos isolados de plantas nativas do Paraná contra fungos fitopatogênicos de interesse agrônômico, algo que ainda não havia sido relatado na literatura. Nesse sentido, foi possível mensurar a porcentagem de inibição da área de crescimento micelial de cada um dos fitopatógenos quando em confronto direto com os fungos endofíticos; obter seus extratos em acetato de etila e em metanol e testá-los em placa, por disco-difusão, além de avaliar as diferentes interações entre esses fungos, com base em escala de antagonismo.

Observou-se que diversos isolados endofíticos, tanto de *G. kunthiana* quanto de *C. canjerana*, possuem potencial para inibição de fitopatógenos. Destacam-se com potencial de inibição de *A. alternata* (BA20) os isolados GK C4.2.1 e CC A4.9, que inibiram a área de crescimento micelial do fitopatógeno em 68,7% e 63,7%, respectivamente; com potencial de inibição de *A. alternata* (LRS) os isolados CC A4.9 e CC A3.5, que inibiram a área de crescimento micelial do fitopatógeno em 77,8% e 72,3%, respectivamente; com potencial de inibição de *C. acutatum* os isolados GK C4.2.1 e CC A4.9, que inibiram a área de crescimento micelial do fitopatógeno em 62,1% e 59,7%, respectivamente; com potencial de inibição de *F. oxysporum* os isolados CC A3.5 e GK C4.2.1, que inibiram a área de crescimento micelial do fitopatógeno em 57,6% e 54,9%, respectivamente e com potencial de inibição de *S. sclerotiorum* os isolados CC A3.5 e CC A4.9, que inibiram a área de crescimento micelial do fitopatógeno em 73,0% e 71,8%, respectivamente.

Também foi possível verificar a presença de halos de inibição contra *S. sclerotiorum* em ensaios com nove dos fungos endofíticos, variando entre 3,5 e

10,5 mm, o que foi considerado indicativo de antagonismo pela produção de metabólitos difusíveis. Houve halos de inibição contra *S. sclerotiorum* nos ensaios de disco-difusão em extratos em acetato de etila dos isolados endofíticos GK D2.4 e GK C5.2. Os extratos obtidos seguem preservados possíveis para análises posteriores. Com essas análises, pôde-se contribuir ainda mais com o desenvolvimento de métodos para o controle de fitopatógenos, que diminuam a necessidade de utilização de agrotóxicos, o que pode auxiliar a promover o desenvolvimento de práticas mais sustentáveis na agricultura, indo, portanto, de encontro aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável.

REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C. et al. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847-850, 2016.
- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics international**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ARORA, N. K. et al. Environmental sustainability: challenges and viable solutions. **Environmental Sustainability**, v. 1, p. 309-340, 2018.
- BADALYAN, S. M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 41, p. 200-225, 2002.
- BARBOSA, C. da S.; BORGES, L. M. F.; LOULY, C. C. B.; ROCHA, T. L.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. de; MIGUITA, C. H.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R. In vitro activity of 3 β -o-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana* A. Juss (Meliaceae) on oogenesis and ecdysis of the cattle tick *Rhipicephalus (boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, Elsevier BV, v. 164, p. 5–11, may 2016.
- BELL, D. K. et al. In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of Sclerotinia sclerotiorum. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, n. 2, p. 93-108, 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. PHJ; NELSON, B. D. Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- CANUTO, K. M. et al. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. 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**, p. 421-437, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural product drug discovery in the next millennium. **Pharmaceutical biology**, v. 39, n. sup1, p. 8-17, 2001.

DE ALMEIDA, Tiago Tognolli et al. AVALIAÇÃO DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE GIRASSOL COM ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA CONTRA O FITOPATÓGENO *Alternaria alternata*. Anais Eletrônicos do VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar. 2011.

FLORES, T. B. Meliaceae in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9996>>. Acesso em: 21 jun. 2023

FLORES, T.B. Meliaceae in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9988>>. Acesso em: 21 jun. 2023

HERNÁNDEZ-CEJA, A. et al. In vitro antifungal activity of plant extracts on pathogenic fungi of blueberry (*Vaccinium* sp.). **Plants**, v. 10, n. 852, 2021.

United Nations - UN. 2020. “Goal 2: Zero Hunger” Disponível em: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/hunger/>

ROCHA, R. et al. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 73-78, 2009.

MAGRINI, F. E. et al. Antifeedant activity and effects of fruits and seeds extracts of *Cabralea canjerana canjerana* (Vell.) Mart.(Meliaceae) on the immature stages of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 150-158, 2015.

MAHMOOD, I. et al. Effects of pesticides on environment. **Plant, soil and microbes**: volume 1: implications in crop science, p. 253-269, 2016.

MEDEIROS, Milena da. S. et al. Antagonismo in vitro de *Fusarium oxysporum* por cepas de *Trichoderma* spp. **Cadernos de Agroecologia**, v. 15, n. 2, 2020.

MULYANI, Y; SINAGA, S. E.; SUPRATMAN, U.; Phytochemistry and biological activities of endophytic fungi from the meliaceae family. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 778, 2023.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NOZAKI, Márcia de. H. et al. Controle in vitro de *Alternaria solani* por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Cultivando o Saber**, v. 11, n. 4, p. 9-16, 2018.

PENG, Y. et al. Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 670135, 2021.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 89-96, 2001.

SAITO, O. et al. Sustainability science and implementing the sustainable development goals. **Sustainability Science**, v. 12, p. 907-910, 2017.

SANTANA, C. M. et al. Exposição ocupacional de trabalhadores rurais a agrotóxicos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, p. 301-307, 2016.

SARMENTO, U. C. et al. Larvicidal efficacies of plants from midwestern brazil: melianodiol from guarea kunthiana as a potential biopesticide against aedes aegypti. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, FapUNIFESP (SciELO), v. 111, n. 7, p. 469–474, jun 2016.

SILVA, J. C.; BETTIOL, W. Controle da murcha de fusarium do tomateiro com Fusarium oxysporum não patogênico. Embrapa Meio Ambiente (CNPMA) In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, 9., Recife/PE. Anais. Recife/PE: SICONBIOL, p. 132, 2005.

TIMMIS, K. et al. The contribution of microbial biotechnology to sustainable development goals. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 984-987, 2017.

TONGO, I. et al. Levels, bioaccumulation and biomagnification of pesticide residues in a tropical freshwater food web. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-16, 2022.

WILKINSON, D. A. et al. Habitat fragmentation, biodiversity loss and the risk of novel infectious disease emergence. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 149, p. 20180403, 2018.

YAN, L. et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 6279-6298, 2018.

ŽIVKOVIĆ, Svetlana et al. Screening of antagonistic activity of microorganisms against Colletotrichum acutatum and Colletotrichum gloeosporioides. **Archives of Biological Sciences**, v. 62, n. 3, p. 611-623, 2010.