

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia**

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS
AOS CACTOS *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa* PRESENTES EM
ECOSSISTEMAS DO BRASIL E ESTADOS UNIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em microbiologia.

**ALICE FERREIRA DA SILVA HUGHES
BELO HORIZONTE**

2014

ALICE FERREIRA DA SILVA HUGHES

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS
AOS CACTOS *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa* PRESENTES EM
ECOSSISTEMAS DO BRASIL E ESTADOS UNIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em microbiologia.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa
Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos – ICB/UFMG.

Co-orientadores: Dr. Carlos Augusto Rosa
Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Leveduras
ICB/UFMG.

Dr. David Wedge
Dr. Charles L. Cantrell
Natural Products Utilization Research Unit of the National Center for
Natural Products Research University, United States Department of
Agriculture (ARS/NPURU/USDA), Oxford, MS, USA.

Belo Horizonte, 2014

Dedico este trabalho a Frederic Mendes Hughes pelo apoio, força e amparo em todas as fases do doutorado.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Microbiologia, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (PPGMICRO), pela oportunidade de realização do curso;

Ao Professor Dr. Luiz Henrique Rosa pela orientação, ensinamentos e oportunidades engrandecedoras concedidas durante o curso;

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa pela co-orientação, ensinamentos, críticas e valiosas sugestões, bem como pela participação na apresentação de projeto de doutorado e na qualificação;

Ao grupo de pesquisa da USDA: Dr. David Wedge e Dr. Charles Cantrell pela oportunidade, co-orientação e ensinamentos. Aos técnicos Ramona Pace, Linda Robertson, Amber Callahan e Solomon Green III pela paciência, ensinamentos e supervisão no dia-a-dia;

Ao querido marido, Frederic Hughes, pelo suporte nas coletas, identificação e herborização dos cactos e ensinamentos sobre análises estatísticas e filogenéticas;

A bióloga Isis Galliza pelo suporte nos ensaios antimicrobianos;

Ao técnico Jamil Silvano de Oliveira pelo suporte na utilização do liofilizador no laboratório multi-usuário da PPGMICRO da UFMG;

A Rita Moraes e Victor Madoxx pelo suporte na coleta nos EUA;

Aos queridos professores e ex-orientadores Angélica Lucchese e Flávio França pela confecção das cartas de recomendação, as quais me permitiram pleitear uma vaga no PPGMICRO da UFMG;

A banca do projeto de doutorado, composta por Ary Correa Júnior, Maria Aparecida de Resende Stoianoff e Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira, pelas considerações;

A banca de qualificação, composta por Betania Cota e Susana Johann, pelas valiosas sugestões;

A banca de doutorado, composta por Betânia Barros Cota, Daniel de Assis Santos, Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz e Susana Johann, pelas considerações e valiosas sugestões;

Aos meus pais Adeilda Soares da Silva e Heribaldo Ferreira da Silva, bem como toda família pelo constante apoio sem os quais jamais teria atingido mais uma etapa;

Às amigas do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras e do Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos, em especial a Camila Gontijo, Camila Carvalho, Mariana Costa e Natália Maciel, pela amizade e pelo ambiente de agradável convívio;

Aos amigos de Oxford, em especial a homemate Camila Carvalho, Natália Corniani e Elza Correa, pela força, companhia e por tornar a estadia em Oxford prazerosa;

À amiga Suikinai Nobre Santos pelo acompanhamento durante as etapas do doutorado e amizade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de doutorado (CNPq 141684/2010-0) e a CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (Capes/PSDE 1283/12-0).

“Se oriente, rapaz
Pela constatação de que a aranha
Vive do que tece
Vê se não se esquece
Pela simples razão de que tudo merece
Consideração
...
Determine, rapaz
Onde vai ser seu curso de pós-graduação
Se oriente, rapaz
Pela rotação da Terra em torno do Sol
Sorridente, rapaz
Pela continuidade do sonho de Adão.”
Gilberto Gil

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xxi
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS	04
2.2 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	09
2.3 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS UTILIZANDO FUNGOS ENDOFÍTICOS	11
2.4 A FAMÍLIA <i>CACTACEAE</i>	15
2.4.1 Aspectos botânicos e distribuição geográfica	15
2.4.1.1 O gênero <i>Melocactus</i> (Link & Otto)	17
2.4.1.2 O gênero <i>Opuntia</i> (<i>Opuntioideae</i> ; Stevens 2001–2008)	18
2.4.2 Utilização na medicina tradicional da família <i>Cactaceae</i>	20
2.4.3 Propriedades terapêuticas da família <i>Cactaceae</i>	23
2.4.4 Fungos endofíticos associados à espécies da família <i>Cactaceae</i>	24
3 OBJETIVO GERAL	26
3.1 Objetivos Específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 COLETAS DO MATERIAL BOTÂNICO	27
4.2 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	27
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	28
4.3.1 Extração do DNA total	28
4.3.1.1 Leveduras e fungos filamentosos obtidos de <i>Melocactus ernestii</i>	28
4.3.1.2 Leveduras e fungos filamentosos obtidos de <i>Opuntia humifusa</i>	29
4.3.2 Obtenção dos amplicons	30
4.3.2.1 Amplificação utilizando o iniciador GTG ₅	30
4.3.2.2 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4	30
4.3.2.3 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4	31
4.3.2.4 Amplificação utilizando os iniciadores EF1-728F e EF1-986R	31

4.3.2.5 Amplificação utilizando os iniciadores β -butulina	31
4.3.3 Purificação dos amplicons	32
4.3.4 Sequenciamento	33
4.3.5 Análise computacional das sequências	33
4.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	34
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS POR TÉCNICAS DE MACRO E MICROCULTIVO	35
4.6 RIQUEZA, EQUABILIDADE E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	36
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
4.7.1 Obtenção do extratos brutos	37
4.7.1.1 Extratos hidro-alcóolicos	37
4.7.1.2 Extratos diclorometânicos	37
4.7.2 Triagem da atividade antimicrobiana	38
4.7.3 Determinação da concentração inibitória mínima	40
4.7.4 Determinação da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos	40
4.7.4.1 Ensaio de bioautografia	40
4.7.4.2 Ensaio de microdiluição em placa	41
4.8 Seleção dos extratos para análise química	42
4.9 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	42
4.10 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos	43
4.11 Cromatografia Gasosa – Análise com Detector por Ionização de Chama (GC-FID)	44
4.12 Fracionamento químico biomonitorado	44
4.13 Análises de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)	45
4.14 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
4.15 Elucidação estrutural dos constituintes químicos	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DE DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À <i>Melocactus ernestii</i>	46
5.1.1 Identificação de fungos endofíticos isolados de <i>Melocactus ernestii</i>	46
5.1.2 Análise de diversidade de fungos endofíticos isolados de <i>Melocactus ernestii</i>	55

