



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

# **Composição volátil e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos da oliveira**

**Cynthia Malhadas**

**Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança  
e à Universidade de Salamanca para obtenção do  
Grau de Mestre em Farmácia e Química dos Produtos Naturais**

**Orientado por :**

**Professora Doutora Paula Baptista  
Doutora Paula Guedes**

**Bragança  
2014**



“À estrelinha que me guia...  
... Avó”



## **Agradecimentos**

Chega ao fim uma das etapas mais importantes da minha vida. A entrega desta tese, marca uma vírgula no meu percurso académico. Pois, penso que pontos nunca deveriam existir no caminho da vida!

Agradeço à minha orientadora Doutora Paula Baptista, por todo o carinho, preocupação, ajuda, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e acima de tudo, amizade. Obrigado, por ter estado sempre a meu lado e ter-me dado animo e força;

À minha co-orientadora Doutora Paula Guedes, pela disponibilide e ajuda;

Ao Ricardo Malheiro, pela total disponibilidade, transmissão de conhecimentos, ajuda, conselhos e força nesta fase;

Ao laboratório de Agrobiotecnologia, em especial, à Teresa, Nuno e Diogo Ferrão, pela amizade, momentos bem passados em ótima disposição;

Ao meu Migo Pedro, pela nossa amizade desde do início da nossa vida em Bragança, por teres sido sempre tu, pela ajuda, carinho, lágrimas, risos, desabafos, momentos bem passados jamais esquecidos e paciência para comigo nesta fase;

Ao meu Titi pela amizade, pelo carinho, pelo teu mau feitio e o meu, e pela força que me deste nesta fase;

À minha Cláudia, pela amizade, por teres tido sempre uma palavra meiga e de incentivo, pelas horas a fio ao telemovél, palavras para quê?

Aos meus xuxus do Mestrado, à Marta, à Azucena, e em especial a Méliissa e ao Tó, pela experiência incrível que vivemos em Salamanca, pelos momentos passados na nossa querida Piazza, pela força, pelo carinho, pela paciência, e acima de tudo o que nos juntou ainda mais e que ficará para sempre a nossa amizade;

À minha little Jusse, por toda a amizade, carinho e força, mesmo longe tiveste sempre sempre a meu lado;

À minha querida Sofia, pela nossa amizade, ajuda incondicional, desabafos, força, carinho e o resto tu sabes...;

Á minha querida Lili, pela força e preocupação que sempre tiveste comigo;

Às meninas lá de casa, à Diana por ter uma palavra de conforto nesta fase e pela boa disposição e jantares feitiños ao chegar, à Elzinha pelos momentos bem passados, risos, lágrimas, desabafos e pela nossa amizade;

A todos os meus amigos que se cruzaram comigo nesta vida académica;

*Á ma famille pour tout, loin mais toujours là...*

A TI, pelo amor, carinho, amizade, cumplicidade, pela força que me deste nesta fase, por me acalmares, pela paciência, por me fazeres rir mesmo quando não tinha vontade para isso, pelas palavras de incentivo, por teres acreditado sempre em mim, simplesmente por seres tu e fazeres parte da minha vida;

Aos meus pais e a minha irmã, pelo amor incondicional, pela força, carinho, ajuda, por terem acreditado sempre sempre em mim, por me fazerem sentir todos os dias a pessoa mais privilegiada deste mundo por ter uns pais e uma irmã como vocês, pelos desabafos que duram horas e horas, pelos bons conselhos, a vós vos devo tudo.

Ao meu cunhado por ter sempre uma palavra de incentivo, ao meu sobrinho por me perguntar repetitivamente: “Titi, já está”?

E assim, te respondo agora meu querido sobrinho, “sim já”, e isso devo a TODOS vocês.

**Mais uma vez um MUITO OBRIGADO.**

Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto “EndoBio - Isolamento e seleção de fungos endofíticos da oliveira para luta biológica contra *Colletotrichum acutatum* e *Verticillium dahliae*” (PTDC/AGR-PRO/4354/2012).





# Índice

Resumo.....	xi
Abstract .....	xiii
Capítulo 1 .....	1
Introdução.....	1
1.1. Introdução geral .....	3
1.2. Fungos endofíticos .....	4
1.3. Metabolitos bioativos produzidos por fungos endofíticos .....	7
1.4. Bioprospeção de metabolitos bioativos.....	15
1.5. Isolamento e identificação do fungo.....	17
1.6. Cultura do fungo e otimização da produção de metabolitos .....	18
1.7. Elucidação da natureza química do metabolito.....	18
1.8. Avaliação das propriedades biológicas dos metabolitos fúngicos .....	19
1.9. Importância do estudo dos fungos endofíticos da oliveira.....	20
1.10. Objetivos .....	21
Objetivos específicos: .....	21
Bibliografia .....	23
Capítulo 2 .....	31
Volatile composition and antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree .....	31
Capítulo 3 .....	67
Conclusões .....	67



## Resumo

Nos últimos anos, os fungos endófitos associados a diversas espécies de plantas, têm sido explorados como potenciais produtores de novos compostos antimicrobianos para superar os grandes problemas de resistência dos microrganismos aos antibióticos/antifúngicos. No entanto, estudos sobre fungos endófitos de *Olea europaea* L., são ausentes. Neste trabalho, foi estudado o potencial antimicrobiano de três fungos endófitos de *O. europaea* e avaliado o efeito da planta hospedeira neste potencial. Os compostos voláteis produzidos pelos endófitos foram identificados por cromatografia gasosa / espectrometria de massa, e posteriormente correlacionados com a atividade antimicrobiana. Os fungos endófitos, *Penicillium commune* e *Penicillium canescens* foram os mais eficazes na inibição de bactérias [até 2,7 vezes mais em comparação com cloranfenicol (30 µg/mL)] enquanto que *Alternaria alternata* foi mais eficaz na inibição de leveduras [até 8,0 vezes mais em comparação com o fluconazol (25 µg/mL)]. Esta espécie foi também a que apresentou o maior espectro de atividade na concentração mínima inibitória  $\leq 0,095$  mg/mL. O extracto de planta hospedeira mostrou desempenhar um papel importante na actividade antimicrobiana dos endófitos, dependendo da espécie. A análise do perfil volátil de *A. alternata* e *P. canescens*, permitiu identificar seis compostos voláteis, sendo 3-metil-1-butanol e fenil-etil álcool os mais abundantes. Outros compostos voláteis identificados incluíram o 3-metil-1-butanol acetato, 1-octen-3-ol,  $\beta$ -cedreno e thujopsene. Através da análise de componentes principais, foi possível verificar que a atividade antimicrobiana exibida por *A. alternata* pode estar relacionada com a sua composição volátil, principalmente devido ao elevado teor de voláteis antimicrobianos 3-metil-1-butanol e fenil-etil álcool. Em geral, os resultados obtidos destacaram o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos de *O. europaea* e a possibilidade de serem explorados pelos seus agentes antimicrobianos.

**Palavras-chave:** *Olea europaea*; *Alternaria alternata*; Concentração mínima inibitória; HS-SPME/GC/MS



## Abstract

In recent years, fungal endophytes from diverse host plant species, have been examined as potential producers of novel antimicrobials to overcome the growing problems of drug resistance in microorganisms. Studies on fungal endophytes from *Olea europaea* L. are however absent. In this study, the antimicrobial potential of three fungal endophytes from *O. europaea* was studied and the host plant effect in the antimicrobial activity was examined. The volatile compounds produced by endophytes were identified by gas chromatography/mass spectrometry and further correlated with the antimicrobial activity. Both *Penicillium commune* and *Penicillium canescens* were most effective in inhibiting bacteria [in average up to 2.7-fold compared to chloramphenicol (30 µg/mL)] whereas *Alternaria alternata* was most effective in inhibiting yeasts [in average up to 8.0-fold compared to fluconazole (25 µg/mL)]. This specie also displayed the widest spectrum of anti-microorganisms at MIC ≤ 0.095 mg/mL. Host plant extract showed to play an important role in the antimicrobial activity of the endophytes, depending on the species. From the volatile composition of *A. alternata* and *P. canescens*, six volatiles were identified, being 3-methyl-1-butanol and phenylethyl alcohols the most abundant. Others volatiles like 3-methyl-1-butanol acetate, 1-octen-3-ol, β-cedrene and thujopsene were identified. By a principal component analysis it was possible to verify that the antimicrobial activity displayed by *A. alternata* may be related to its volatile composition, mainly due to the high content in the antimicrobial volatiles 3-methyl-1-butanol and phenylethyl alcohol. Overall the obtained results highlighted the antimicrobial potential of endophytic fungi from *O. europaea* and their possibility to be exploited for their antimicrobial agents.

**Keywords:** *Olea europaea*; *Alternaria alternata*; minimum inhibitory concentration; HS-SPME/GC/MS





# Capítulo 1

## Introdução



## 1.1. Introdução geral

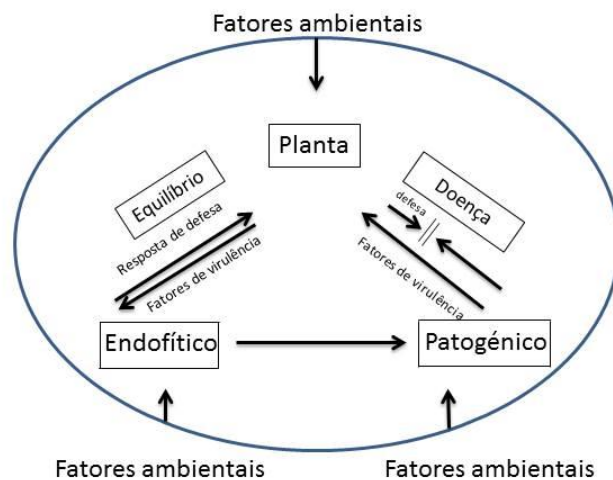
Atualmente, a pesquisa de compostos bioativos naturais com aplicação no tratamento e prevenção de doenças humanas tem vindo a ganhar cada vez mais importância (Donadio et al., 2010). Alguns destes estudos centram-se na bioprospeção de produtos naturais de origem microbiana, tendo sido já descritos neste âmbito mais de 22 000 metabolitos secundários bioativos (Berdy, 2005). De entre os microrganismos com maior importância como fonte de produtos naturais destacam-se os fungos, sendo responsáveis por 38% do total dos compostos biologicamente ativos de origem microbiana descritos (Berdy, 2005). A maioria destes metabolitos é explorada pela sua atividade como antibióticos, imunossuppressores e antineoplásicos (Strobel & Daisy, 2003). Dos fármacos mais conhecidos e derivados de fungos destacam-se os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossuppressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros (Cragg e Newman, 2005; Greve et al., 2010).

Apesar dos fungos serem reconhecidos como uma importante fonte de produtos bioativos naturais é estimado que, uma grande quantidade destes compostos, se encontre ainda por identificar (Higginbotham et al., 2013). Este facto deve-se sobretudo ao desconhecimento da diversidade fúngica. Na realidade, somente cerca de 6,7% da diversidade fúngica total que se estima existir na Terra é conhecida (Kirk et al., 2008). Desta forma, estudos que visem a avaliação da diversidade fúngica em diversos ecossistemas e a bioprospeção de novos produtos naturais resultantes do seu metabolismo, serão um contributo valioso para a obtenção de novos fármacos. Nestes estudos de bioprospeção de compostos bioativos naturais deve ser dada especial atenção aos fungos que estabelecem associação mutualista com as plantas. Durante o estabelecimento destas associações são induzidas vias biossintéticas específicas que produzem novos e diversos metabolitos secundários (Carter, 2011), dependendo de fatores bióticos (e.g. espécies envolvidas na interação) e abióticos (e.g. fatores climáticos) (Soliman et al., 2013). Os fungos endofíticos são organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem aparentemente causarem quaisquer danos no hospedeiro (Hyde & Soyong, 2008). Nos últimos anos, estes fungos têm sido alvo de

estudos com vista à identificação de novos produtos bioativos naturais que possam ser utilizados não só na indústria farmacêutica (Liang et al., 2012; Qadri et al., 2013), mas também alimentar e agrícola (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

## **1.2. Fungos endofíticos**

Os fungos endofíticos são microrganismos que colonizam inter- e intracelularmente os tecidos internos das plantas, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causarem sintomas aparentes de doença no hospedeiro (Hyde e Soyong, 2008). O tipo de interação que se estabelece entre fungo endófito-planta hospedeira é geralmente mutualista, mas também pode tornar-se parasita originando doença na planta hospedeira (Schulz & Boyle, 2005). Na interação mutualista, o fungo endófito aumenta o crescimento, reprodução e resistência/tolerância a stresses bióticos (insetos, herbívoros, fitopatogénicos) e abióticos (stresse hídrico, salinidade, metais pesados, entre outros) da planta hospedeira (Saikkonen et al., 2004; Jalgaonwala et al., 2011). Por sua vez, a planta hospedeira serve de refúgio ao endófito protegendo-o, fornece-lhe os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e possui ainda um papel importante na sua transmissão (Saikkonen et al., 2004). Pensa-se que a interação mutualista seja o resultado de um equilíbrio estabelecido entre a resposta de defesa da planta à invasão fúngica e a virulência (Schulz & Boyle, 2005) ou as necessidades nutricionais do endófito, bem como das condições ambientais onde decorre a interação (Kogel, 2006). Se por qualquer motivo este equilíbrio for perturbado, surgem sintomas de doença na planta ou alternativamente o fungo é excluído devido a reações de defesa da planta (Kogel, 2006). Esta hipótese, proposta por Schulz e Boyle (2005) com o intuito de explicar a relação do fungo endófito como parasita ou mutualista com a planta hospedeira, encontra-se evidenciado na figura 1.



**Figura 1** – Hipótese explicativa para o estabelecimento de relações mutualistas ou parasitas entre fungo endofítico - planta hospedeira (adaptado de Schulz e Boyle, 2005). A ocorrência de equilíbrio entre a resposta de defesa da planta e a virulência do fungo resulta numa interação mutualista. Na ausência de equilíbrio a interação é parasita ocorrendo doença.

Os fungos endofíticos são ubíquos tendo sido observada a sua presença em todas as espécies de plantas estudadas até ao momento, desde herbáceas a lenhosas, e em todas as regiões e habitats amostrados (Arnold, 2007; Finlay, 2007; Jalgaonwala et al., 2011). A maioria das espécies fúngicas endofíticas pertencem ao filo Ascomycota (Arnold, 2007). No entanto, espécies pertencentes aos filios Basidiomycota e Deuteromycota, e alguns Oomicetes, foram também identificados (Kogel et al., 2006; Rodriguez et al., 2009).

Os fungos endofíticos são classificados em dois grupos, clavicipitáceos e não-clavicipitáceos, de acordo com diferenças evolutivas, taxonómicas, planta hospedeira e funções ecológicas (Rodriguez et al., 2009). O grupo dos clavicipitáceos inclui fungos pertencentes sobretudo à família Clavicipitaceae (filo Ascomycota) que colonizam principalmente espécies de gramíneas de climas temperados (Rodriguez et al., 2009). A colonização das plantas por estes fungos é feita de modo sistémico, e as espécies são

transmitidas verticalmente pelas sementes para a próxima geração (Saikkonen K et al., 2002). Os fungos endofíticos clavicipitáceos são reconhecidos por favorecerem o crescimento e aumentarem a tolerância das plantas à herbivoria por insetos e a fitopatogêneos, e a vários stresses abióticos (secura, metais pesados, entre outros) (Torres et al., 2012). Grande parte destes benefícios deve-se à produção de metabolitos secundários bioativos por parte dos fungos, destacando-se neste âmbito as espécies pertencentes aos gêneros *Cordyceps*, *Balansia*, *Epichloe* (forma anamórfica: *Neotyphodium*), *Claviceps* e *Myriogenospora* (Rodriguez et al., 2009). No entanto, as vantagens conferidas por estes fungos dependem da espécie e do genótipo da planta hospedeira, e das condições ambientais (Higgins et al., 2014). O grupo não-clavicipitaceos inclui espécies fúngicas filogeneticamente diversas, pertencentes maioritariamente ao filo Ascomycota (Pezizomycotina e Saccharomycotina) e Basidiomycota (Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina) (Rodriguez et al., 2009). A maioria das espécies pertence a gêneros vulgarmente ubíquos, tais como *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Coniothyrium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geniculosporium*, *Phoma*, *Pleospora* e *Phomopsis* (Schulz & Boyle, 2005). Estes fungos colonizam briófitas, pteridófitas, gimnospérmicas e angiospérmicas (Rodriguez et al., 2009). Apesar de serem menos estudados face ao grupo anterior, os fungos não-clavicipitaceos têm demonstrado ter efeitos variáveis nas plantas hospedeiras, sendo os efeitos benéficos os mais mencionados. Estes fungos promovem o crescimento e aumento da produção e aumentam a tolerância a stresses abióticos e bióticos (e.g. fitopatogêneos) da planta hospedeira (Waqas et al., 2012). São ainda considerados uma fonte rica de compostos com interesse biotecnológico (e.g. enzimas; Robl et al., 2013) e farmacológico, pela produção de metabolitos secundários novos com atividades biológicas diversas (Smith et al., 2008).

A composição da comunidade fúngica endofítica na planta hospedeira geralmente varia de acordo com a espécie vegetal (Moricca et al., 2012), localização geográfica (Hoffman e Arnold, 2008), condições climáticas (Giauque & Hawkes, 2013) e difere entre os vários tecidos e órgãos de uma mesma planta hospedeira (Moricca et al., 2012). A preferência de uma espécie endofítica por um determinado órgão da planta hospedeira pode dever-se à composição química desse tecido. De fato, os diferentes tecidos e órgãos da planta hospedeira podem constituir microhabitats distintos, permitindo o desenvolvimento de uma determinada espécie fúngica endofítica. Foi já descrita a

presença de fungos endofíticos em folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais como pólen, ovário, anteras e estames (Kumar & Hyde, 2004).

Uma única planta pode conter várias dezenas de espécies fúngicas endofíticas e, uma única espécie vegetal, distribuída por uma determinada área geográfica, pode albergar centenas de espécies endofíticas (Rodríguez et al., 2009). Por exemplo, nalgumas angiospérmicas tropicais verificou-se que 2 mm<sup>2</sup> de tecido foliar pode conter mais do que uma espécie fúngica endofítica (Gamboa et al., 2003).

### **1.3. Metabolitos bioativos produzidos por fungos endofíticos**

O estabelecimento da interação mutualista entre fungo endofítico-planta hospedeira caracteriza-se pela produção de metabolitos secundários que desempenham um papel importante para o hospedeiro e/ou uma função ecológica relevante. A produção destes metabolitos bioativos tem como principal objetivo o aumento da tolerância/resistência da planta hospedeira a fitopatogéneos, ataque de insetos praga e herbívoros (Ownley et al., 2010). Prevê-se que a diversidade destes metabolitos seja elevada dada a multiplicidade de vias biossintéticas que podem ocorrer durante a associação mutualista (Carter, 2011). A variabilidade de fatores bióticos (tais como as espécies envolvidas na interação) e abióticos (como por exemplo fatores ambientais) contribuem também para o incremento da diversidade de metabolitos produzidos durante a interação fungo endofítico-planta (Soliman et al., 2013).

Os metabolitos secundários isolados de fungos endofíticos pertencem a várias classes tais como alcalóides, esteróides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, lignanas, ácidos fenólicos, entre outros (Zhang et al. 2006; Yu et al. 2010). Estes compostos naturais, produzidos por fungos endofíticos, apresentam um amplo espectro de actividades biológicas, como por exemplo antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica (Ondeyka et al. 1997 ; Zhang et al. 1999 ; Guo et al., 2000 ; Zhang et al., 2006 ; Shweta et al., 2010 ; Wang et al., 2012).

No que concerne especificamente à atividade antimicrobiana, os metabólitos isolados de fungos endófitos pertencem a diversas classes estruturais tais como alcalóides, peptídeos, terpenóides, esteróides, fenóis, flavonóides e quinonas (Tabela 1).

Os alcalóides são compostos orgânicos nitrogenados, em geral heterocíclicos, e com ação tóxica e alucinogênica. Vários estudos têm demonstrado o efeito antimicrobiano de alcalóides produzidos por fungos endofíticos (Yu et al., 2010). Os alcalóides identificados como pirrocidinas A e B, produzidas durante o processo fermentativo do fungo endofítico *Acremonium zeae* isolado de milho, mostraram uma significativa atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positiva, *Candida albicans* e alguns fungos filamentosos (Wicklow et al., 2005). De igual modo, foi isolado do fungo *Chaetomium globosum* isolado de folhas de *Ginkgo biloba* vários alcalóides (chaetoglobosina A e C) que apresentavam atividade antimicrobiana contra *Mucor miehei* (Qin et al., 2009).

Os peptídeos são outra classe de compostos com enorme importância a nível antimicrobiano, sendo as penicilinas os compostos mais conhecidos desta classe. A partir da cultura do fungo endofítico *Penicillium* sp. isolado de *Acrostichum aureum*, Cui et al. (2008), identificaram 2 novos peptídeos cíclicos, (Pro-Thr) e (Pro-Tyr), que mostraram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Terpenóides, terpenos ou isoprenóides são três nomes utilizados para designar uma extensa e numerosa família de produtos naturais, alguns dos quais comercializados como fármacos. Os terpenóides podem ser subdivididos em várias classes de acordo com o número de átomos de carbono ou seja de unidades isoprenicas (como mono, sesqui, di, tri, tetraterpenóides, esteróides, entre outros). No âmbito dos fungos endofíticos, foi por exemplo já verificada a ação antimicrobiana de 5 sesquiterpenos (cadinenos) produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* isolado da planta *Cassia spectabilis* (Silva et al., 2006).

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos de baixo peso molecular e correspondem a metabólitos secundários com propriedades bioativas. As principais classes dos compostos fenólicos são os ácidos fenólicos e os flavonóides (Cowan, 1999). A este último grupo pertence um número alargado de famílias de compostos como os flavanóis, os flavonóis, as flavanonas, as flavonas e as antocianinas, que diferem no seu padrão de oxidação (Cowan, 1999). A atividade dos flavonóides é

devida à capacidade de formarem complexos nas proteínas extracelulares solúveis e outros componentes das paredes celulares bacterianas. Desta forma, a actividade antimicrobiana destes compostos tem como principal alvo as membranas bacterianas (Cowan, 1999). Hoffman et al. (2008) estudaram os metabolitos do meio fermentativo do fungo endofítico *Phoma sp.* isolado da planta *Saurauia scaberrinae*, culminando na purificação e na caracterização de um composto fenólico derivado do ácido ústico (*Phomodione*) que apresentou actividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Quinonas é o termo geral que se utiliza para classificar uma classe de compostos que são bioquimicamente endógenos, encontrados em produtos naturais ou gerados através do metabolismo de xenobióticos. As quinonas consistem num anel aromático com dois grupos cetónicos. O efeito antimicrobiano das quinonas é enorme por formarem complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos nas proteínas, conduzindo à inativação ou perda da função das enzimas (Cowan, 1999). Os alvos mais prováveis das quinonas são as adesinas, os polipeptídeos da parede celular e as enzimas membranares de células microbianas (Cowan, 1999). Aly et al. (2008) caracterizaram novos metabólitos antimicrobianos da classe das quinonas de uma cultura do fungo *Ampelomyces sp.*, endófito isolado da planta medicinal *Urospermum picroides*. Estas quinonas apresentavam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis* com  $IC_{50} = 12,5\text{--}25 \mu\text{g/mL}$ .

A maioria destes compostos com actividade antimicrobiana foram identificados em fungos endofíticos pertencentes sobretudo aos géneros *Phomopsis*, *Fusarium*, *Xylaria* e *Colletotrichum* (Tabela 1). Estas espécies fúngicas foram isoladas maioritariamente de plantas medicinais, quer de espécies herbáceas (e.g. *Artemisia annua*, *Artemisia mongolica*, *Urospermum picroides*, *Cynodon dactylon*, *Vitex negundo*, *Tripterygium wilfordii*, *Dendrobium devonianum*, *Dendrobium loddigesii*, *Hypericum perforatum*, entre outras) quer de espécies arbóreas e arbustivas (e.g. *Garcinia scortechinii*, *Garcinia mangostana*, *Ginkgo biloba*, *Azadirachta indica*, *Dracaena cambodiana*, entre outras). A actividade antimicrobiana das espécies endofíticas foi testada sobretudo contra bactérias gram-positivas (destacando-se as espécies *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e gram-negativas (em especial *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*). A actividade antimicrobiana contra leveduras e fungos filamentosos foi menos estudado

comparativamente às bactérias. Ao nível das leveduras, a mais estudada foi a *Candida albicans*.

**Tabela 1** – Exemplos de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana (adaptado de Yu et al., 2010; Radic e Strukelj, 2012).

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Acremonium zeae</i>	<i>Zea mays</i> L.	Alcalóides	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Candida albicans</i>	Wicklow et al., 2005
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Sonneratia alba</i> Sm.	Desconhecido	<i>Enterococcus cloacae</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kjer et al. 2009
<i>Ampelomyces</i> sp.	<i>Urospermum picroides</i> (L.) Scop.	Quinonas	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Aly et al. 2008
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Garcinia</i> L.	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Ramasamy et al. 2010
	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Ergosterol Ácido helvólico Monomethylsulochrin 3β-Hydroxy-5α,8α-epidioxy-ergosta-6,22-diene	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Li et al. 2005
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Compostos alifáticos Alcalóides	<i>Mucor miehei</i>	Qin et al. 2009
<i>Chloridium</i> sp.	<i>Azadirachta indica</i> A-Juss.	Javanicin	<i>Bacillus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kharwar et al. 2009

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Cladosporium sp</i>	<i>Quercus variabilis</i> Blume	Compostos alifáticos	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporium canis</i> <i>Trichophyton rubrum</i>	Wang et al. 2000
<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Artemisia annua</i> L.	Esteróides	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Lu et al. 2000
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Artemisia mongolica</i> (Besser) Fisch	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Zou et al. 2000
	<i>Vitex negundo</i> L.	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Arivudainambi et al. 2011
<i>Cryptosporiopsis sp.</i>	<i>Pinus sylvestris</i> L. <i>Fagus sylvatica</i> L.	Péptidos	Leveduras	Noble et al. 1991
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.	Péptidos	<i>Candida albicans</i>	Strobel et al. 1999
<i>Dictyosporium heptasporum*</i>	<i>Dracaena cambodiana</i>	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Cui et al. 2011
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Quercus variabilis</i> Blume	Cerebrosíde 1 Cerebrosíde 2	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Shu et al. 2004
<i>Fusarium oxysporum*</i>	<i>Dracaena cochinchinensis</i> Hort.	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Cui et al. 2011
<i>Guignardia sp.</i>	<i>Spondias mombin</i> L.	Desconhecido	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Rodrigues et al. 2000
	<i>Hopea hainanensis</i>	Monomethylsulochrin Ácido rizotónico Guignasulfide	<i>Helicobacter pylori</i>	Wang et al. 2010

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Microdiplodia sp.</i>	<i>Erica arborea</i> L.	3,4-dihydroglobosuxanthone	<i>Escherichia coli</i>	Krohn et al. 2009
<i>Microdiplodia hawaiiensis</i>	<i>Garcinia mangostana</i> Linnaeus	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Radji et al. 2011
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	<i>Lycium intricatum</i> Boiss.	Microsphaeropsone A Microsphaeropsone C Citrosein Enone	<i>Escherichia coli</i>	Krohn et al. 2009
	<i>Zygothallium fontanesii</i>	Fusidienol A 8-Hydrox-6-metil-9-oxo-9H-xanthene-1-acido carboxilico Ester metilico	<i>Escherichia coli</i>	Krohn et al. 2009
<i>Muscodor albus</i>	Árvores tropicais	Péptidos	<i>Candida albicans</i>	Strobel et al. 1999
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Acrostichum aureum</i> L.	Péptidos	<i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Cui et al. 2008
	<i>Cerbera manghas</i>	Fenóis	<i>Staphylococcus aureus</i>	Han et al. 2008
<i>Periconia sp.</i>	<i>Taxus cuspidata</i> Siebold & Zucc	Periconicin A Periconicin B	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kim et al. 2004
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Zhao e Zhou 2008 Zhao et al. 2010
<i>Phoma sp.</i>	<i>Saurauia scaberrinae</i>	Fenóis	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Hoffman et al. 2008

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Excoecaria agallocha</i> L.	Compostos alifáticos	<i>Candida albicans</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Huang et al. 2008
	<i>Garcinia dulcis</i> (Roxb.) Kurz	Alcalóides	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rukachaisirikul et al. 2008
	<i>Salix gracilistyla</i> var. Melanostachys	Phomopsichlasin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Horn et al. 1995
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Aspidosperma</i> <i>tomentosum</i>	Desconhecido	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Corrado e Rodrigues 2004
	<i>Erythrina crista-galli</i> L.	Phomol	<i>Arthrobacter citreus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium insidiosum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	We4ber et al. 2004
	<i>Cistus salviifolius</i> . L.	Pyrenocines	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i>	Hussain et al. 2012
<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Notobasis syriaca</i> (L.) Cass.	Phomosine K Phomosine A Amido de fenilalanina 2-Hydroxymetil- 4β,5α,6β- trihidroxiciclohex-2-eno Phyllostine Epiepoxydon (monoacetato)	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Escherichia coli</i>	Hussain et al. 2011
	<i>Cassia spectabilis</i>	Terpenóides	<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i> <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	Silva et al. 2006
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Monomethylsulochrin Ergosterol 3β,5α,6β- trihydroxyergosta-7,22- diene	<i>Helicobacter pylori</i> Ma et al. 2004