5.2 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DE DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>Opuntia humifusa</i>	59
5.2.1 Identificação de fungos endofíticos isolados de <i>Opuntia humifusa</i>	59
5.2.2 Análise de diversidade de fungos endofíticos isolados de <i>Opuntia humifusa</i>	67
5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS	69
5.3.1 <i>Melocactus ernestii</i>	69
5.3.2 <i>Opuntia humifusa</i>	77
5.4 ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA COM METABÓLITOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À <i>Melocactus ernestii</i> e <i>Opuntia humifusa</i>	83
6 DISCUSSÃO	93
6.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DE DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À <i>Melocactus ernestii</i> E <i>Opuntia humifusa</i>	93
6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E METABÓLITOS BIOATIVOS DE FUNGOS ASSOCIADOS À <i>Melocactus ernestii</i> e <i>Opuntia humifusa</i>	99
7 CONCLUSÕES	105
8 REFERÊNCIAS	107
9 APÊNDICES	148
10 ANEXOS	187

RESUMO

Para conhecer o potencial da micobiota endofítica associada a plantas da família *Cactaceae*, este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade da comunidade endofítica da raiz, cladódio e espinho de *Melocactus ernestii* Vaupel e do cladódio de *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf., por meio de técnicas moleculares e morfológicas, bem como avaliar o potencial dos extratos e metabólitos de *M. ernestii*, *O. humifusa* e dos fungos endofíticos quanto a atividade antimicrobiana. Os fungos *Aureobasidium pullulans* e *Mycoleptodiscus indicus*, associados aos cladódios de *M. ernestii*, e *Alternaria* cf. *arborescens*, *Alternaria* sp. 4, *Aureobasidium pullulans* e *Diaporthe* sp., associados aos cladódios de *O. humifusa*, representaram os táxons dominantes. Apenas *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 (potencial nova espécie) foi compartilhado entre *M. ernestii* e *O. humifusa*. *Preussia* sp. 1 e *Sphaerobolaceae* sp. foram as espécies dominantes nos espinhos; por outro lado *Cochliobolus eragrostidis*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani* foram as espécies dominantes nas raízes de *M. ernestii*. Dentre os fungos identificados 19 gêneros e 24 espécies de *M. ernestii*, bem como quatro gêneros e quatro espécies de *O. humifusa* foram reportadas pela primeira vez como fungos endofíticos associados a cactos. As sequências de 79 táxons endofíticos (10 de *O. humifusa* e 69 de *M. ernestii*) apresentaram baixa similaridade com sequências de fungos depositadas no GenBank e podem representar espécies novas. Os valores do índice de riqueza de Margalef encontrados para a comunidade endofíticas de *O. humifusa* (cladódios = 3,4) e *M. ernestii* (cladódios = 5,7, espinhos = 5,17 e raízes = 12,1) indicaram uma diversidade moderada e elevada, respectivamente. A diversidade β foi menor entre cladódio e espinho (0,65) quando comparada com os outros pares: raiz e cladódio (0,85) e raiz e espinho (0,84), sendo a comunidade de fungos endofíticos na raiz a mais diferenciada. Os extratos obtidos de *M. ernestii* (cladódios, raízes e espinhos) e *O. humifusa* (cladódios) não apresentaram atividade antimicrobiana; entretanto, cinco extratos dos fungos endofíticos de *M. ernestii* e seis de *O. humifusa* inibiram pelo menos um dos micro-organismos alvos. Foi detectada a presença majoritária do ácido graxo palmítico para os extratos *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347, *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1, *Fusarium solanii* UFMGCB 5865 e *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A e para as frações 8 e 9 do extrato *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1. O ácido linoleico foi majoritário nas frações 7 e 9 de *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B e na fração 7 de *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1. O fracionamento biomonitorado levou ao isolamento da citocalasina H (do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350), da especiferona A (do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409) e da (-)-5-metilmeléina (do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B) que apresentaram atividade antifúngica fraca ou moderada contra os micro-organismos alvos avaliados. As espécies do gênero *Phomopsis* foram as mais sensíveis, indicando que essas substâncias podem não ser as únicas responsáveis pela bio-atividade inicialmente observada no extrato bruto. Para o extrato de *B. mediterranea* Ohu 19B sugere-se efeito sinérgico da (-)-5-metilmeléina e do ácido linoléico. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo sobre substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos associados a cactos.

Palavras-chave: fungos endofíticos, diversidade, *Cactaceae*, ácidos graxos, citocalasina H, especiferona A, (-)-5-metilmeléina e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

To understand the potential of the mycota endophytic associated to *Cactaceae* plants, this study aimed to characterize the diversity of the endophytic community of root, stem and spine from *Melocactus ernestii* Vaupel and stems from *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. by molecular biology and morphological techniques; and evaluate the potential of the crude extracts and metabolites of *M. ernestii*, *O. humifusa* and endophytic fungi on the antimicrobial potential. The taxa *Aureobasidium pullulans* e *Mycocleptodiscus indicus* associated with stems of *M. ernestii* e *Alternaria* cf. *arborescens*, *Alternaria* sp. 4 *Aureobasidium pullulans* and *Diaporthe* sp. associated with stems of *O. humifusa* were dominant; and only *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 (potential new species) was shared between *M. ernestii* and *O. humifusa*. *Preussia* sp. 1 and *Sphaerobolaceae* sp. were the dominant species on the spines while *Cochliobolus eragrostidis*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani* were the dominant species in the roots of *M. ernestii*. Among the identified isolates, genera and 24 species of *M. ernestii* and four genera and four species of *O. humifusa* were first reported as endophytic fungi associated with cacti. A total of 79 endophyte taxa recovered (10 from the *O. humifusa* and 69 from the *M. ernestii*) showed low similarity with sequences of fungi deposited in the GenBank database and could represent new fungal species. The value on the Margalef index for the endophytic fungal of *O. humifusa* (stems = 3.4) e *M. ernestii* (stems = 5.7, spines = 5.17 and roots = 12.1) showed moderate and high diversity, respectively. The Beta diversity was lower among cladodes and spines (0.65) compared with the other pairs: root and stems (0.85) and root and spines (0.84), suggesting that endophytic community of root was the most differentiated. No antifungal activity was observed in the crude extracts from plants while five extracts of fungal endophytes from *M. ernestii* and six extracts of fungal endophytes from *O. humifusa* showed antimicrobial activity for at least one microorganism tested. The majority presence of the fatty acid palmitic was detected to the extracts *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347, *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1, *Fusarium solanii* UFMGCB 5865 and *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A and the fractions 8 and 9 of *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1. The linoleic acid was majority in the fractions 7 and 9 of *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B and in the fraction 7 of *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1. Using a bioassay-guided purification approach cytochalasin H were obtained from *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350, spiciferone A were obtained from *Phoma* sp. UFMGCB 6409 and (-)-5-methylmellein were obtained from *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B, that showed weak or moderate antifungal activity against the target microorganisms tested, with the genus *Phomopsis* was the most sensitive; the results indicate that these substances can't be the unique responsible for the bio-activity initially observed in the crude extract. To extract *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B suggest synergistic effect of (-)-5-methylmellein and linoleic acid. To our knowledge, this is the first report of bioactive substances produced by endophytic fungi associated with cacti.