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Trichoderma ovalisporum</i>	<i>Panax notoginseng</i> (Burkill)	Koninginin A 2-3-dihydroxypropyloctadec-9-enoate Ácido xiquimato Citosina ribonucleoside	<i>Bacillus cereus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Dang et al. 2010
<i>Thielavia subthermophila</i>	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Hypericin Emodin	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Kusari et al. 2008
<i>Xylaria sp</i>	<i>Ginkgo biloba</i> L.	7-Amino-4-metilcumarina	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella Enteritidis</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Shigella sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio anguillarum</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Yersinia sp.</i>	Liu et al. 2008
	<i>Torreya jackii</i> Chun	1-(Xylarenone A)Xylariate A Xylarioic acid B Xylariolide A, B,C e D Methyl xylariate C Taiwapyrone	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Hu et al. 2010
<i>Acremonium sp.</i> <i>Diaporthe sp.</i> <i>Hypoxylon sp.</i> <i>Pestalotiopsis sp.</i> <i>Phomopsis sp.</i> <i>Xylaria sp.</i>	<i>Aegiceras corniculatum</i> L. Blanco <i>Avicennia alba</i> BI <i>Avicennia officinalis</i> L. <i>Bruguiera gymnorhiza</i> (L.) Savigny <i>Bruguiera parviflora</i> (Roxb) Arn. <i>Lumnitzera littorea</i> <i>Rhizophora apiculata</i> Blume <i>Rhizophora mucronata</i> Lam	Desconhecido	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Buatong et al. 2011

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Metabolito secundário	Microrganismos testados	Referência
<i>Alternaria alternata</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Drechslera dematioidea</i> <i>Guignardia bidwellii</i> <i>Phomopsis archeri</i>	<i>Lippia sidoides</i> Cham	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	De Siqueira et al. 2011
<i>Fusarium equiseti</i> <i>Guignardia vaccinii</i>	<i>Garcinia mangostana</i> Linnaeus	Desconhecido	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Sim et al. 2010
<i>Bionectria sp.</i> <i>Fusarium solani</i>	<i>Dendrobium loddigesii</i> Rolfe	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Chen et al. 2010
<i>Epicoccum nigrum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Phoma sp.</i>	<i>Dendrobium devonianum</i>	Desconhecido	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Xing et al. 2011
Desconhecido	<i>Daphnopsis americana</i> (Mill) J.R.Johnst	Terpenóides	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Brady et al. 2000 Brady et al. 2001 Singh et al. 2000

\*Dos 49 fungos endofíticos, dois destacaram-se com maior atividade antimicrobiana.

#### 1.4. Bioprospeção de metabolitos bioativos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade advém das limitações dos antifúngicos e dos antibióticos disponíveis para o tratamento de infecções causadas por fungos e bactérias, respectivamente. O aumento do aparecimento de estirpes bacterianas multirresistentes a antibióticos, devido sobretudo ao seu uso irracional, é a principal causa da ineficácia destes agentes terapêuticos (ECDC, 2012). Atualmente, foram já isoladas bactérias resistentes a todos os antibióticos disponíveis, e o número de estirpes resistentes a antibióticos continua a aumentar atingindo já valores alarmantes (ECDC, 2012). Na União Europeia morrem cerca de 25000 pessoas por ano, com uma infecção resultante de

uma bactéria resistente aos antibióticos administrados (Carlet e Mainardi, 2012). O aumento de resistência aos antibióticos no espaço europeu é sobretudo observado ao nível das bactérias gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (ECDC, 2012). Portugal foi um dos países da União Europeia onde se observou um aumento do aparecimento de microrganismos multirresistentes com poucas opções de tratamento, sendo a bactéria *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) uma das mais persistentes (ECDC, 2012).

No que concerne aos antifúngicos, os maiores problemas da sua utilização no tratamento de infeções contra fungos filamentosos e leveduras, residem na sua baixa selectividade e elevada toxicidade, dadas as semelhanças entre as células fúngicas e as humanas (Gupte et al., 2002). Adicionalmente, o número de casos de infeções fúngicas humanas tem vindo a aumentar nos últimos anos, o que poderá estar relacionado com o aparecimento de resistências por parte das leveduras/fungos filamentosos aos antifúngicos comumente utilizados, entre outros fatores (Pfaller e Diekema, 2007). Como resposta, tem-se verificado a introdução de novos fármacos antifúngicos no mercado. Contudo, esta área encontra-se muito menos desenvolvida face à dos antibióticos antibacterianos. As micoses profundas mais relevantes na Europa são a aspergilose, produzida geralmente pelo *Aspergillus fumigatus* (e com menor frequência, por outras espécies de *Aspergillus spp.*), as candidíases sistémicas, provocadas na sua maioria por *Candida albicans* (ou por outras espécies de *Candida spp.*, como sejam *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*), e a criptococose induzida por *Cryptococcus neoformans* (Lass-Florl, 2009).

Face ao exposto, a Organização Mundial da Saúde considera que num futuro próximo poderemos ter um quadro extremamente complicado de infeções por microrganismos patogénicos se não forem tomadas algumas medidas. Uma dessas medidas inclui a descoberta de novos antibióticos e antifúngicos com mecanismos de acção distintos dos disponíveis no mercado. A implementação desta medida foi reforçada pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas ao solicitar a descoberta de 10 novas classes de antibióticos até 2020 (Wright, 2012). O mesmo autor considera que a bioprospeção de metabolitos bioativos de origem natural (microrganismos, plantas e animais) apresenta um enorme potencial para a obtenção de novos antibióticos e antifúngicos. A descoberta de novos metabolitos produzidos por fungos endofíticos poderá assim constituir uma importante medida a implementar neste âmbito.

A bioprospeção de metabolitos fúngicos envolve, geralmente, quatro etapas: isolamento e identificação do fungo endofítico, cultura do fungo e otimização da produção de metabolitos, elucidação da natureza química do metabolito e avaliação das suas propriedades biológicas. Cada uma destas etapas é em seguida discriminada.

## **1.5. Isolamento e identificação do fungo**

Os fungos endofíticos são normalmente isolados a partir de pequenos fragmentos de material vegetal de diferentes órgãos da planta (folha, caule, raiz, etc.) previamente esterilizados (Hallmann et al., 2006). Neste processo de esterilização é utilizado geralmente etanol a 70% e hipoclorito de sódio (1 a 3% cloro ativo) (Qadri et al., 2013) ou cloreto de mercúrio (0,1%) (Ding et al., 2013), cujas concentrações e tempo de exposição são variáveis de acordo com o material vegetal, seguida de lavagem em água destilada estéril. Os fragmentos de tecido vegetal superficialmente esterilizados são depositados em caixas de Petri, contendo meio selectivo para o isolamento de fungos (habitualmente Batata Dextrose Agar – BDA, entre outros) e suplementado com um antibiótico (Hallmann et al., 2006). Por vezes, é adicionado ao meio de cultura, tecidos ou extractos vegetais da planta hospedeira de forma a promover o crescimento de espécies fúngicas específicas desta planta (Arnold et al., 2003). A eficácia do processo de esterilização terá de ser sempre confirmada. Para tal poder-se-á, por exemplo, inocular caixas de Petri, contendo BDA com um volume apropriado de água destilada utilizada na última lavagem. As caixas de Petri são postas a incubar no escuro numa estufa a 25°C e diariamente são inspeccionadas para avaliação de crescimento fúngico. Quando as colónias se desenvolvem estas são repicadas para meio BDA até obtenção de culturas puras (Hallmann et al., 2006).

A identificação de fungos endofíticos é realizada através da avaliação das características morfológicas das colónias fúngicas, micélio e estruturas reprodutivas (Devi e Prabakaran, 2014). Este processo é quase sempre complementado com a identificação molecular (Huang et al., 2009; Lu et al., 2012). O método molecular mais utilizado baseia-se na amplificação da região ITS (*Internal transcribed spacer*) do DNA que contém o conjunto de genes que codificam o RNA ribossómico (rRNA), seguida da sua sequenciação (Huang et al., 2009; Lu et al., 2012). A região ITS amplificada, recorrendo à reacção da polimerase em cadeia (PCR), corresponde a um fragmento do

rDNA que inclui o gene 5,8S e as regiões ITS1 e ITS2 (Huang et al., 2009; Lu et al., 2012). Esta região, por permitir uma maior variabilidade entre espécies, foi recentemente aceite como a região “barcoding” (código de barras do DNA) de fungos (Schoch et al., 2012).

## **1.6. Cultura do fungo e otimização da produção de metabolitos**

A cultura de fungos endofíticos tem como principal objetivo aumentar a biomassa dos isolados obtidos, de forma a conseguir um maior rendimento de extractos fúngicos. Geralmente, a cultura é feita em meio líquido (Extrato de Malte, Czapek, Sabouraud's, Batata-dextrose, Wickerham, entre outros) previamente inoculado com discos de micélio fúngico crescido em agar (Lu et al., 2012; Qadri et al., 2013; Devi e Prabakaran, 2014). Em geral, os metabolitos bioativos encontram-se em baixíssimas concentrações nos fungos endofíticos sendo, por conseguinte, necessário otimizar o processo fermentativo de forma a incrementar a sua produção. Para tal, fazem-se normalmente pequenas alterações na composição química e valor de pH do meio de cultura, temperatura, agitação, tempo de incubação, entre outros (Scherlach e Hertweck, 2009; Tayung et al., 2011; VanderMolen et al., 2013). Por vezes é ainda acrescentado ao meio de cultura extratos da planta hospedeira com o intuito de incrementar a produção de metabolitos bioativos pelo fungo endofítico (Yenn et al., 2012).

## **1.7. Elucidação da natureza química do metabolito**

A elucidação da natureza química dos metabolitos produzidos pelo fungo endofítico é avaliada ao fim de um determinado tempo de incubação em meio de cultura líquido, e envolve a extração, separação e a identificação dos metabolitos. Devido ao desconhecimento da natureza química dos metabolitos bioativos produzidos pelo fungo endofítico, não é possível estabelecer-se uma técnica específica que garanta a extração de todos os constituintes da mistura. Desta forma, a melhor abordagem consiste na extração destes compostos do meio de cultura líquido (metabolitos extracelulares) e/ou do micélio fúngico (metabolitos intracelulares) através do uso de água e solventes orgânicos com diferentes polaridades, como por exemplo o acetato de etilo (Tayung et al., 2011), metanol (V. Rukachaisirkul et al., 2008), o n-hexano (Gao et al 2010), entre

outros. Os metabolitos contidos no extrato obtido são posteriormente separados por técnicas cromatográficas convencionais (e.g. Sephadex, gel de sílica) (Y.Jiao et al., 2013) ou mais frequentemente por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Sileshig et al.,2013) ou mesmo cromatografia gasosa (GC) (Tayung et al., 2011). Após separação, os metabolitos são identificados, recorrendo para tal a diversas técnicas, sendo as mais comuns a espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear (Y.Wang et al., 2012) e espectrometria de massa (MS) (Tayung et al., 2011).

## **1.8. Avaliação das propriedades biológicas dos metabolitos fúngicos**

Os extratos fúngicos obtidos são submetidos a diferentes testes biológicos *in vitro* ou *in vivo*, dependendo da fase da pesquisa, para avaliação das propriedades biológicas dos metabolitos fúngicos. Dada a grande diversidade das propriedades biológicas que podem ser avaliadas, dar-se-á especial relevância às propriedades antimicrobianas. Os métodos mais utilizados na avaliação da actividade antimicrobiana de fungos endofíticos incluem o método de difusão em agar e o método da microdiluição.

No primeiro método, o microrganismo é posto a crescer na presença de extractos do fungo endofítico, preparado a partir do meio de cultura ou do micélio, em meio de cultura sólido. A aplicação do extracto pode ser feita pela impregnação de discos (Lu et al., 2000; Hoffman et al., 2008) ou em poços efectuados no meio de cultura sólido (Krohn et al., 2009), realizados com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro. A colocação dos discos impregnados ou a perfuração dos poços nos quais são aplicados os extractos a analisar, é efectuada em placas de Petri previamente inoculadas com microrganismos, normalmente à concentração de  $10^8$  UFC (Unidade Formadora de colónia)/mL para bactérias ou  $10^6$  UFC/mL para leveduras. A actividade antimicrobiana dos extractos é estimada pelo tamanho do halo de inibição que se forma desde a margem do disco ou poço até a margem onde há crescimento microbiano. O valor de halo estimado é sempre comparado com um controlo positivo, onde se utiliza antibióticos ou antifúngicos, de acordo com o microrganismo testado (bactéria ou fungo/levedura, respectivamente). Como controle negativo utiliza-se o solvente utilizado para a dissolução dos extratos, normalmente dimetilsulfóxido (DMSO).

Na microdiluição utilizam-se microplacas com 96 poços, com o fundo em formato de “U”. Em cada poço é colocado um volume de meio de cultura (entre 0,1 e 0,2 mL), e um volume do extrato a analisar de forma a obter um gradiente crescente de concentrações de extrato (Hu et al., 2010; Qadri et al., 2013). De seguida, cada poço é inoculado com o microrganismo (normalmente à concentração de  $10^4$  UFC/poço). São ainda reservados alguns poços da placa para efectuar o controlo positivo e negativo. As placas são postas a incubar a uma temperatura controlada, normalmente a 37°C para bactérias e 27°C para leveduras/fungos, durante 24 a 48h. Findo este tempo procede-se à avaliação do crescimento microbiano num leitor de microplacas a um determinado comprimento de onda ou pela adição de resazurina.

De acordo com os resultados do crescimento microbiano obtido nos dois métodos (método de difusão em agar e o método da microdiluição) procede-se ao cálculo da concentração mínima inibitória (MIC).

## **1.9. Importância do estudo dos fungos endofíticos da oliveira**

Com base nestes resultados, os autores sugerem que a planta hospedeira, e conseqüentemente o seu metabolismo, poderá ter uma grande influência na capacidade sintetizadora do fungo endofítico. Desta forma é aconselhável que a bioprospeção de compostos bioativos naturais em fungos endofíticos deva ser baseada na seleção da espécie de planta hospedeira em detrimento da espécie fúngica (Suryanarayanan et al., 2009).

Desde sempre, que a oliveira tem estado associada a usos medicinais e gastronómicos. No que concerne à sua importância medicinal, destacam-se as propriedades farmacológicas das folhas, descritas como anti-arrítmicas, espasmolíticas, imuno-estimulantes, cardioprotetor, hipotensor, antihiperlipidémico, antimicrobiano e anti-inflamatório (Mahjoub et al., 2011). O seu óleo essencial é usado no combate de inúmeras doenças. Tanto quanto é do nosso conhecimento, a diversidade de fungos endofíticos associados à oliveira bem como as suas propriedades bioativas nunca foram estudadas. Este aspecto é extremamente importante na área farmacêutica uma vez que acredita-se que algumas propriedades terapêuticas atribuídas às plantas também possam

estar relacionadas com a produção de metabolitos secundários pelos fungos endofíticos colonizadores dos tecidos vegetais. Desta forma, o estudo de propriedades bioativas de fungos endofíticos associados às folhas da oliveira poderá contribuir para o conhecimento do seu potencial farmacêutico e para a descoberta de novos metabolitos com interesse biotecnológico/farmacêutico.

## **1.10. Objetivos**

Os fungos endofíticos têm mostrado um grande potencial na produção de metabolitos bioativos. Nos últimos 2 anos, mais de 250 novos metabolitos produzidos por fungos endofíticos foram identificados. A presente proposta de trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos isolados de folhas de oliveira, bem como identificar o efeito da planta hospedeira nesta propriedade. O perfil volátil das espécies fúngicas será ainda avaliado com o intuito de correlacionar os compostos identificados com atividade antimicrobiana exibida pelos endófitos. As espécies fúngicas a estudar serão: *Penicillium commune*, *Penicillium canescens*, *Alternaria alternata*.

### **Objetivos específicos:**

- 1- Avaliar a atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos com crescimento em meio de cultura com e sem extratos aquoso de folhas de oliveira.
- 2- Avaliar, nas espécies fúngicas que mostraram maior atividade antimicrobiana, a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de extratos fúngicos e de meio de cultura obtidos a partir de solventes orgânicos com diferentes polaridades. Nesta análise pretende-se avaliar se a produção dos compostos antimicrobianos, se encontram intercelularmente no micélio ou se são excretados para o meio de cultura.
- 3- Identificar, nas espécies fúngicas com menor CMI, os compostos volatéis potencialmente responsáveis pela atividade antimicrobiana, recorrendo a análise GC/MS.



## Bibliografía

- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E., Kozytska, S., Hentschel, U., Ebel, R. (2008). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*, 69(8), 1716-1725.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649-15654.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21(2), 51-66.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Carlet, J., Mainardi, J. L. (2012). Antibacterial agents: back to the future? Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomicin?. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(1), 1-3.
- Carter, G. T. (2011). Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Natural product reports*, 28(11), 1783-1789.
- Chebbi Mahjoub, R., Khemiss, M., Dhidah, M., Dellaï, A., Bouraoui, A., & Khemiss, F. (2011). Chloroformic and methanolic extracts of *Olea europaea* L. leaves present anti-inflammatory and analgesic activities. *ISRN pharmacology*, 2011.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and applied chemistry*, 77(1), 7-24.
- Devi, N. N., & Prabakaran, J. J. (2014). Bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Centella asiatica*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(1), 34-43.
- Ding, X., Liu, K., Deng, B., Chen, W., Li, W., Liu, F. (2013). Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1831-1838.

- Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M., Jabes, D. (2010). Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 423-430.
- ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), Stockholm: ECDC.2012.
- Finlay, R.D. (2007). Fungal endophytes in forest, woody, plants and grass land ecosystems: diversity, functional ecology, evolution. *Fungal Biology Reviews*, (21):49-50.
- Gamboa, M. A., Laureano, S., Bayman, P. (2003). Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter?. *Mycopathologia*, 156(1), 41-45.
- Gao, S. S., Li, X. M., Du, F. Y., Li, C. S., Proksch, P., & Wang, B. G. (2010). Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Marine drugs*, 9(1), 59-70.
- Giauque, H., & Hawkes, C. V. (2013). Climate affects symbiotic fungal endophyte diversity and performance. *American journal of botany*, 100(7), 1435-1444.
- Greve, H., Mohamed, I. E., Pontius, A., Kehraus, S., Gross, H., König, G. M. (2010). Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*, 9(4), 537-545.
- Guo, B., Dai, J. R., Ng, S., Huang, Y., Leong, C., Ong, W., Carté, B. K. (2000). Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *Journal of natural products*, 63(5), 602-604.
- Gupte, M., Kulkarni, P., Ganguli, B. (2002). Antifungal antibiotics. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(1), 46-57.
- Hallmann, J., Berg, G., & Schulz, B. (2006). Isolation procedures for endophytic microorganisms. In *Microbial root endophytes* (pp. 299-319). Springer Berlin Heidelberg.
- H.B. Cui, W.L. Mei, C.D. Miao, H.P. Lin, K. Hong, H.F. Dai. (2008). Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp.0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureum*. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 33, 407-410.
- Higginbotham, S. J., Arnold, A. E., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P. D., Kursar, T. A. (2013). Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte

- taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. *PloS one*, 8(9), e73192.
- Higgins, K. L., Arnold, A. E., Coley, P. D., Kursar, T. A. (2014). Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host-and habitat generalists characterized by strong spatial structure. *Fungal Ecology*, 8, 1-11.
- Hoffman, M. T., & Arnold, A. E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological research*, 112(3), 331-344.
- Hussain, H., Krohn, K., Draeger, S., Meier, K., Schulz, B. (2009). Bioactive chemical constituents of a sterile endophytic fungus from *Melilotus dentatus*. *Records of Natural Products*, 3(2), 114-117.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Surveswaran, S., Hyde, K. D., Corke, H., & Sun, M. (2009). Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, 36, 69.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*, 33, 163-173.
- Jalgaonwala, R. E., Mohite, B. V., Mahajan, R. T. (2011). A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *J Microbiol Biotechnol Res*, 1(2), 21-32.
- Jiao, Y., Zhang, X., Wang, L., Li, G., Zhou, J. C., Lou, H. X. (2013). Metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus from the liverwort *Riccardia multifida* (L.) S. Gray. *Phytochemistry Letters*, 6(1), 14-17.
- Kirk P, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th edn CAB International, Wallingford, UK.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hückelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 358-363.
- Kumar, D. S. S., Hyde, K. D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Divers*, 17, 69-90.
- Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52(3), 197-205.
- Li, J. Y., Strobel, G., Sidhu, R., Hess, W. M., Ford, E. J. (1996). Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*, 142(8), 2223-2226.

- Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S., Wang, C. (2012). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 238.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., Tan, R. X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 151(1), 67-73.
- Lu, Y., Chen, C., Chen, H., Zhang, J., Chen, W. (2011). Isolation and Identification of endophytic fungi from *Actinidia macrosperma* and investigation of their bioactivities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Moricca, S., Ginetti, B., & Ragazzi, A. (2012). Species-and organ-specificity in endophytes colonizing healthy and declining Mediterranean oaks. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(3), 587-598.
- Ondeyka, J.G., Helms, G.L, Hensens, O.D., Goetz, M.A., Zink, D.L., Tsiouras, A. (1997). Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulosporium* sp. Isolation, structure determination, and chemical transformation. *Journal of the American Chemical Society*, 119: 8809-8816.
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. In *The Ecology of Fungal Entomopathogens* (pp. 113-128). Springer Netherlands.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133-163.
- Porrás-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Phytopathology*, 49(1), 291.
- Qadri, M., Johri, S., Shah, B. A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S. K., Riyaz-Ul-Hassan, S. (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*, 2(1), 8.
- Qin, J. C., Zhang, Y. M., Gao, J. M., Bai, M. S., Yang, S. X., Laatsch, H., & Zhang, A. L. (2009). Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), 1572-1574.
- Radić, N., & Štrukelj, B. (2012). Endophytic fungi—The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 19(14), 1270-1284.

- Robl, D., da Delabona, P., Mergel, C. M., Rojas, J. D., dos Costa, P., Pimentel, I. C., & Padilla, G. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC biotechnology*, 13(1), 94.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330.
- Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J., & Kirtikara, K. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*, 69(3), 783-787.
- Saikkonen, K., Ion, D., & Gyllenberg, M. (2002). The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1498), 1397-1403.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., & Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in plant science*, 9(6), 275-280.
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.*, 7(9), 1753-1760.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Griffith, G. W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.
- Shweta, S., Zuehlke, S., Ramesha, B. T., Priti, V., Mohana Kumar, P., Ravikanth, G., & Uma Shaanker, R. (2010). Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaeae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, 71(1), 117-122.
- Silva, G. H., Teles, H. L., Zanardi, L. M., Marx Young, M. C., Eberlin, M. N., Hadad, R., & Araújo, Â. R. (2006). Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, 67(17), 1964-1969.
- Sileshi G. Wubsheta, Nils T. Nyberga, Mysore V. Tejesvib, Anna Maria Pirttiläb, Marena Kajulac, Sampo Mattilac, Dan Staerka,. (2013). Targeting high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry solid-phase extraction nuclear magnetic resonance analysis with high-resolution

- radical scavenging profiles. Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium namyslowskii*-journal of Chromatography A, (1302), 34-39.
- Smith, S. A., Tank, D. C., Boulanger, L. A., Bascom-Slack, C. A., Eisenman, K., Kingery, D., & Strobel, S. A. (2008). Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS One*, 3(8), e3052.
- Soliman, S. S., Trobacher, C. P., Tsao, R., Greenwood, J. S., & Raizada, M. N. (2013). A fungal endophyte induces transcription of genes encoding a redundant fungicide pathway in its host plant. *BMC plant biology*, 13(1), 93.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502.
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R., & Murali, T. S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, 23(1), 9-19.
- Tayung, K., Barik, B. P., Jha, D. K., & Deka, D. C. (2011). Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere*, 2(3), 203-213.
- Torres, M. S., White Jr, J. F., Zhang, X., Hinton, D. M., & Bacon, C. W. (2012). Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. *Fungal Ecology*, 5(3), 322-330.
- VanderMolen, K. M., Raja, H. A., El-Elimat, T., & Oberlies, N. H. (2013). Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*, 3(1), 71.
- Wang, Y., Xu, L., Ren, W., Zhao, D., Zhu, Y., & Wu, X. (2012). Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*, 19(3), 364-368.
- 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. *Molecules*, 17(9), 10754-10773.
- Wicklów, D. T., Roth, S., Deyrup, S. T., & Gloer, J. B. (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109(05), 610-618.
- Wright, G. D. (2012). Antibiotics: a new hope. *Chemistry & biology*, 19(1), 3-10.

- Yenn, T. W., Lee, C. C., Ibrahim, D., Zakaria, L. (2012). Enhancement of anti-candidal activity of endophytic fungus *Phomopsis* sp. ED2, isolated from *Orthosiphon stamineus* Benth, by incorporation of host plant extract in culture medium. *Journal of Microbiology*, 50(4), 581-585.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., .& Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological research*, 165(6), 437-449.
- Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y., Royo, I., & Moller, D. E. (1999). Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, 284(5416), 974-977.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*, 23(5), 753-771.





## **Capítulo 2**

**Volatile composition and antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree**



Cynthia Malhadas<sup>1</sup>, Ricardo Malheiro<sup>1</sup>, José Alberto Pereira<sup>1</sup>, Paula Guedes de Pinho<sup>2</sup>,  
Paula Baptista<sup>1\*</sup>

Manuscript in preparation

<sup>1</sup>CIMO/School of Agriculture, Polytechnic Institute of Bragança, *Campus* de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal.

<sup>2</sup>REQUIMTE/Laboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Porto University, Rua Jorge Viterbo Ferreira 228, 4050-313 Porto, Portugal.



## **Volatile composition and antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree: effect of host plant**

### **Abstract**

In recent years, fungal endophytes from diverse host plant species have been examined as potential producers of novel antimicrobials to overcome the growing problems of drug resistance in microorganisms. However no studies on fungal endophytes from *Olea europaea* L. have been found in literature. In this study, the antimicrobial potential of three fungal endophytes from *O. europaea* was studied and the host plant effect in the antimicrobial activity was examined. The volatile compounds produced by endophytes were identified by gas chromatography/mass spectrometry and further correlated with the antimicrobial activity. *Penicillium commune* and *Penicillium canescens* were the most effective inhibiting bacteria [in average up to 2.7-fold compared to chloramphenicol (30 µg/mL)] whereas *Alternaria alternata* was most effective inhibiting yeasts [in average up to 8.0-fold compared to fluconazole (25 µg/mL)]. This last species also displayed the widest spectrum of anti-microorganisms at MIC ≤ 0.095 mg/mL. Host plant showed to play an important role in the antimicrobial activity of the endophytes, depending on the species. From the volatile composition of *A. alternata* and *P. canescens*, six volatiles were identified, being 3-methyl-1-butanol and phenylethyl alcohols the most abundant. Others volatiles like 3-methyl-1-butanol acetate, 1-octen-3-ol, β-cedrene and thujopsene were tentatively identified. By a principal component analysis it was possible to verify that the antimicrobial activity displayed by *A. alternata* may be related to its volatile composition, mainly due to the high content in the antimicrobial volatiles 3-methyl-1-butanol and phenylethyl alcohol. Overall the obtained results highlighted the antimicrobial potential of endophytic fungi from *O. europaea* and their possibility to be exploited for their antimicrobial agents.

**Keywords:** *Olea europaea*; *Alternaria alternata*; minimum inhibitory concentration; HS-SPME/GC/MS



## Introduction

The search for natural bioactive compounds with application in the treatment and/or prevention of human diseases (Donaldo et al., 2010) as well as in the design of nutraceuticals and functional food products (Gil-Chávez et al., 2013) has increased markedly over the last few years. Endophytic fungi are one of the most prominent producers of novel natural products (Selim et al., 2012). These fungi are characterized to colonize the living internal tissues of all higher plants without causing any damage to the host (Soytong and Hyde, 2008). In this relationship endophytes produce a broad variety of bioactive secondary metabolites that can affect host plant physiology, defence and tolerance against biotic and abiotic stresses (Carter, 2011; Rodriguez et al., 2012). Some of these secondary endophytic metabolites with antimicrobial, antiparasitic, cytotoxic, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant, and neuroprotective activities are compounds possessing unique chemical structures and they have been studied for novel drug discovery (Selim et al., 2012; Gutierrez et al. 2012) .