Keywords: endophytic fungi, diversity, *Cactaceae*, fatty acids, cytochalasin H, spiciferone A, (-)-5-methylmellein and antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema químico-ecológico: interpretação do custo-benefício entre Planta-Fungo, com ênfase em endofíticos. **(A)** demonstra a hipótese antagonismo balanceado; **(B)** doença causada por fungos patogênicos; **(C)** a reciprocidade endófito-patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que este fenômeno pode não ser universal, e mais pesquisas são necessárias para confirmação; **(D)** produção de metabólitos secundários bioativos pela planta e fungos; **(E)** sinergia equilibrada. 07

Figura 2 Ação da camptotecina e seus derivados sobre o DNA. A tensão do DNA é causada pela replicação, transcrição e remodelagem da cromatina **(a)**. Uma das fitas é quebrada pela TOP1 e favorece a formação do ponto de giro que habilita a rotação da fita intacta pela fita quebrada **(b)**. Assim, é possível visualizar **(c)** a expansão do relaxamento do DNA pelo complexo de clivagem TOP1, que pode ser estabilizado por fármacos como as camptotecinas. 08

FIGURA 3 Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos: **(1)** paclitaxel, **(2)** camptotecina, **(3)** podofilotoxina, **(4)** vincristina e **(5)** hipericina. 14

Figura 4 Metabólito secundário enfumafungina, com propriedades antifúngicas, produzido pelo fungo endofítico *Hormonema* sp. 14

Figura 5 *Melocactus ernestii* sobre afloramento rochoso no município de Ipirá – Bahia. 18

Figura 6 *Opuntia humifusa*: com **(a)** e sem espinhos **(b)**, gloquídeos **(c)** e flor **(d)**. 20

Figura 7 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia da região transcrita interna de fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii*: **a)** *Aspergillus*, **b)** *Astrocystis*, **c)** *Bartalinia*, **d)** *Cladosporium* **e)** *Colletrotricum*, **f)** *Curvularia*, **g)** *Diaporthe*, **h)** *Fusarium*, **i)** *Microsphaeropsis*, **j)** *Penicillium*, **k)** *Phoma*, **l)** *Preussia*, **m)** *Rhizopycnis* e *Setosphaeria* e **n)** *Xylaria*. 54

Figura 8 Curva de acumulação de espécies (linha cinza), intervalos de confiança de 95% (linhas em preto), baseado em 2.000 repetições de *bootstrap*. 55

Figura 9 Compartilhamento de espécies fungos endofíticos entre partes da planta *Melocactus ernestii*. Valores representam riqueza de espécies. Números nas interseções correspondem às espécies de fungos endofíticos que co-ocorrem entre as partes da planta. (U) representa o conjunto universo ou todas as espécies de fungos. Ver Tabela 3 para nomes dos táxons endofíticos. 56

Figura 10 Curvas de abundância das espécies detectadas nas partes da planta *Melocactus ernestii*: cladódio, espinho e raiz. Pontos representam as espécies de fungos endofíticos no eixo vertical. O eixo horizontal ordena as espécies em ordem hierárquica, da mais a menos comum. Ver tabela 3 para singletos e demais espécies de fungos endofíticos. 58

Figura 11 Dendrograma de similaridade baseado na matriz de abundância das comunidades endofíticas prospectadas em diferentes partes de *Melocactus ernestii*. A análise de agrupamento foi obtida pelo coeficiente de similaridade de Jaccard, método de ligação simples. Correlação cofenética = 0,999. Valor de *bootstrap* a partir de 5.000 repetições. 59

Figura 12 *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1: **a)** crescimento em meio Ágar batata dextrose (esquerda) e em meio Ágar extrato de malte (direita), **b)** conídeos sob objetiva 40x, **c)** conídeos sob objetiva 100x. 62

Figura 13 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia da região transcrita interna de fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa*: **a)** *Alternaria*, **b)** *Epicoccum*, **c)** *Cladosporium*, **d)** *Curvularia*, **e)** *Biscogniauxia*, **f)** *Pestalotiopsis*, **g)** *Phoma* e **h)** *Paraconiothyrium*. 64

Figura 14 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia do gene do fator de alongamento de fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa*: **a)** *Alternaria* e **b)** *Cladosporium*. 65

Figura 15 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia do gene da β -tubulina do fungo endofítico *Biscogniauxia mediterranea* associado à *Opuntia humifusa*. 65

Figura 16 Árvores filogenéticas a partir da análise (a) Máxima Parcimônia e (b) Bayesiana de sequências combinadas da região transcrita interna, do gene do fator de alongamento e da β -tubulina do fungo endofítico *Diaporthe* sp. associado à *Opuntia humifusa*. 66

Figura 17 Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos endofíticos associada à *Opuntia humifusa* (linha cinza), intervalos de confiança de 95% (linhas em preto), baseado em 2000 réplicas de *bootstrap*. 67

Figura 18 Curva de abundância das OTUs detectadas nos cladódios de *Opuntia humifusa*. Pontos representam as espécies (OTUs) de fungos endofíticos no eixo vertical. O eixo horizontal representa a abundância. 68

Figura 19 Metabólito citocalasina H (fórmula molecular $C_{28}H_{31}NO_7$ e massa molecular de 493 g/mol) identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato bruto do táxon *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350. 75

Figura 20 Metabólito especiferona A (fórmula molecular $C_{14}H_{16}O_3$ e massa molecular de 232,279 g/mol) identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato bruto do táxon *Phoma* sp. UFMGCB 6409. 77

Figura 21 Metabólito (-)-5-metilmeléina (fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_3$ e massa molecular de 192 g/mol) identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato bruto do táxon *Biscogniauxia mediterranea*. 83

Figura 22 Médias de inibição do crescimento (%) de *Botrytis cinerea* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μ M. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 84

Figura 23 Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum acutatum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas

concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 85

Figura 24 Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum fragariae* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 86

Figura 25 Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 87

Figura 26 Médias de inibição do crescimento (%) de *Fusarium oxysporum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 88

Figura 27 Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis obscurans* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 89

Figura 28 Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis viticola* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 90

Figura 29 Médias de inibição do crescimento (%) de *Candida krusei* depois de expostos aos metabólitos citocalasina H e especiferona. Controle positivo: anfotericina B nas concentrações de 75, 150 e 300 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 91

Figura 30 Médias de inibição do crescimento (%) de *Cladosporium sphaerospermum* depois de expostos aos metabólitos citocalasina H e especiferona. Controle positivo: benomil nas concentrações de 75, 150 e 300 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 91

Figura 31 Médias de inibição do crescimento (%) de *Escherichia coli* depois de expostos aos metabólitos citocalasina H e especiferona. Controle positivo: cloranfenicol nas concentrações de 75, 150 e 300 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Critério simbiótico proposto por Rodriguez et al. (2009) utilizado para caracterizar os grupos de fungos endofíticos. 04
- Tabela 2** Utilização terapêutica das espécies da família *Cactaceae* no Brasil. 22
- Tabela 3** Identificação molecular dos fungos endofíticos associados aos cladódios, espinhos e raízes de *Melocactus ernestii*. A identificação foi conduzida usando BLASTn da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2). 47
- Tabela 4** Valores observados e valores esperados, baseados nos estimadores de riqueza *Chao 2*, *Jackknife 1*, *Jackknife 2* e *Bootstrap*, para cladódios, espinhos e raízes de *Melocactus ernestii*. 56
- Tabela 5** Comparação entre medidas de diversidade de Unidades Taxonômicas Operacionais de fungos endofíticos para os diferentes nichos (i.e. cladódio, espinho e raiz) da espécie *Melocactus ernestii*. 57
- Tabela 6** Identificação molecular dos fungos endofíticos associados aos cladódios de *Opuntia humifusa*: identificação conduzida usando BLASTn da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2), do gene do fator de alongamento (TEF1) e o gene da β -tubulina. 61
- Tabela 7** Atividade antimicrobiana dos extratos dos fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii* com inibição acima de 70%. 70
- Tabela 8** Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) e porcentagem de inibição dos extratos hidro-alcóolicos e diclorometânicos dos extratos bioativos de fungos associados à *Melocactus ernestii*. 71
- Tabela 9** Atividade antifúngica de extratos dos fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii* por meio do ensaio de bioautografia contra três espécies *Colletotrichum*. 72

Tabela 10 Quantificação de ácidos graxos (%) produzidos por fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii*. 73

Tabela 11 Atividade antifúngica de extratos dos fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa* por meio do ensaio de bioautografia contra três espécies *Colletotrichum*. 78

Tabela 12 Quantificação de ácidos graxos (em porcentagem) produzidos por fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa*.

1 INTRODUÇÃO

As espécies comumente encontradas como endofíticas pertencem ao filo Ascomycota (SCHULZ; BOYLE, 2005), mas também são encontrados representantes dos fillos Zygomycota e Basidiomycota (PINRUAN et al., 2010; VIEIRA et al., 2012). Diferentes estudos relatam que vegetais são colonizados por dezenas de endofíticos, mostrando a sua importância na estimativa da diversidade fúngica, na descoberta de novos táxons e na distribuição geográfica das espécies (SAIKKONEM et al., 1998; ARNOLD et al., 2000; STONE et al., 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que fungos endofíticos hospedeiros de plantas medicinais são capazes de apresentar diferentes atividades biológicas (PHONGPAICHIT et al., 2006; HUANG et al., 2009; ROSA et al., 2010; VIEIRA et al., 2012) e em alguns casos sintetizar as mesmas substâncias produzidas pelos seus hospedeiros. O exemplo mais conhecido é o do paclitaxel (taxol), fármaco utilizado para o tratamento de câncer, o qual é produzido tanto na planta medicinal hospedeira *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*), como no fungo endofítico associado *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1995). Outros táxons de fungos endofíticos, tais como *Seimatoantlerium tepuiense*, *Seimatoantlerium nepalense* (BASHYAL et al., 1999), *Tubercularia* sp. (WANG et al., 2000) e *Metarhizium anisopliae* (LIU et al., 2009) também foram relatados como produtores de paclitaxel. A camptotecina (inibidor de síntese de RNA), obtida do fungo endofítico *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005a) e a podofilotoxina (antincancerígeno), produzida pelo endofítico *Trametes hirsuta* (PURI et al., 2005b), são exemplos de metabólitos vegetais também produzidos por endofíticos.

Os fungos endofíticos também são produtores metabólitos secundários bioativos diferentes daqueles produzidos pelas plantas hospedeiras e com características estruturais únicas (LI et al., 2008; WIJERATNE et al., 2008; MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008; WANG et al., 2010), os quais são de interesse para utilização na medicina e agricultura. De acordo com Aly et al. (2011), no período de 2008-2009 investigações com fungos endofíticos levaram à descoberta de mais de 100 novos produtos naturais, ao passo que quase o mesmo número de novos metabólitos foi relatado para o período de 7 anos entre 2000 a 2007. Estes dados ressaltam a importância dos fungos endofíticos em programas de bioprospecção nos últimos anos. Além disso, recentemente foram descobertos os seguintes antimicrobianos produzidos por fungos endofíticos: o pestaloteol C inibidor da replicação do vírus HIV-1LAI em células C8166 produzido por *Pestalotiopsis theae* (LI et al., 2008), o antifúngico enfumafungina

(glicosídeos triterpeno) produzido por *Hormonema* sp. (GARCIA-EFFRON et al., 2009) com atividade antifúngica contra *Candida albicans* e o metabólito (3S)-3,6,7-trihidroxi- α -tetralona isolado de *Phoma* sp., o qual mostrou atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (WANG et al., 2012).