The resistance of bacteria to antibiotics has become a global concern and the search for new antibacterial agents is urgent and ongoing. The *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) launched an initiative that supports the development of 10 new classes of antibiotics by the year 2020 (Wright, 2012). Endophytic fungi are one of the potential sources of novel antimicrobial compounds, due to chemical diversity of their secondary metabolites (Yu et al., 2010). So far, studies reported a wide range of novel antimicrobial compounds produce by endophytic fungi belonging to diverse structural classes, including alkaloids, peptides, steroids, terpenoids, phenols, phenylpropanoids, aliphatic compounds, polyketides, quinones and flavonoids (Yu et al., 2010; Mousa and Raizada, 2013), as well as volatile organic compounds (VOCs) such as esters, lipids, alcohols, acids, ketones, among others (Banerjee et al., 2010; Kudalkar et al., 2012). However, several studies have shown that the plant host, and ultimately its metabolism, influences the synthetic ability of endophytes (Strobel 2006; Li et al., 2009; Riyaz-Ul-Hassan et al., 2012), which could prevent these microorganisms from being used in a commercial production of antimicrobial compounds (Kusari et al., 2014). Nevertheless, there still remain substantial questions about this issue. For instances, the genome sequencing and analysis of one paclitaxel-

producing endophyte fungus revealed its ability to synthesize paclitaxel (Taxol™), an important anticancer drug, independently of the plant host (Yang et al., 2014). Similarly, several studies have shown that fungal Taxol is produced independently of the plant following several rounds of *in vitro* culturing (Guo et al., 2006; Soliman et al., 2011). The extent to which fungal endophytes produce natural products independently of their host plant is not precisely known; and their elucidation is one of the key challenges to achieve the industrial production of desired bioactive metabolites from endophytes (Kusari et al., 2014).

Although a considerable body of research has investigated the antimicrobial metabolites synthesized by fungal endophytic isolated from various plants (Yu et al., 2010), screening of endophytic fungi from olive tree (*Olea europaea* L.) for antimicrobial activities has never been made. It has been estimated that only 5% of the world's fungi have so far been described (Hawksworth, 2004), which suggested that a large number of new bioactive natural products from endophytic fungi still remains to discover, in especially VOCs (Morath et al., 2012). Therefore, the current study was undertaken to screen the antimicrobial activity of three fungal endophytes isolated from olive tree leaves and evaluate the effect of host plant on such activity. Also, the VOCs produced by the tested fungi were identified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and further correlated with the antimicrobial activity with an attempted to identify potential components responsible for the obtained antimicrobial activity. It is expected that the results obtained may contribute to the knowledge of new antimicrobial compounds produced by endophytic fungi and to the effect of host plant on its production.

## **Materials and Methods**

### ***Microorganisms and culture conditions***

The endophytic fungi tested, *Penicillium commune* Thom (PAL321FA), *Penicillium canescens* Sopp (CA221FA) and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (SE251FA), were obtained from the fungal culture collection of the School of Agriculture, Polytechnic Institute of Bragança, Portugal. These isolates were originally obtained from leaves of *Olea europaea* cv. Cobrançosa collected in the Trás-os-Montes

region (northeast of Portugal) and were identified molecularly by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (rDNA). Spores of these strains were stored in an aqueous glycerol solution (30%, v/v) at -80 °C. The fungal inoculum used in the assays was prepared from these frozen stocks by transferring spores onto Potato Dextrose Agar (PDA) media. The fungus was grown in the dark at 25±1°C, for three to eight days, and conidia produced were used for the subsequent studies.

The antimicrobial activities of endophytes were evaluated against three gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* 48886 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538), two gram-negative bacteria (*Escherichia coli* CECT 423 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) and three yeasts (*Candida albicans* IGC 3436T, *Candida glabrata* IGC 2418T and *Candida parapsilosis* 28B). All the microorganisms were obtained from the Biology Department - University of Minho (Braga, Portugal). Yeast strains were maintained at 4 °C in YEPDA medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) agar], and sub-cultured periodically. Growth was promoted aerobically at 28 °C. Bacterial stocks cultures were maintained at 4 °C on LB agar [tryptone 1% (w/v), yeast extract 0.5% (w/v), NaCl 1% (w/v) and agar 2% (w/v)], being sub-cultured periodically at 37 °C.

### ***Screening of fungal endophytes for antimicrobial activity***

The screening of fungal endophytes for antimicrobial activity was performed in two steps. In the first step, endophytic fungi were screened for their antimicrobial activity on PDA medium with or without aqueous extract of olive tree leaves, to evaluate the effect of host plant. In this primary screen was used the bioassay method developed by Pereira et al. (2013). This method has the advantage of being less time consuming and allows the direct detection of antimicrobial activity of growing fungi against single cell microorganisms without the prior isolation of the active substance(s) (Pereira et al., 2013). Also, this method allows to study the dynamics of antimicrobial compounds production by filamentous fungi. In the second step, was calculated the minimum inhibitory concentration (MIC) of the most active species found in the first screen. This secondary screen was done by the micro-dilution method (Rios et al., 1988) with several solvents extracts of the cultured broth and mycelium of the fungus, to determine if the

antimicrobial compound were in the liquid culture secreted from the mycelium or inside the mycelium.

#### *Bioassay method*

The antimicrobial activity assay was performed in Petri dishes (9 cm diameter) containing PDA medium prepared with distilled water or prepared with aqueous extract of host plant leaves (2%, w/v). The plant extract was prepared with fresh leaves collected from healthy olive tree cv. Cobrançosa, located in Mirandela (northeast of Portugal). The collected leaves were transported to the laboratory in an icebox, and immediately upon arrival, they were rinsed in distilled water, ground to a fine powder in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The plant extract was prepared by stirring 2 g of fresh ground leaves in 100 mL distilled, at 150 rpm and  $25^{\circ}\text{C}$ , for 30 min. After filtration through a Whatman filter paper No.4, the plant extract was used to prepare PDA medium.

Both culture media (PDA with and without host plant extract) were inoculated by transferring 10  $\mu\text{L}$  of a spore suspension ( $1 \times 10^6$  spore/mL) of each *P. canescens*, *P. commune* and *A. alternata* fungus to the centre of a Petri dish (9 cm diameter). Spore suspensions were obtained by flooding fungal cultures growing on PDA medium with 2 mL of sterile aqueous solution of 0.02% (v/v) Tween 80. The spore concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  spore/mL with a Neübauer haemocytometer, under light microscope (Leica, CTR 5000). After incubation at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , in the dark, for 3 (*P. commune*), 6 (*A. alternata*) and 8 days (*P. canescens*), the inoculated plates were overlaid with the sensitive indicator strain. To prepare the sensitive microbial suspension, yeast and bacteria biomass were scraped from a 24 h YPDA or LB culture plate, respectively, and suspended in 1 mL of NaCl 0.85% (w/v). Suspensions of the microorganisms were prepared and mixed with melted-agar 0.8% (w/v) in order to obtain  $10^6$  CFU (colony forming units)/mL. A volume of 5 mL of the mixture was then seeded as a lawn onto the surface of the plates previously inoculated with endophytic fungi. The plates were incubated at  $25^{\circ}\text{C}/48$  h and  $32^{\circ}\text{C}/24$  h for yeasts and bacteria, respectively. Standard discs of chloramphenicol (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and fluconazole (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were obtained from Oxoid Ltd. and served as positive controls for antibacterial and antifungal activity, respectively. Antimicrobial activity was observed when the fungal inoculum was surrounded by a clear zone of growth inhibition and evaluated by determining both the

diameter of the fungal colony and the diameter of the inhibition halo. Values were used to calculate the areas occupied by the fungus and by the inhibition halo formed by its antimicrobial activity, which were further subtracted to obtain the inhibition halo area. Data are presented as the mean of 3 independent experiments, with 3 replicas each. The corresponding standard error values are displayed.

#### *Micro-dilution method*

MIC determination was only assayed with the endophytic fungus specie that showed the highest antimicrobial activity, especially towards yeasts, in the first screen (i.e. *A. alternata*, please see results and discussion section). This strain was cultured in potato dextrose broth (PDB) liquid medium, and MIC values were determined for ethyl acetate, methanol and methanol:water (1:1, v/v) extracts of both mycelium and cultured broth. PDB medium was also included in this study as negative control. Submerged cultures were grown in twelve 250 mL Erlenmeyer flasks with 150 mL of PDB each, at 25 °C for 10 days, in the dark and without agitation. Several excised discs (5 mm diameter) of the fungus grown on PDA, for 6 days at 25 °C, were used as inoculum. After incubation, the culture broth and fungal biomass were separated by filtration through two layers of Miracloth (Calbiochem) and were further freeze-dried. The freeze-dried mycelium/culture broth (3 g) were extracted by stirring with 100 mL of each solvent [ethyl acetate, methanol and methanol:water (1:1, v/v)], at room temperature, at 150 rpm for 1 hour, and filtered through Whatman n° 4 paper. Extraction was additionally repeated two times, and the filtrates obtained for each solvent were combined. The solvent was removed by evaporation under vacuum on reduced pressure at 40–45 °C using a rotary evaporator. After evaporation, the remaining water was removed by lyophilisation. The extracts obtained were weighed and dissolved in 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations ranging from 25 to 350 mg/mL, depending on the extraction yield, and further used to determine MIC values.

MIC values of the several extracts were determined by a broth micro-dilution assay in PDB medium at 25 °C, conducted in a sterile, 96-wells, U-shaped, microtiter plate. A two-fold dilution of the extract was prepared with sterile medium and 100 µL of the extract was dispensed into each well on the microtiter plate. The range of extract concentration used to determine MIC values are indicated in Table S1 (Supporting

information). Each well was further inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of yeast or bacteria inoculum at  $10^7$  CFU/mL, for a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . Chloramphenicol (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and fluconazole (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were used as positive controls for antibacterial and antifungal activity, respectively; and a control with 10% (v/v) DMSO and yeast/bacteria inoculum was also included. All experiments were performed in triplicate and repeated twice. After a 24 h of incubation at 25  $^{\circ}\text{C}$ , 10  $\mu\text{L}$  of 0.15 mg/mL resazurin (Sigma) dissolved in sterile distilled water was added to each well as a growth indicator. After a second incubation of 2 h at 25  $^{\circ}\text{C}$ , wells were assessed visually for color change. The microtiter wells with a color change from purple to pink or colorless are indicative of positive bacterial/yeast growth while wells remaining purple represent no microbial growth. The MIC was recorded as the lowest concentration of extract that inhibited the growth of bacteria/yeast. The results were expressed in milligrams per milliliter and presented as the mean of three independent experiments.

### ***Analysis of volatile compounds***

Secondary metabolites present in the volatile fraction of the endophytic fungus specie that showed the highest antimicrobial activity in the first screen (i.e. *A. alternata*, please see results and discussion section) were studied, as an attempt to identify compounds responsible for such activity. This study was performed in the fungus growing in PDA medium (*in vitro* assay), in order to get a more realistic picture of the microbial volatile organic compounds released from the endophyte. In this assay the fungus specie that showed the lowest antimicrobial activity was used, as negative control (i.e. *P. canescens*, please see results and discussion section) in the first screen. The comparison of the volatile profile of the two fungal species (*A. alternata* and *P. canescens*) will allow a more accurate identification of volatile antimicrobial compounds.

### ***In vitro fungal cultures***

The fungi were grown in 50 mL flasks (Duran Gaines Synth, Bioblock), containing 10 mL of PDA medium, sealed with a polypropylene cap with PTFE/silicon septum (Duran) (Fig. S1, Supporting information). The inoculation of culture medium

was done by transferring 10  $\mu\text{L}$  of a spore suspension ( $1 \times 10^6$  spore/mL) of each *P. canescens* and *A. alternata* fungus. Four replicates per fungal species were performed; and flasks containing exclusively PDA medium were also included as control. The cultures were incubated at 25 °C in the dark, for 6 (*A. alternata*) and 8 days (*P. canescens*), and further used to analyse the volatile compounds.

#### *Extraction of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction*

The extraction of volatile compounds from *in vitro* cultures of *P. canescens* and *A. alternata* was performed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), according with a previously describe method (with some adaptations). The volatile compounds were extracted from the HS of the 50 mL vials containing the fungus in the medium with an SPME fiber coated with divinylbenzene/ carbonex/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{M}$ ) (Supelco, Bellefonte, USA).

The entire procedure was done in a horizontal position in a gas emission system (isolation) at 40 °C. The vials with the respective fungus were placed 10 minutes in an oven at 40 °C for an incisive release of the volatile compounds. After this period, the SPME fiber was exposed during 60 minutes for the compounds adsorption in the headspace. The fiber was collected and inserted into the injection port of the chromatography system.

The HS-SPME procedure was made in quadruplicate. The same procedure was performed with a control sample containing only PDA medium.

#### *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) analysis*

The retained compounds were eluted from the fiber by thermal adsorption for 1 minute. For cleaning and conditioning of further analyzes the fiber was maintained during 10 minutes at 220 °C in the injector port of the chromatography system. The volatile compounds detection and quantification were performed in a gas chromatographer Shimadzu GC-2010 Plus equipped with a mass spectrometer Shimadzu GC/MS-QP2010 SE detector. A TRB-5MS (30 m  $\times$  0.25mm  $\times$  0.25 $\mu\text{m}$ ) column (Teknokroma, Spain) was used. The injector was set at 220 °C and the manual injections were made in splitless mode. The mobile phase consisted in helium (Praxair,

Portugal) at a linear velocity of 30 cm/s and a total flow of 24.4 mL/min. The oven temperature was fixed at 40 °C during 1 minute and then raised 2 °C per minute to 220 °C, and held at this temperature during 30 minutes. The ionization source was maintained at 250 °C with an ionization energy of 70 eV, and with a ionization current of 0.1 kV. All mass spectra were acquired by electron ionization. The ionization was left off during the first 3 minutes. The MS spectra fragments were compared with those obtained from a database (NIST 11).

For quantification purposes, each sample was injected in quadruplicate, and the areas of the chromatographic peaks were determined integrating the re-constructed chromatogram from the full scan chromatogram using for each compound the ion base (m/z intensity 100%).

### ***Data analysis***

#### *Principal component analysis (PCA)*

Principal components analysis (PCA) was applied for reducing the number of variables regarding the volatile composition of *P. canescens* and *A. alternata* growing under *in vitro* as well as their antimicrobial activity (diameter of the inhibition halo) against several microorganisms (6 variables corresponding to volatile components, and 8 variables corresponding to inhibition halo values; with a total of 14 variables) to a smaller number of new derived variables (principal component or factors) that adequately summarize the original information, i.e., the *in vitro* volatile composition of both fungi in study and their capability to inhibit microbial growth. Moreover, it allowed recognizing patterns in the data by plotting them in a multidimensional space, using the new derived variables as dimensions (factor scores). PCA was performed by using SPSS software, version 21.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.).

#### *Other statistical analysis*

Significant differences among samples were estimated using one-way ANOVA with a Tukey post-hoc test at *p*-value <0.05. Analyses were conducted with SPSS software, version 21.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.).