A família *Cactaceae*, com aproximadamente 1.600 espécies, é nativa das Américas, mas ocorre em todo mundo (HUNT, 1999). Os cactos são importantes na manutenção de vários organismos vertebrados e invertebrados e também por serem amplamente utilizados na alimentação, paisagismo e medicina tradicional, como fonte de substâncias analgésicas, antibióticas, diuréticas, dentre outros (LIMA, 1996; HOLLIS; SHEINVAR, 1995; AGRA et al., 1996; ANDRADE et al., 2006a, 2006b; MAJURE, 2010). A espécie *Melocactus ernestii* (Vaupel) é endêmica do Brasil e só ocorre em afloramentos rochosos, com área de maior distribuição na Caatinga e em brejos de altitude (TAYLOR, 1991; ROCHA; AGRA, 2002; HUGHES et al., 2011). *Melocactus ernestii* também é conhecida como cabeça-de-frade e é utilizada na medicina popular principalmente no tratamento de gripe, pneumonia, doenças do intestino e cólicas (ANDRADE, 2002). *Opuntia humifusa* (Raf.). Raf., cacto termotolerante, é comumente conhecido como “figo-do-inferno” e/ou “língua do diabo” e, provavelmente, originou-se no sudoeste dos Estados Unidos e norte do México (NOBEL, 1996; LARGAY; SNEDDON, 2009; MAJURE et al., 2010). *Opuntia humifusa* é rica em polifenóis e flavonóides, minerais e é uma boa fonte de fibra na dieta alimentar (HAHM et al., 2011; KIM et al., 2012; CHA et al., 2013); além disso, apresenta várias atividades biológicas que incluem propriedades terapêuticas como efeitos anticancerígenos (YOON et al., 2009a, 2009b; HAHM et al., 2010; KIM et al., 2013; LEE et al., 2013), antibacteriana (LEE; KIM; LEE, 2004; YOUNG et al., 2007), antioxidante (CHA et al., 2013; JUN et al., 2013), anti-inflamatória (LEE et al., 2005; CHO et al., 2006) e atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica (HAHM et al., 2011), bem como pode ser uma alternativa no tratamento da osteoporose pós-menopausa (PARK et al., 2011).

A partir do exposto acima, parece possível que os tecidos de *M. ernestii* e *O. humifusa* possam ser colonizados por fungos endofíticos capazes de produzir metabólitos bioativos de interesse. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a diversidade e potencial anti-microbiano dos fungos endofíticos associados com *M. ernestii* e *O. humifusa*. Além disso, pelo nosso entendimento esse é o primeiro estudo sobre atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos associados à plantas da família *Cactaceae*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endofítico foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir os organismos que colonizam tecidos internos de plantas; mas foi De Bary, em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção entre endofíticos e patógenos de plantas (AZEVEDO, 1998). Carroll (1986) restringiu o uso do termo endofítico a organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo os fungos patogênicos e mutualistas, tais como os micorrízicos. Entretanto, Petrini (1991) propôs a expansão da definição de Carroll, incluindo todos os organismos que habitam órgãos de plantas que, em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos de um vegetal, sem causar dano aparente a seu hospedeiro. De acordo com este autor, são também considerados endofíticos os micro-organismos que apresentam uma fase epifítica duradoura, bem como patógenos latentes que vivem assintomaticamente em seus hospedeiros por algum tempo em seu ciclo de vida. “Endofítico” é, portanto, a única associação conhecida até o momento de custo-benefício entre planta-micro-organismo definida por “localização” (não “funcional”) que é transitoriamente assintomática, discreta, e estabelecida inteiramente dentro dos tecidos da planta hospedeira (KUSARI; SPITELLER, 2012a).

Historicamente, dois grupos de endofíticos têm sido classificados, os quais são baseados em sua filogenia e histórico de vida, como taxonomia, planta hospedeira e funções ecológicas. Estes grupos são classificados em endofíticos clavicipitaceos (EC), capazes de colonizar gramíneas (Grupo 1) e os endofíticos não clavicipitaceos (ENC), obtidos de tecidos assintomáticos de plantas não vasculares, pteridófitas, coníferas e angiospermas (CLAY; SCHARDL, 2002; ARNOLD, 2007a). Em 2009, Rodriguez e colaboradores demonstraram que os ENC representam três grupos funcionais distintos (Grupos 2, 3 e 4) baseados em características de colonização do hospedeiro, mecanismos de transmissão entre gerações, níveis de biodiversidade e funções ecológicas (Tabela 1).

Tabela 1 Critério simbiótico proposto por Rodriguez et al. (2009) utilizado para caracterizar os grupos de fungos endofíticos.

Critério	Clavicipitaceos (C)	Não clavicipitaceos (NC)		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Amplitude de hospedeiros	restrita	ampla parte aérea, raiz e	ampla	ampla
Tecido(s) colonizados	parte aérea e rizoma	rizoma	parte aérea	raiz
Colonização na planta	extensa	extensa	limitada	extensa
Biodiversidade na planta	baixa	baixa	alta	não conhecida
Transmissão	vertical e horizontal	vertical e horizontal	horizontal	horizontal
Benefícios adaptativos*	NAH	NAH e AH	NAH	NAH

*Não adaptado ao habitat (NAH): benefícios, tais como tolerância à seca e aumento do crescimento são comuns entre os endofíticos independentemente do habitat de origem. Adaptado ao habitat (AH): benefícios resultantes de pressões específicas ao habitat, tais como temperatura, pH e salinidade.

Os fungos endofíticos do Grupo NC 2 são capazes de proporcionar benefícios adaptativos a planta (NAH e AH) e são transmitidos horizontalmente (colonização não sistêmica) para as plantas hospedeiras por meio de esporos presentes no ar. Em contraste, alguns endofíticos também podem ser transmitidos verticalmente (colonização sistêmica) para a próxima geração de plantas via sementes (HARTLEY; GANGE, 2009). A associação entre o endofítico *Curvularia protuberata* e plantas de solos termais (*Dichanthelium lonuginosum*) é um exemplo desse grupo; em experimentos de *in vitro* no campo foram observados que nessa associação a planta o fungo conseguem sobreviver separadamente em solos com elevada temperatura, mas em associação ambos toleram altas temperaturas (REDMAN et al., 2002; MARQUEZ et al., 2007). Porém, quando a associação é submetida a outro tipo de estresse, como, por exemplo, estresse salino ou ataque de patógenos, o fungo não protege a planta dos efeitos danosos do estresse (RODRIGUEZ et al., 2009). Os fungos do Grupo NC 3 são amplamente diversos e encontrados nas partes aéreas das plantas. Sua transmissão é exclusivamente horizontal e a sua função na planta hospedeira é pouco conhecida (RODRIGUEZ et al., 2009). Os fungos do Grupo NC 4 são conhecidos como DSE (*dark septate endophytes*) e colonizam exclusivamente as raízes das plantas; apresentam funções relacionadas à promoção de crescimento, proteção contra patógenos e distribuição de plantas em ambientes extremos (MANDYAM; JUNPPONEM, 2005), entretanto, sua função também é pouco compreendida.