## **Results and discussion**

Microbial natural products represent a huge and largely untapped resource of unique chemical structures. More than 23,000 natural bioactive secondary metabolites of microbial origin have been described in literature (Olano et al., 2008) and most of these compounds have been isolated from only very few groups of microorganisms. Among microorganisms, fungal endophytes represent a potential source of novel bioactive metabolites (Selim et al., 2012; Mousa and Raizada, 2013) for exploitation in several areas such as in the development of new classes of antibiotics. In fact, antibiotic resistance is well recognized as a major threat to human health, and the development of new antimicrobial agents is pointed out as one of the effective solutions to address this problem (Laxminarayan et al., 2013). However, the extent to which fungal endophytes produce natural products outside the host is not precisely known, which could jeopardize the industrial bioprocesses for commercial production of biopharmaceuticals using fungal endophytes (Kusari et al., 2014). The main objective of this study was to explore the antimicrobial potential of three fungal endophytes isolated from olive leaves and assess the effect of host plant on such potential. The composition of its volatile organic compounds (VOCs) is also presented aiming to relate with their antimicrobial activities. It is expected that the screening of endophytic fungi for antimicrobial activities will serve as a good basis for discovering new antibiotic agents.

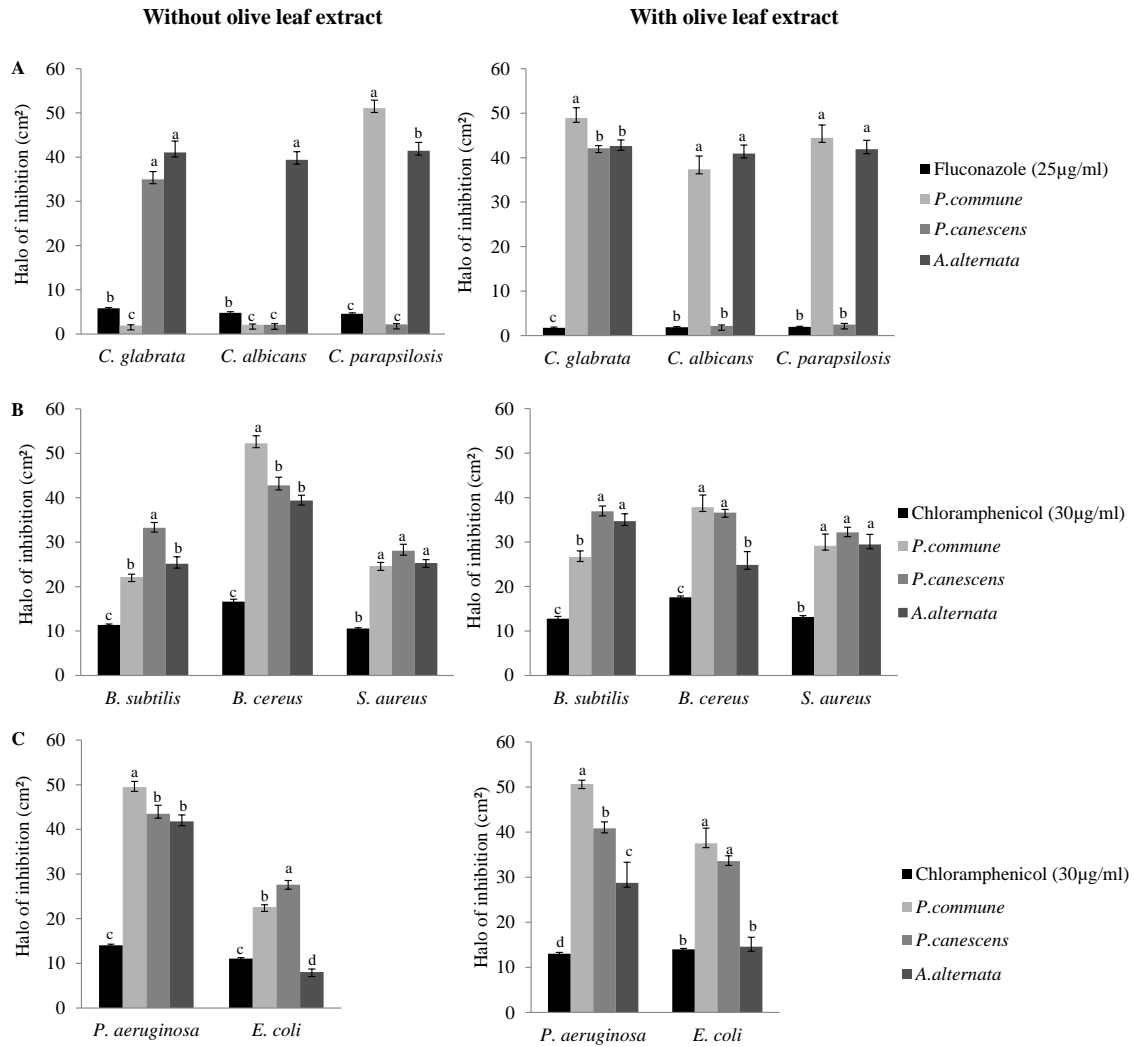
### **Antimicrobial activity of endophytes and effect of host plant extract**

Three fungal endophytes, *P. commune*, *A. alternata* and *P. canescens*, were initially screened for their inhibitory activity against gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts, by using the bioassay method developed by Pereira *et al.* (2013). The bioassay was performed in culture medium with and without aqueous olive leaf extract to assess the effect of host plant on the antimicrobial activity displayed by endophytes. In medium without olive leaf extract, all bacteria under analysis, with exception of *E. coli*, were significantly inhibited by the three endophytes when compared with the control (Fig. 1B and C). Both *P. commune* and *P. canescens* were

the most active against bacteria inhibiting up to 2.7-fold when compared to the control. It is well known the capacity of this genus to produce a vast array of bioactive secondary metabolites (Nicoletti et al., 2014), including antimicrobial compounds (Yu et al., 2010). However, to our knowledge, the antimicrobial potential of the endophytes *P. commune* (Moghaddam et al., 2013) and *P. canescens* (Nicoletti et al., 2007; Bertinetti et al., 2009) was only explored against phytopathogenic fungi. Studies focusing antimicrobial activity of *P. commune* against human pathogens are mainly performed with marine sediment-derived strains (Gao et al., 2011). Thus, the present study provides, for the first time, evidences of the antimicrobial potentialities of both endophytes *P. commune* and *P. canescens* against human pathogens. The first specie was the most effective in inhibiting *B. cereus*, *P. aeruginosa* and *C. parapsilosis* (up to 3.1-fold, 3.5-fold and 11.2-fold, respectively when compared to the control), whereas *P. canescens* was found to be the most efficient in inhibiting *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* (up to 2.5-fold, 2.7-fold and 2.9-fold, respectively when compared to the control). These results suggested their potential use in the treatment of infections caused by these microorganisms. This is of particular importance for *E. coli* and *P. aeruginosa*, due to increased levels of resistance of these bacteria to multiple classes of antibiotics. In fact, the multidrug resistance is an acute problem and treatment options are particularly limited (Hogberg et al., 2010).

Although *A. alternata* inhibited significantly the bacteria to grow (*B. cereus* up to 2.4-fold, *B. subtilis* up to 2.2-fold, *S. aureus* up to 2.4-fold and *P. aeruginosa* up to 3.0-fold, when compared to chloramphenicol), it showed higher activity against yeasts (Fig. 1A). When compared with the control fluconazole, *A. alternata* reduced significantly the growth of *C. albicans* (up to 8.2-fold), *C. glabrata* (up to 7.1-fold) and *C. parapsilosis* (up to 9.0-fold). The endophyte *A. alternata* also displayed the widest spectrum of anti-microorganisms (inhibited significantly 7 microorganisms among the 8 analyzed) and was the only one out of three endophytes with capacity to inhibit significantly *C. albicans* more than the control. Extracts of *A. alternata* inhabiting coffee plants (Reis et al., 2009), silver trumpet tree (Sadananda et al., 2011) and sweet wormwood (Qadri et al., 2013) have been previously found to displayed antimicrobial activity against an array of bacteria and yeasts, including *C. albicans* (Qadri et al., 2013). Some antimicrobial compounds isolated from *Alternaria* sp. extracts, such as altenusin, have showed to exhibit antimicrobial activity against several multidrug-

resistant bacterial and fungal strains (Kjer et al., 2009). Similarly, altersetin isolated from the culture broth of *Alternaria* sp. have showed potent activity against gram-positive bacteria (Hellwig et al., 2002).



**Figure 1** - Antimicrobial activity (halo of inhibition, in area) against yeasts (A), gram-positive bacteria (B) and gram-negative bacteria (C) displayed by the endophytic fungi *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* and *Alternaria alternata*, cultured in medium without and with olive leaf extract. Each value is expressed as mean  $\pm$  standard error of 3 independent experiments performed in triplicate. Bars with different letters indicate values with significant differences at  $p < 0.05$ , within each microorganism.

The role of host plant extract on the biological activity of fungal endophytes is not precisely known. Such knowledge would favor the industrial utilization and commercial production of biologically useful compounds by endophytic fungi. Therefore, we have tested the effect of aqueous olive leaf extracts on the antimicrobial activity displayed by the three endophytes against bacteria and yeasts. Overall, the results indicate that host extract plays an important role in the antimicrobial activity of the endophytic fungus, depending on the species. When considering the results obtained for all the pathogens analyzed, only the antimicrobial activity of *P. commune* grown on medium with host extracts exhibited significant changes compared to the control ( $F_{1,190}=21.140$ ,  $p < 0.001$ ; Table 1). The antimicrobial activity displayed by this specie was increased significantly (in average 1.4-fold), especially against yeasts (in average 2.4-fold;  $F_{1,70}=34.083$ ,  $p < 0.001$ ) and gram-negative bacteria (in average 1.2-fold,  $F_{1,46}=4.954$ ,  $p < 0.05$ ), upon addition of host extract to the culture medium (Fig. 1; Table 1). The antimicrobial activity of both *P. canescens* and *A. alternata* seems to be less influenced by host extract than *P. commune*, since no significant differences were found between the presence and absence of host extract on culture medium when considering the results obtained for all the pathogens analyzed (Table 1). Despite this, host extract showed to influenced significantly the antimicrobial activity of *P. canescens* against five microorganisms (one yeast, three gram-positive bacteria and one gram-negative bacteria) and of *A. alternata* against four bacteria (two gram-positive and two gram-negative), out of the eight microorganisms analyzed. Previous studies have found showing that host plant-derived compounds are required for the synthesis of bioactive secondary metabolite by the endophytic fungi (Yenn et al., 2012; Soliman and Raizada, 2013). The anti-candidal activity of *Phomopsis* sp. isolated from the medicinal herb *Orthosiphon stamineus* has shown to be enhanced upon addition of aqueous host extract in the culture medium (Yenn et al., 2012). Some other studies have shown, however, that fungal endophytes could produce bioactive compounds in the absence of any plant tissues or extracts (Soliman et al., 2011).

**Table 1** - *F* values and probability levels of the effect of olive tree leaf on the antimicrobial activity against gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and yeasts displayed by the endophytic fungi *Penicillium commune*, *Penicillium canescens* and *Alternaria alternata*.

Microorganisms		Endophytic fungi			
		<i>P. commune</i>	<i>P. canescens</i>	<i>A. alternata</i>	
Yeasts	<i>C. glabrata</i>	F(1,22)	421.255 <sup>***</sup>	14.649 <sup>***</sup>	0.296 <sup>ns</sup>
	<i>C. albicans</i>	F(1,22)	139.074 <sup>***</sup>	0.100 <sup>ns</sup>	0.335 <sup>ns</sup>
	<i>C. parapsilosis</i>	F(1,22)	3.776 <sup>ns</sup>	1.106 <sup>ns</sup>	0.025 <sup>ns</sup>
	Total	F(1,70)	34.083 <sup>***</sup>	0.366 <sup>ns</sup>	0.335 <sup>ns</sup>
Gram+	<i>B. subtilis</i>	F(1,22)	8.684 <sup>**</sup>	4.723 <sup>*</sup>	17.850 <sup>***</sup>
	<i>B. cereus</i>	F(1,22)	20.055 <sup>***</sup>	9.605 <sup>**</sup>	20.490 <sup>***</sup>
	<i>S. aureus</i>	F(1,22)	2.740 <sup>ns</sup>	4.808 <sup>*</sup>	3.034 <sup>ns</sup>
	Total	F(1,70)	0.396 <sup>ns</sup>	0.127 <sup>ns</sup>	0.016 <sup>ns</sup>
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	F(1,22)	0.573 <sup>ns</sup>	1.266 <sup>ns</sup>	7.410 <sup>*</sup>
	<i>E. coli</i>	F(1,22)	19.304 <sup>***</sup>	15.481 <sup>***</sup>	8.741 <sup>**</sup>
	Total	F(1,46)	4.954 <sup>*</sup>	0.519 <sup>ns</sup>	4.956 <sup>*</sup>
Total		F(1,190)	21.140 <sup>***</sup>	0.461 <sup>ns</sup>	2.417 <sup>ns</sup>

Probability levels: n.s. - no significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

The results also indicate that plant host extract may induce or repress the antimicrobial activity of the endophytic fungi (Fig. 1; Table 1). Plant host extract significantly enhanced the antimicrobial activity of *P. commune* and *P. canescens* against *C. glabrata* (25.4-fold and 1.2-fold, respectively), *C. albicans* (17.8-fold for the first specie), *B. subtilis* (1.2-fold and 1.1-fold, respectively), *S. aureus* (1.1-fold for the former specie) and *E. coli* (1.7-fold and 1.2-fold, respectively), but decrease against *B. cereus* (1.4-fold and 1.2-fold, respectively). Although with less effect compared to *Penicillium* strains, the host extract similarly shown to significantly increase the antimicrobial activity of *A. alternata* against *B. subtilis* (1.4-fold) and *E. coli* (1.8-fold), and to reduce against *B. cereus* (1.6-fold) and *P. aeruginosa* (1.5-fold). Curiously, was also noticed that in the presence of host extract, the antimicrobial activity displayed by all the endophytes was significantly enhanced against *B. subtilis* (in average 1.2-fold) and *E. coli* (in average 1.6-fold), but reduced against *B. cereus* (in average 1.4-fold). Our results, therefore, suggest that the presence of host plant in the medium may stimulate or repress the production of antimicrobial metabolites by endophytic fungi, which nature (at least some of them) seem to be common among the endophytes tested. In the future, fractionation based bioassays using olive leaf extracts may be used to identify candidate diffusible metabolites that affect endophytic antimicrobial biosynthesis.

### **Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)**

During the initial screening, only *A. alternata* exhibited a potent broad spectrum activity against yeasts, including *C. albicans*, independently of the host plant. This feature makes this specie an ideal candidate to be explored as a microbial factory for industrial production of desirable antimicrobial compounds. Therefore, we have selected this specie to determine the MIC, by using a broth micro-dilution method. The fungus was grown on PDB and extracts from both mycelium and cultured broth were prepared in organic solvents with several polarities [ethyl acetate, methanol and methanol:water (1:1, v/v)], which were further used to determine MICs values. PDB medium was also included in this study as negative control.

The results depicted in Table 2 showed that microorganism sensitivity differed with the nature of the organic solvent used to extract active fractions. Ethyl acetate extract exhibited a stronger broad spectrum activity when compared to methanol and methanol:water (1:1, v/v). Ethyl acetate extracts inhibited all the tested strains at MIC ranging from 0.095 to 25 mg/mL, being more active against yeast ( $MIC \leq 0.095$  mg/mL), followed by bacteria ( $MIC \leq 3.125$  mg/mL for gram-negative and  $MIC \leq 25.000$  mg/mL for gram-positive). Fernandes et al. (2009) reported antimicrobial activity of crude extract of *A. alternata* isolated from coffee leaves (*Coffea arabica* L.) against *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans* at the MIC of range 0.05-0.1 mg/mL, 0.4-0.8 mg/mL and  $>0.8$  mg/mL, respectively. Similarly, ethyl acetate extract of *A. alternata* isolated from *Nerium oleander* L., have shown MIC values of 0.02 mg/mL against *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* (Ramesha et al., 2013). By contrast, both methanol and methanol:water (1:1, v/v) only inhibited the gram-positive bacteria *B. cereus* at the MIC range of 0.351-0.683 mg/mL and 0.080-0.930 mg/mL, respectively (Table 2). The highest antimicrobial activity found in the ethyl acetate extract compared to these two solvents was previously observed for several endophytic fungi species (Verma et al., 2008; Musavi and Balakrishnan, 2014). These findings suggested that most active fraction of endophytic fungi was extracted in ethyl acetate rather than other organic solvents. It was also notice a lack of growth inhibition of all microorganisms by the PDB medium extract prepared from the several organic solvents (data not shown).

The results also indicate that, in general, the antimicrobial metabolites produced by *A. alternata* were inside the mycelium or secreted into the culture medium. In fact, ethyl acetate extract of the mycelium was found to be as effective as the culture broth of *A. alternata* in inhibiting *S. aureus*, *B. cereus*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. albicans* (Table 2). For some microorganisms, such as *B. subtilis*, *E. coli* and *B. cereus*, the extracts prepared from mycelium presented a higher inhibition level when compared to extracts from culture broth. The gram-negative bacteria *P. aeruginosa* was an exception, being only inhibited by ethyl acetate extract prepared from culture broth.

In a general way, and according to the MIC values obtained, ethyl acetate should be selected as the best extraction solvent to obtain optimized antimicrobial agents from endophytic fungus.

**Table 2** - MIC values (mg/mL) of the extracts prepared from mycelium and cultured broth of *Alternaria alternata* cultures.

		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>
Ethyl acetate	Culture broth	25.000	6.250	0.095	3.125	3.125	0.095	0.095	0.095
	Mycelium	0.095	6.250	0.095	-	0.095	0.095	0.095	0.095
Methanol:water (1:1, v/v)	Culture broth	-	-	0.930	-	-	-	-	-
	Mycelium	-	-	0.080	-	-	-	-	-
Methanol	Culture broth	-	-	0.683	-	-	-	-	-
	Mycelium	-	-	0.351	-	-	-	-	-

- No inhibition

## Volatile profile

Some volatile organic compounds (VOCs) extracted from endophytic fungi have been reported to have antimicrobial effects against a variety of human and plant pathogens (Mitchell et al., 2010; Kudalkar et al., 2012). Therefore, we have analyzed the VOCs produced by *A. alternata* by GC/MS in an attempt to identify the compounds potentially responsible for the antimicrobial activity displayed by this specie. The VOCs were identified in fungus growing in PDA medium (*in vitro* assay). Controls consisted of uninoculated PDA medium that were used to subtract any possible compounds from the medium. Moreover, the VOCs produced by *P. canescens* growing under *in vitro* conditions were also analyzed in order to get a more accurate identification of the antimicrobial compounds produced by *A. alternata*. In the first screening, *P. canescens* shown to display the lowest activity against yeasts and the compounds appearing in this specie will be compared to those acquired from the *A. alternata* growing under *in vitro* conditions.

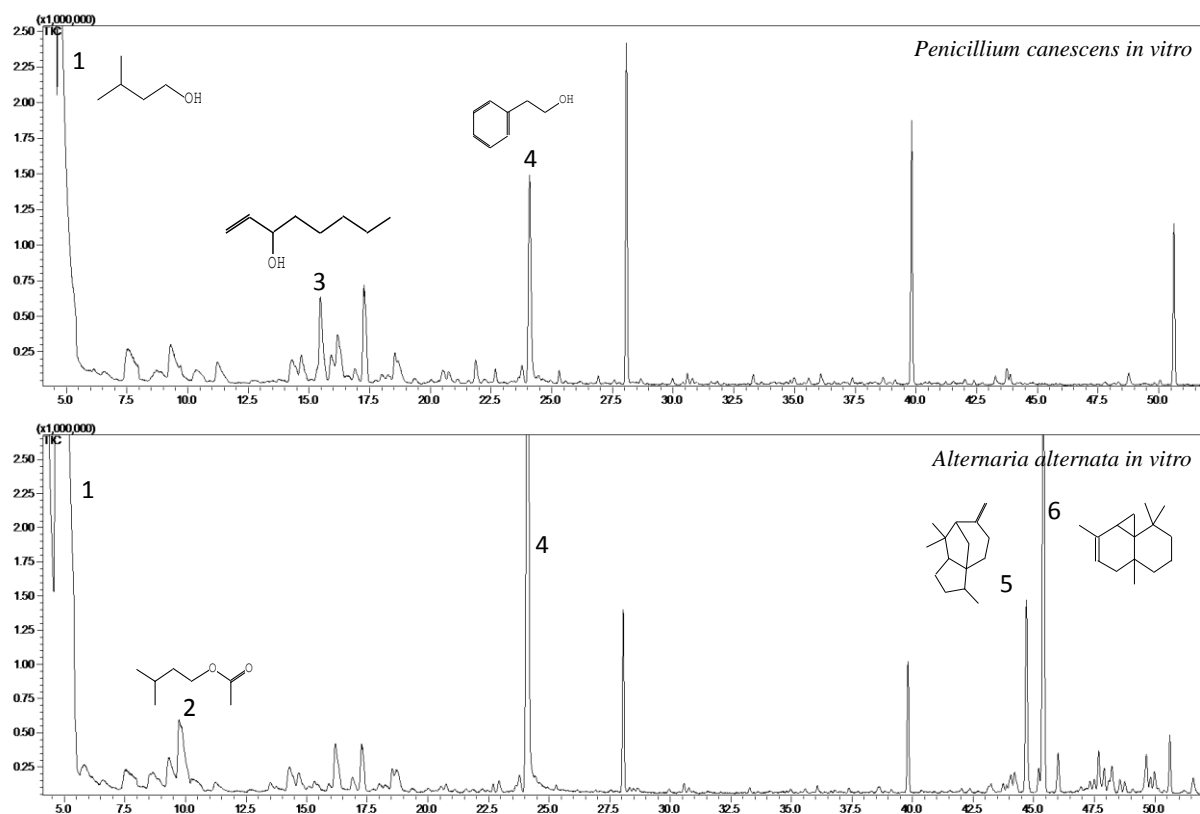
The GC/MS profile (Table 3; Fig. 2) revealed that six VOCs were found among *A. alternata* and *P. canescens*. The VOCs formally and tentatively identified belong to different chemical classes: three alcohols (3-methyl-1-butanol, 1-octen-3-ol, and phenylethyl alcohol), one esters (3-methyl-1-butanol acetate), and two sesquiterpenes ( $\beta$ -cedrene and thujopsene). The results revealed differences among samples, both in compounds identified as well as in their amounts. The volatile fraction of *A. alternata* was composed by 5 compounds and in *P. canescens* by three compounds (Table 3). The most abundant volatile identified in *A. alternata* and *P. canescens* was 3-methyl-1-butanol (63.4 and 66.6% of the total volatile fraction, respectively) followed by phenylethyl alcohol (22.4 and 20.2% of the total volatile fraction, respectively). 3-Methyl-1-butanol acetate (7.2%), was the third most abundant compound found in *A. alternata*, followed by thujopsene (6.2%) and  $\beta$ -cedrene (0.7%); whereas in *P. canescens* 1-octen-3-ol (13.1%) was the third most abundant compound identified, being this mushroom-like alcohol exclusively found in this fungus. Some of the organic compounds identified in this study have been reported to have antimicrobial activity against a variety of pathogens. For instances, 3-methyl-1-butanol was reported to have a high antimicrobial effect, and at low concentrations was shown to inhibit nearly 100% the growth of phytopathogens under *in vitro* conditions (Fialho et al., 2011). Similarly, it is well known that phenylethyl alcohol is a bacteriostatic agent that, at low

concentrations, can inhibit the growth of gram-negative bacteria, including *Salmonella*, *Shigella*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas* and *Proteus* (Cretenet and Vernoux, 2013). Thujopsene has shown potent antibacterial activity, for example against phytopathogens (Manter et al., 2007)-and  $\beta$ -cedrene was considered a powerful antimicrobial agent (Lin et al., 2012). This suggested that some of the volatile compounds identified, in special the most abundant, could participate in the microbial inhibition displayed by *A. alternata* as well as by *P. canescens*.

**Table 3** - Volatile profile of the endophytic fungi *Penicillium canescens* and *Alternaria alternata* growing *in vitro* conditions, expressed in chromatographic normalized peak area (mean  $\pm$  standard deviation). Compounds found in the control PDA are not included in this table.

								<b>Area/1000 <math>\pm</math> SD<sup>d</sup></b>	
<b>Compound</b>	<b>RT<sup>a</sup></b>	<b>LRI<sup>b</sup></b>	<b>Characteristic ions (m/z)</b>	<b>QI (m/z 100%)<sup>c</sup></b>	<b>Molecular weight</b>	<b>Molecular formula</b>	<i>P. canescens</i>	<i>A. alternata</i>	
1	3-Methyl-1- butanol	4.7	697	42/55/70	55	88	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	10115 $\pm$ 3151	25585 $\pm$ 11517
2	3-Methyl-1- butanol acetate	9.8	820	43/55/70	43	130	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	n.d.	2697 $\pm$ 467
3	1-Octen-3-ol	15.48	969	57	57	128	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	1901 $\pm$ 433	n.d.
4	Phenylethyl alcohol	24.08	1136	91/92/122	91	122	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	3080 $\pm$ 986	9065 $\pm$ 4189
5	$\beta$ -cedrene	44.70	1398	41/69/93/120/161/204	161	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	n.d.	346 $\pm$ 338
6	Thujopsene	45.40	1416	41/93/105/119/133	119	204	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	n.d.	2313 $\pm$ 1653

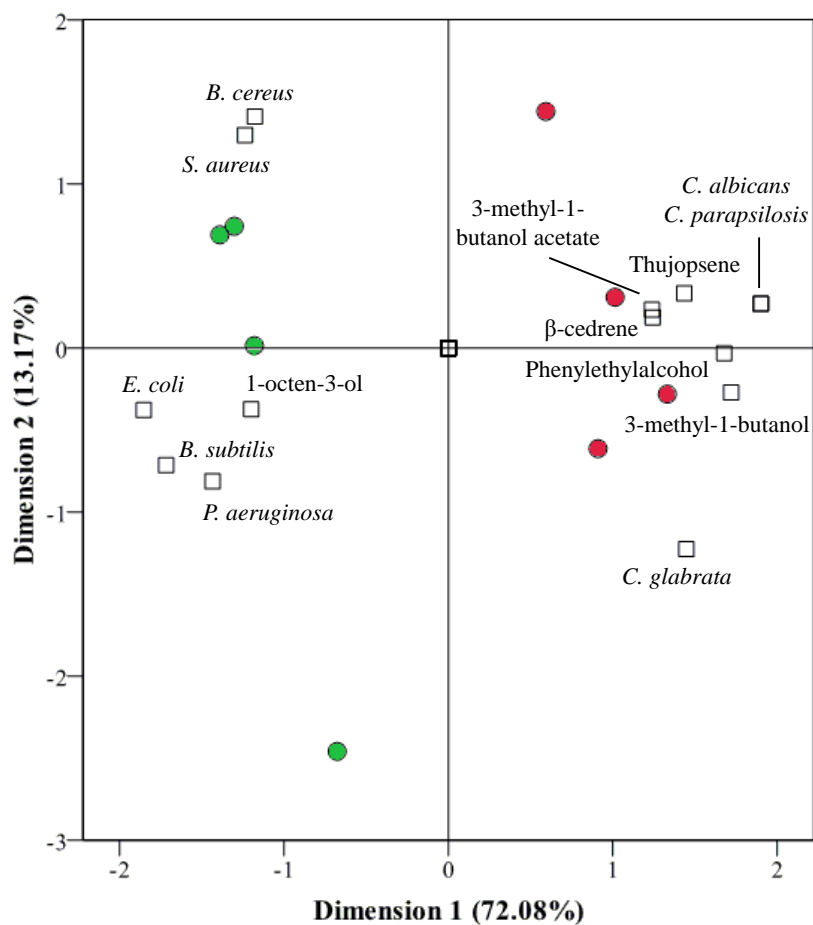
<sup>a</sup>Retention time; <sup>b</sup>Linear Retention Index reported in literature (NIST 11); <sup>c</sup>Quantification ions; <sup>d</sup>Area expressed as arbitrary units, S.D. - standard deviation of four independent assays; n.d. – not detected.



**Figure 2** Full scan chromatographic profile obtained from the endophytic fungi *Penicillium canescens* and *Alternaria alternata* growing *in vitro* by HS-SPME using DVB/CAR/PDMS fiber (identification numbers correspond to those compounds reported in Table 3).

Therefore, a principal component analysis was performed with volatile profile obtained from *P. canescens* and *A. alternata* growing *in vitro* and their antimicrobial activity (halo inhibition) against bacteria and yeasts, to describe the correlation between the two parameters. The PCA obtained was able to distinguish the two species (Figure 3) explaining in two principal components 85.25% of the total variance captured. In accordance with previous volatile profile description, the first principal component clearly separate *A. alternata* from *P. canescens* due to its higher content in 3-methyl-1-butanol (2.5-fold) and phenylethyl alcohol (2.9-fold) when compared to *P. canescens*. Other relevant discriminating compounds were 3-methyl-1-butanol acetate,  $\beta$ -cedrene and thujopsene. An interesting result is the clustering of *C. albicans* and *C. parapsilosis* together with these volatile compounds, suggesting their involvement in the inhibition

displayed by *A. alternata* against those yeasts as previously observed. *P. canescens* as well distinguished based on its 1-octen-3-ol content. The cluster of this compound together with *E. coli*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa*, suggested the participation of 1-octen-3-ol in the observed inhibitory effect displayed by this fungus against those bacteria.



**Figure 3** - Principal component analysis obtained using the volatile composition of *Alternaria alternata* (●) and *Penicillium canescens* (●) growing *in vitro* and antimicrobial activity displayed by these fungi against bacteria and yeasts, evaluated as halo inhibition (in cm<sup>2</sup>). The PCA factors explain 85.25% of the total variance.