Os fungos endofíticos apresentam diferentes interações com suas plantas hospedeiras, incluindo mutualismo, comensalismo e antagonismo (STONE et al., 2000). A hipótese do "antagonismo balanceado" (SCHULZ et al., 1999; SCHULZ; BOYLE, 2005) foi inicialmente

proposta para tratar como um endófito evita ativar as defesas do hospedeiro, garante auto-resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro e se desenvolve dentro do seu hospedeiro, sem causar as manifestações visíveis da infecção ou doença (ARNOLD, 2005, 2007b, 2008; SCHULZ; BOYLE, 2006) (Figura 1A). Nesta hipótese a colonização assintomática de um tecido, ou órgão vegetal, por um endofítico é resultado de uma relação antagônica balanceada, onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do micro-organismo e as respostas de defesa do hospedeiro. Desse modo, a variabilidade dessa interação dependeria não só da adaptação do micro-organismo a um determinado hospedeiro ou órgão em particular, mas também de fatores como a virulência inata do endofítico, a resposta de defesa da planta e as condições ambientais. De acordo com Kusare, Hertweck e Spiteller (2012), tanto os fungos endofíticos como os patógenos possuem vários fatores de virulência que são enfrentados pelos mecanismos de defesa da planta. Se a virulência do fungo endofítico e a defesa da planta são equilibradas, a associação continua aparentemente assintomática (Figura 1A). Esta fase é apenas um período de transição e pressões de fatores ambientais podem desestabilizar o equilíbrio dos antagonistas. Se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência do fungo, este morrerá; porém, se a planta sucumbir a virulência do fungo, um relacionamento planta-patógeno conduzirá a doença do vegetal (Figura 1B). Em alguns casos os fungos endofíticos podem tornar-se agentes patogênicos latentes (Figura 1C), na medida em que são influenciados por fatores intrínsecos ou ambientais, como por exemplo, estresse ou idade da planta (ARNOLD, 2008). A interação endofítico-planta pode não ser apenas o equilíbrio entre virulência e defesa, mas uma interação muito mais complexa e precisamente controlada (Figura 1D). Por exemplo, a planta *Camptotheca acuminata* produz o metabólito anticâncer camptotecina que inibe a DNA topoisomerase I (Figura 2), enzima que desempenha importante papel nos processos de replicação e empacotamento de DNA (KUSARI; SPITELLER, 2012b), enquanto *Fusarium solani*, fungo endofítico isolado dos tecidos da entrecasca de *C. acuminata*, ajuda na proteção da planta por ser também produtor de camptotecina e resistente a toxicidade da camptotecina produzida pelo hospedeiro, já que as plantas utilizam a camptotecina como um modo de defesa química contra ataques de insetos e patógenos (SIRIKANTARAMAS et al., 2009; KUSARI et al., 2011). Da mesma forma, a topoisomerase I codificada por outro endofítico isolado a partir do mesmo tecido, mas que não produz camptotecina também, contém as mesmas alterações para torná-lo resistente à ação de camptotecina. Isso sugere uma pré-adaptação evolutiva dos endofíticos que infectam a mesma planta, independentemente da sua

capacidade biossintética. Algumas plantas também demonstraram resistência à camptotecina exercidos por resíduos de aminoácidos específicos e nos domínios catalíticos da enzima topoisomerase I. A planta *Ophiorrhiza japonica* apresenta resistência parcial à camptotecina *in vivo*, apesar de não produzir este metabólito (SIRIKANTARAMAS et al., 2009). Em ambos os casos, parece que estes tipos de interações endofítico-planta devem ser específicos e fortemente selecionados para a convivência estável (hipótese da co-evolução planta-endófito).

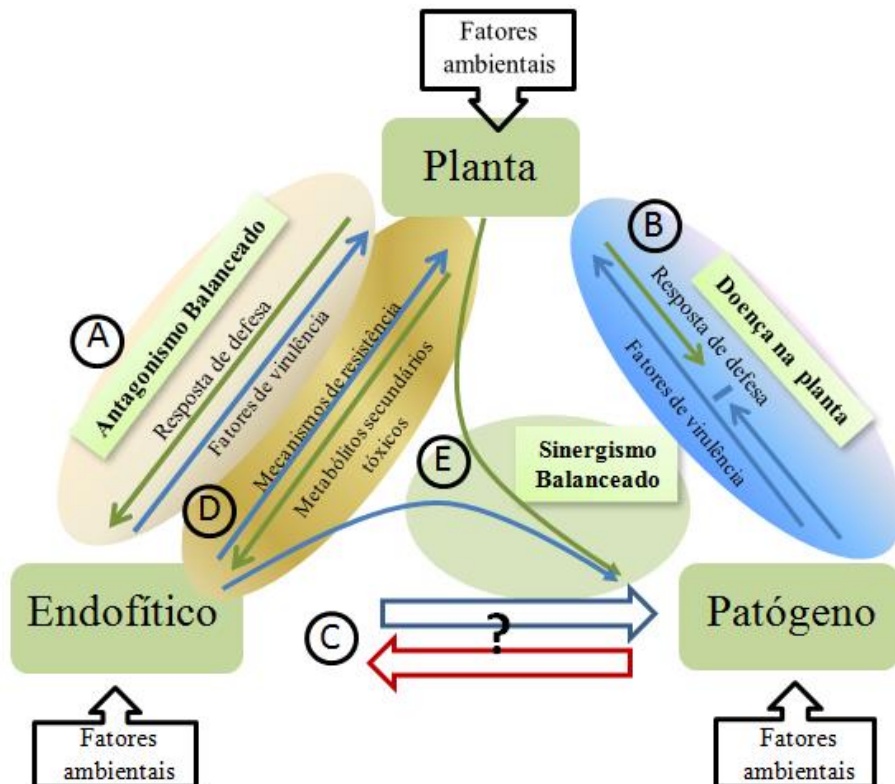


Figura 1 Esquema químico-ecológico: interpretação do custo-benefício entre Planta-Fungo, com ênfase em endofíticos. **(A)** demonstra a hipótese antagonismo balanceado; **(B)** doença causada por fungos patogênicos; **(C)** a reciprocidade endofito-patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que este fenômeno pode não ser universal, e mais pesquisas são necessárias para confirmação; **(D)** produção de metabólitos secundários bioativos pela planta e fungos; **(E)** sinergia equilibrada. **Fonte:** KUSARI; HERTWECK; SPITELLER (2012).

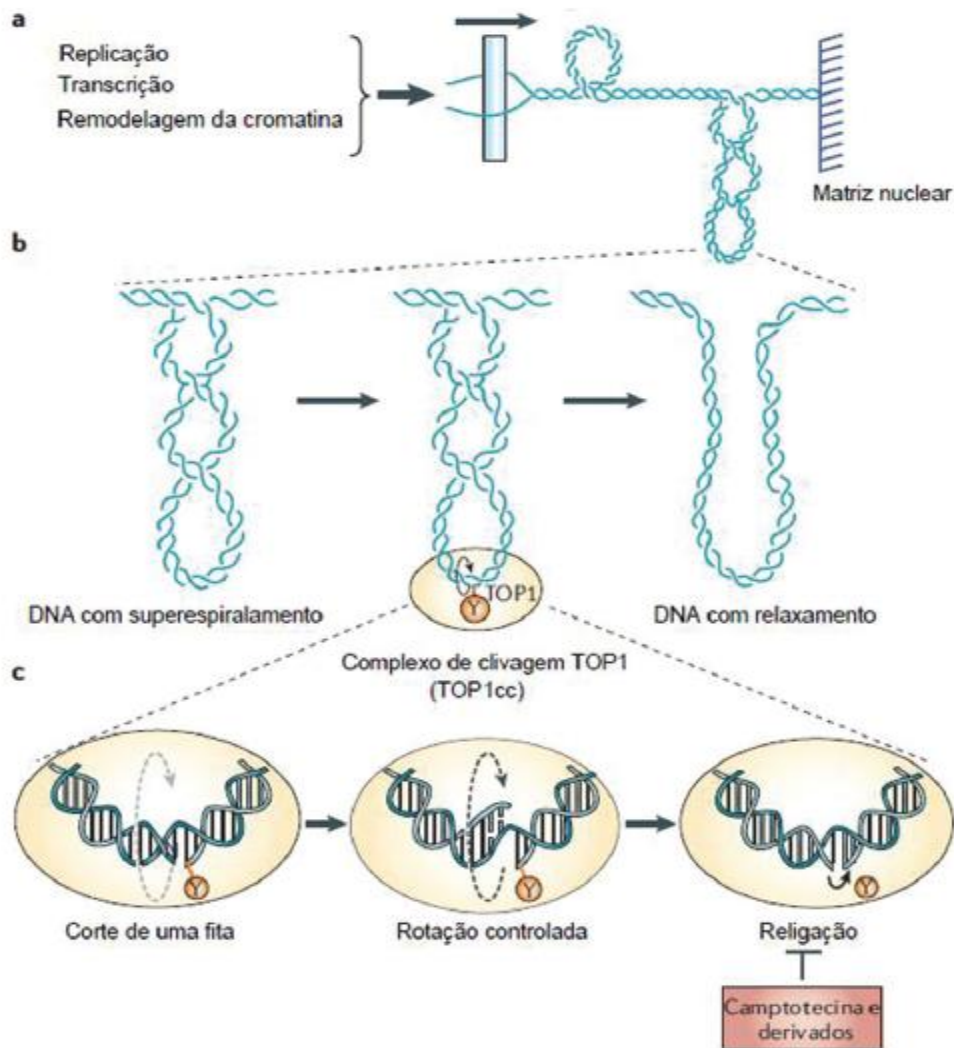


Figura 2 Ação da camptotecina e seus derivados sobre o DNA. A tensão do DNA é causada pela replicação, transcrição e remodelagem da cromatina (a). Uma das fitas é quebrada pela TOP1 e favorece a formação do ponto de giro que habilita a rotação da fita intacta pela fita quebrada (b). Assim, é possível visualizar (c) a expansão do relaxamento do DNA pelo complexo de clivagem TOP1, que pode ser estabilizado por fármacos como as camptotecinas. **Fonte:** BRANDÃO et al. (2010), adaptado de POMMIER (2006).

Embora a base genética da comunicação simbiótica ainda não seja conhecida, existem isolados e/ou espécies de fungos endofíticos que abrangem a relação simbiótica, expressando estilos de vida (interações) que variam de mutualismo para comensalismo até o parasitismo, dependendo do genótipo do hospedeiro colonizado (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008, UNTERSEHER; SCHNITTLER, 2010). Assim, pequenas diferenças genéticas nos genomas de ambos os parceiros podem controlar o resultado (positivo, negativo ou neutro) da simbiose (MORICCA; RAGAZZI, 2008). Por exemplo, a expressão do gene da proteína cinase Saka (*stress-mitogen activated protein kinase*) do endofítico *Epichloe festucae* mostra-se vital para a manutenção de sua associação mutualista com o

hospedeiro *Lolium perenne* e previni que esta associação se torne patogênica. Na associação mutante Δ sakA, foi observado um aumento dramático da regulação de hidrolases fúngicas e transportadores, mudança consistente de simbiose para patogenicidade, com crescimento proliferativo do fungo. A análise do transcriptoma da planta revelou mudanças dramáticas na expressão de genes do hospedeiro envolvidos na defesa do patógeno (biossíntese hormonal e resposta). Esta avaliação destaca como associações entre gramínea-endofíticos podem ser afetadas pelas vias de sinalização envolvidas na manutenção dessa simbiose e desencadear uma mudança da interação mutualista para patogênica (EATON et al., 2010, 2011). Dessa forma, a relação fungo-planta deve ser considerada como uma interação flexível cuja direção é determinada por pequenas diferenças na expressão genética do fungo, em resposta ao hospedeiro, ou, ao contrário, pelo reconhecimento do hospedeiro em resposta ao fungo. As interações mutualísticas entre fungos e planta hospedeira são entendidas como um equilíbrio, que está sob controles ambientais, fisiológicos e genéticos e resulta em benefícios adaptativos para ambos os parceiros (KOGEL et al., 2006).

2.2 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são encontrados em associações com algas (HAWKSWORTH, 1988), briófitas (SCHULZ et al., 1993), pteridófitas (FISHER, 1996), coníferas (BERNSTEIN; CARROL, 1977; LEGAULT; DESSUREAULT; LAFLAMME, 1989), gramíneas (CLAY, 1988; ROSA et al., 2009), palmeiras (RODRIGUEZ, 1994; FROHLICH; HYDE, 1999), ervas (ROCHA et al., 2009), arbustos (PETRINE; STONE; CARROL, 1982) e árvores em geral (FAETH; HAMMON, 1997; MORALES-RONDÓN; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2006). Algumas espécies de endofíticos são mais frequentes em determinado tipo de vegetal, designadas dominantes, contraste com as consideradas mais raras, chamadas de secundárias ou singletos. Dentre as espécies comumente encontradas como endofíticas destacam-se principalmente espécies de Ascomycota (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os habitats das plantas constituem um ambiente dinâmico no qual muitos fatores afetam a frequência e composição de espécies das comunidades microbianas associadas. As comunidades endofíticas variam espacialmente no vegetal havendo diferença e especificidade de microbiota entre os diversos tecidos vegetais tais como raízes, caules, folhas, flores e frutos (NALINI et al., 2005; TEJESVI et al., 2005; GOND et al., 2007). Além disso, os micro-organismos endofíticos também são dependentes da interação com outros micro-organismos patogênicos e epifíticos (OSONO, 2007; SANTAMARIA; BAYMAN, 2005), sofrem

influência do ambiente (PIMENTEL, 2006; UNTERSEHER et al., 2007) e da idade do tecido vegetal (PHOTITA et al., 2001; VUJANOVIC; BRISSON, 2002).