## **Conclusion**

With the present work we concluded that the endophytic fungus *P. commune*, *P. canescens* and *A. alternata* isolated from *O. europaea* possess antimicrobial agents capable to inhibit gram-positive and gram-negative bacteria, as well as yeasts. *A. alternata* revealed high capacity to inhibit *Candida* sp.. The role of host plant was decisive over the antimicrobial potential, being observed different trends according to the microorganisms assayed. Volatile composition was strongly influenced according to the tested endophytic fungus, being the most abundant components identified ascribed with antimicrobial potentialities. Therefore, future studies need to focus on the potential use of the antimicrobial volatiles from endophytic fungus as an alternative and innovative source of antimicrobial agents.

## **Acknowledgments**

This work is funded by National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the project "EndoBio - Isolation and screening of endophytic fungi for biological control of olive against *Colletotrichum acutatum* and *Verticillium dahliae*" (PTDC / AGR-PRO / 4354/2012).

## References

- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*, 41(1), 1-16.
- Banerjee, D., Strobel, G., Geary, B., Sears, J., Ezra, D., Liarzi, O., Coombs, J. (2010). *Muscodor albus* strain GBA, an endophytic fungus of *Ginkgo biloba* from United States of America, produces volatile antimicrobials. *Mycology*, 1(3), 179-186.
- Bertinetti, B. V., Peña, N. I., Cabrera, G. M. (2009). An antifungal tetrapeptide from the culture of *Penicillium canescens*. *Chemistry & biodiversity*, 6(8), 1178-1184.
- Carter, G. T. (2011). Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Natural product reports*, 28(11), 1783-1789.
- Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M., Jabes, D. (2010). Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 423-430.
- Fernandes, M. D. R. V., Pfenning, L. H., Costa-Neto, C. M. D., Heinrich, T. A., Alencar, S. M. D., Lima, M. A. D., Ikegaki, M. (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4), 677-685.
- Fialho, M. B., Moraes, M. H. D. D., Tremocoldi, A. R., Pascholati, S. F. (2011). Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(2), 137-142.
- Guo, B. H., Wang, Y. C., Zhou, X. W., Hu, K., Tan, F., Miao, Z. Q., Tang, K. X. (2006). An endophytic taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *African Journal of Biotechnology*, 5(10).
- Hawksworth, D. L. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology*, 50, 9-18.
- Hellwig, V., Grothe, T., Mayer-Bartschmid, A., Endermann, R., Geschke, F. U., Henkel, T., Stadler, M. (2002). Altersetin, a new antibiotic from cultures of

- endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *The Journal of antibiotics*, 55(10), 881-892.
- Högberg, L. D., Heddini, A., Cars, O. (2010). The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends in pharmacological sciences*, 31(11), 509-515.
- Hosseini Moghaddam, M., Soltani, J., Babolhavaeji, F., Hamzei, J., Nazeri, S., Mirzaei, S. (2013). Bioactivities of endophytic *Penicillia* from Cupressaceae. *Journal of Crop Protection*, 2(4), 421-433.
- Hyde, K. D., Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*, 33, 163-173.
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.
- Kjer, J., Wray, V., Edrada-Ebel, R., Ebel, R., Pretsch, A., Lin, W., Proksch, P. (2009). Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. *Journal of natural products*, 72(11), 2053-2057.
- Kudalkar, P., Strobel, G., Riyaz-Ul-Hassan, S., Geary, B., Sears, J. (2012). *Muscodora sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. *Mycoscience*, 53(4), 319-325.
- Kusari, S., Singh, S., Jayabaskaran, C. (2014). Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in biotechnology*, 32(6), 297-303.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., Cars, O. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet infectious diseases*, 13(12), 1057-1098.
- Li, C. S., An, C. Y., Li, X. M., Gao, S. S., Cui, C. M., Sun, H. F., Wang, B. G. (2011). Triazole and dihydroimidazole alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *Journal of natural products*, 74(5), 1331-1334.

- Lin, J., Dou, J., Xu, J., & Aisa, H. A. (2012). Chemical composition, antimicrobial and antitumor activities of the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. *Molecules*, 17(5), 5030-5039.
- Li, Y. C., Tao, W. Y., Cheng, L. (2009). Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(2), 233-239.
- Manter, D. K., Kelsey, R. G., & Karchesy, J. J. (2007). Antimicrobial activity of extractable conifer heartwood compounds toward *Phytophthora ramorum*. *Journal of chemical ecology*, 33(11), 2133-2147.
- Morath, S. U., Hung, R., Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26(2), 73-83.
- Mousa, W. K.; Raizada, M. N. (2013). The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in microbiology*, 4.
- MP Gutierrez, R., MN Gonzalez, A., M Ramirez, A. (2012). Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. *Current medicinal chemistry*, 19(18), 2992-3030.
- Musavi, S. F., Balakrishnan, R. M. (2014). A Study on the Antimicrobial Potentials of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *Journal of Medical and Bioengineering Vol*, 3(3).
- Naz, S., & Vernoux, M. C. J. (2013). Current knowledge on antimicrobial metabolites produced from aromatic amino acid metabolism in fermented products. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) 337-346.
- Nicoletti, R., Fiorentino, A., & Scognamiglio, M. (2014). Endophytism of *Penicillium* Species in Woody Plants. *Open Mycology Journal*, 8, 1-26.
- Nicoletti, R., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., Carella, A., Ciavatta, M. L. (2007). Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 163(5), 295-301.

- Nirupama, R., Chaithra, K., Govindappa, M., rappa, C. P., Vinay, R. B. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3643-3652.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., Salas, J. A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 10(5), 281-292.
- Pereira, E., Santos, A., Reis, F., Tavares, R. M., Baptista, P., Lino-Neto, T., Almeida-Aguiar, C. (2013). A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological research*, 168(1), 1-5.
- Qadri, M., Johri, S., Shah, B. A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S. K., Riyaz-Ul-Hassan, S. (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*, 2(1), 8.
- Ramesha, A., Sunitha, V., Srinivas, C. (2013). Antimicrobial activity of secondary metabolites from endophytic fungi isolated from *nerium oleander*. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 4(1), 683-693.
- Rios, J. L., Recio, M. C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2), 127-149.
- Rodriguez, R. J., Woodward, C., Redman, R. S. (2012). Fungal influence on plant tolerance to stress. *Biocomplexity of plant–fungal interactions*. Oxford: Wiley-Blackwell, 155-163.
- Selim, K. A., El-Beih, A. A., Abdel-Rahman, T. M., & El-Diwany, A. I. (2012). Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(1), 31-82.
- Soliman, S. S., Tsao, R., Raizada, M. N. (2011). Chemical inhibitors suggest endophytic fungal paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways. *Journal of natural products*, 74(12), 2497-2504.
- Soliman, S. S., & Raizada, M. N. (2013). Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of Taxol from an endophytic fungus in host *Taxus* plants. *Frontiers in microbiology*, 4.

- Strobel, G. (2006). Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 240-244.
- Ul-Hassan, S. R., Strobel, G. A., Booth, E., Knighton, B., Floerchinger, C., Sears, J. (2012). Modulation of volatile organic compound formation in the Mycodiesel-producing endophyte *Hypoxylon* sp. CI-4. *Microbiology*, 158(2), 465-473.
- Verma, V. C., Gond, S. K., Mishra, A., Kumar, A., & Kharwar, R. N. (2008). Selection of natural strains of fungal endophytes from *Azadirachta indica* A. Juss, with anti-microbial activity against dermatophytes. *Current Bioactive Compounds*, 4(1), 36-40.
- Wright, G. D. (2012). Antibiotics: a new hope. *Chemistry & biology*, 19(1), 3-10.
- Yang, Y., Zhao, H., Barrero, R. A., Zhang, B., Sun, G., Wilson, I. W., Qiu, D. (2014). Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431. *BMC genomics*, 15(1), 69.
- Yenn, T. W., Lee, C. C., Ibrahim, D., & Zakaria, L. (2012). Enhancement of anti-candidal activity of endophytic fungus *Phomopsis* sp. ED2, isolated from *Orthosiphon stamineus* Benth, by incorporation of host plant extract in culture medium. *Journal of Microbiology*, 50(4), 581-585.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., . Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological research*, 165(6), 437-449.



## Supporting information

**Table S1** – Range of extract concentration (mg/mL) used to determine MIC values. MIC values were determined for ethyl acetate, methanol and methanol:water (1:1, v/v) extracts of both mycelium and cultured broth of *Alternaria alternata*. PDB medium was also included as negative control

	Ethyl acetate	Methanol	Methanol:water (1:1, v/v)
Mycelium	25 – 0.0475	45 – 0.08	45 – 0.08
Culture broth	50 - 0.095	350 – 0.682	240 – 0.46
PDB medium	50 - 0.0475	250 – 0.48	250 – 0.48



**Figure S1** – Culture in vitro flasks (50 mL) sealed with a cap containing a silicone septum. This system was used to evaluate the production of volatile organic compounds by these fungi





# Capítulo 3

## Conclusões



## Conclusão

Os fungos endofíticos caracterizam-se por colonizarem inter e intracelularmente os tecidos internos das plantas, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causarem sintomas aparentes de doença no hospedeiro. Estes fungos têm despertado o interesse da comunidade científica por representarem uma fonte diversa de novos compostos bioativos naturais, com aplicações na indústria farmacêutica, alimentar ou agrícola. Apesar destes fungos terem sido alvo de intenso estudo nos últimos anos, é estimado que uma grande quantidade destes compostos bioativos se encontre ainda por identificar. Na atualidade, muitos dos antibióticos e antifúngicos disponíveis no mercado têm-se mostrado ineficazes no tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes. Esta resistência aos antibióticos é uma ameaça global à saúde pública, e para a qual uma das soluções apontadas passa pelo desenvolvimento de novos fármacos e novas classes de antibióticos. A bioprospeção de novos compostos antimicrobianos ao nível dos fungos endofíticos reveste-se, neste âmbito, de enorme importância. Contudo, a aplicação destes fungos na indústria farmacêutica só será possível se estes possuírem a capacidade de produzirem os compostos bioativos de interesse em meio de cultura, de forma independente da planta hospedeira. Assim, este trabalho permitiu avaliar o potencial antimicrobiano de três fungos endofíticos isolados de folhas de oliveira, *Penicillium commune*, *Penicillium canescens*, *Alternaria alternata*, e o efeito da planta hospedeira nestas propriedades. Permtiu ainda identificar potenciais compostos volatéis que possam ser responsáveis pela atividade antimicrobiana exibida pelos endófitos.

Todos os fungos endofíticos testados no presente estudo apresentaram uma forte atividade antimicrobiana. De entre as espécies estudadas, *A. alternata* pareceu ser a mais promissora no tratamento de doenças infecciosas causadas por *Candida* sp., originando halos de inibição significativamente superiores aos antifúngicos comerciais. Esta espécie foi também a que apresentou o maior espectro de inibição, reduzindo significativamente sete microrganismos dos oito analisados, e a única que inibiu significativamente *Candida albicans* quando comparada com o antifúngico comercial. Por sua vez, as espécies *P. canescens* e *P. commune*, mostraram ser mais eficazes contra as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Extractos aquosos de folhas da oliveira

mostraram influenciar a atividade antimicrobiana, em especial da espécie *P. commune*, seguida pela *P. canescens* e *A. alternata*. O efeito dos extratos foliares fez-se sentir pelo aumento ou diminuição da atividade antimicrobiana de acordo com as espécies interagentes (fungo endófito- microrganismo patogénico). Estes resultados permitiram seleccionar o fungo endófito *A. alternata* para os estudos subsequentes. De entre as três espécies estudadas, esta é a que apresenta um maior potencial na indústria farmacêutica, por ter exibido uma atividade antimicrobiana forte e de amplo espectro, e com reduzida influência da planta hospedeira.

A partir do micélio de *A. alternata* e do respectivo meio de cultura prepararam-se extratos com solventes de diferentes polaridades, de forma a determinar a concentração mínima inibitória (CMI). O extrato de acetato de etilo foi o que apresentou um maior espectro, ao inibir todos os microrganismos analisados, e o que mostrou uma menor CMI (a variar entre 0,095 – 25,00 mg/mL). Este extrato demonstrou ser mais eficaz contra *Candida* sp. (MIC  $\leq$  0,095 mg/mL) quando comparado com as bactérias (MIC  $\leq$  3,125 mg/mL para gram-negativa; MIC  $\leq$  25,000 mg/mL para gram-positiva). Os extractos metanólico e metanólico:água 1:1 (v/v) só inibiram um microrganismo, *Bacillus cereus*, a valores de MIC a variar entre 0,351-0,683 mg/mL e 0,080-0,930 mg/mL, respectivamente. A deteção de actividade antimicrobiana nos extratos obtidos a partir da biomassa fúngica e do meio de cultura sugere que os compostos antimicrobianos possam estar presentes nas hifas e/ou possam ser secretadas pelo fungo para o meio de cultura. Este resultado sugere que ambas as matrizes poderão ser utilizadas para o isolamento do composto antimicrobiano.

A avaliação dos compostos voláteis por GC/MS dos fungos *A. alternata* e *P. canescens* em crescimento sob condições *in vitro*, permitiu identificar um total de seis compostos pertencentes a três classes químicas: álcoois (3-metil-1-butanol, 1-octeno-3-ol, e fenil-etil álcool), ésteres (Acetato de 3-metil-1-butanol), e sesquiterpenos ( $\beta$ -cedreno e thujopsene). Os compostos voláteis mais abundantes em *A. alternata* e *P. canescens* foram o 3-metil-1-butanol (63,4 e 66,6% do total da fração volátil, respectivamente) seguida pelo fenil-etil álcool (22,4 e 20,2% do total da fração volátil, respectivamente). Todos os compostos identificados encontram-se descritos como possuindo propriedades antimicrobianas o que poderá explicar, em parte, a actividade

antimicrobiana exibida pelos dois endófitos. Esta hipótese foi corroborada pela análise de componentes principais que demonstrou o envolvimento de 3-metil-1-butanol e fenil-etil álcool, produzido por *A. alternata*, no processo de inibição deste fungo contra *C. albicans* e *Candida parapsilosis*. Por sua vez, o composto 1-octeno-3-ol produzido pelo *P. canescens* parece ter um papel na inibição exibida por este fungo contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*.

Os resultados obtidos evidenciam, pela primeira vez, o potencial antimicrobiano de espécies fungicas endofíticas da oliveira. As três espécies demonstraram ser uma fonte promissora de antibióticos/antifúngicos naturais que poderão, no futuro, ser exploradas ao nível da indústria farmacêutica. Apesar do seu potencial biotecnológico na área farmacêutica, é ainda necessário proceder-se à elucidação da natureza química dos metabolitos produzidos recorrendo, por exemplo, a vários métodos cromatográficos acoplada a espectrometria de massa, entre outros.