A ocorrência de endofíticos parece variar de acordo com as condições climáticas. A maioria dos estudos descreve a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado, que se revela diferente das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997). No entanto, existem espécies de endofíticos cosmopolitas que ocorrem em ambientes temperados e tropicais isolados de vários hospedeiros, os quais pertencem aos gêneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma* e *Pleospora* (SURYANARAYANAN; WITTLINGER; FAETH, 2005; PIMENTEL et al., 2006).

Em ambientes áridos a colonização de endofíticos em plantas foi positivamente correlacionada com a umidade e precipitação (BILLS, 1996; FAETH; HAMMON, 1997). A precipitação de ambientes xerófilos pode ser sazonalmente abundante, prevendo períodos regulares em que as condições são favoráveis para a dispersão de esporos e, desta forma, ocorrência da infecção. Folhas de diversas plantas hospedeiras mesófilas têm demonstrado menor colonização de endofíticos na época da seca quando comparado com o período chuvoso (RODRIGUES, 1994, WILSON; CARROLL, 1994; SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998; SURYANARAYANAN; THENNARASAN, 2004). Segundo Suryanarayanan, Wittlinger e Faeth (2005) os resultados obtidos a partir da investigação dos fungos endofíticos associados a cactos do estado do Arizona (EUA), juntamente com os resultados do estudo preliminar de Fisher et al. (1994), sugerem que as plantas de zonas áridas são pobres em diversidade de fungos endofíticos e que alguns fungos cosmopolitas são presentes. Estes dados reforçam a hipótese de que a colonização de endofíticos pode depender mais da disponibilidade de inóculo das plantas em relação a localização geográfica das plantas hospedeiras (FISHER et al., 1994; SURYANARAYANAN; KUMARESAN, 2000). Além disso, a cutícula espessa e cerosa, a baixa frequência de estômatos e as adaptações para reduzir a transpiração e perda de água dos cactos podem representar barreiras adicionais que inibem a infecção por fungos parasitas, bem como a colonização de espécies de endofíticos resultando em menor diversidade (ZIMMERMANN; GRANATA, 2002; SURYANARAYANAN; WITTLINGER; FAETH, 2005).

A instalação de um micro-organismo endofítico no hospedeiro pode ocorrer de várias formas; ativamente pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a sua penetração ou por meio de aberturas naturais como estômatos, hidatódios, ferimentos (DOBEREINER et al., 1993) ou via raiz e sementes (HALLMANN et al., 1997). Além disso, névoas, chuvas e orvalho são importantes fontes de inóculos de esporos de fungos, os quais penetram os tecidos vegetais e colonizam as plantas como endofíticos nos estágios iniciais da planta (CARROL; CARROL, 1978; ARNOLD et al., 2003). A taxa de fungos endofíticos presentes no hospedeiro é maior quando maior for o regime de chuvas do local, maior isolamento do hospedeiro em relação a outras plantas e quanto mais velha forem as folhas (BERNSTEIN; CARROL, 1977, CARROL; CARROL, 1978, ARNOLD et al., 2003). No entanto, é importante ressaltar que as diferenças nos métodos de isolamento, incluindo a seleção de meios de cultivo, o tamanho dos fragmentos do tecido da planta hospedeiro, o tempo desde a colheita de tecido até o processamento das amostras, bem como as condições de cultura, podem influenciar nas conclusões sobre a frequência da infecção endofítica, bem como diversidade de fungos e composição de espécies (ARNOLD, 2007; SUN et al., 2011).

2.3 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS UTILIZANDO FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são conhecidos a mais de um século, mas somente nas duas últimas décadas despertaram interesse em decorrência do seu potencial biotecnológico (ARAÚJO et al., 2002). O acúmulo de informações dessa interação planta-endofítico tem tido uma atenção especial, uma vez que, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos, imunossuppressores, antitumorais, bem como metabólitos de interesse biotecnológico como enzimas, proteínas e polissacarídeos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003).

Fungos endofíticos podem conferir resistência à planta contra herbivoria por meio de dois mecanismos principais: (i) estímulo direto do vigor da planta e (ii) produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbivoria (CLAY; MARKS; CHEPLICK, 1993). Um levantamento feito por Azevedo et al. (2000) mostra a importância dos fungos endofíticos no controle de insetos que atacam plantas. Os fungos *Acremonium lolli*, *Balansia cyper*, *Cladosporium sphaerosperum* e *Phomopsis oblonga* são citados como produtores de

metabólitos capazes de proteger seu hospedeiro de ataques de insetos (AZEVEDO et al., 2000). Este fato se deve muitas vezes a produção de toxinas pelo endofítico, correlação feita pela primeira vez por Bacon et al. (1977), os quais estabeleceram uma ligação entre o endofítico *Epichloae typhi* e a toxicidade do hospedeiro, o que confere proteção ao vegetal. *Neotyphodium* é outro exemplo, um endofítico de *Festuca aerundinacea*, que beneficia seu hospedeiro aumentando a tolerância à seca (WHITE JR. et al., 2002), crescimento da raiz, produção de sementes, germinação, captação de fósforo e resistência a nematóides e insetos (PANACCIONE et al., 2001). O crescimento do vegetal também pode ser afetado pela presença de endofíticos, o que se deve em parte a produção de fitormônios e/ou pelos endofíticos serem capazes de aumentar a absorção de nutrientes como nitrogênio e fósforo pela planta (TAN; ZOU, 2001; BANDARA et al., 2006). No entanto, a produção de enzimas pelas plantas em resposta à colonização do endofítico pode ter um papel fundamental na limitação de crescimento do endófito e/ou patógeno e na virulência dos mesmos.

Alguns autores consideram ainda de grande importância a utilização de métodos e critérios que racionalizem a busca de fungos endofíticos em meio à miríade de espécies vegetais existentes no planeta (ARNOLD et al., 2000; TAN; ZOU, 2001; STROBEL, 2006). Neste sentido, algumas estratégias têm sido empregadas (STROBEL, 2003), tais como:

- (1) a escolha de plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns;
- (2) plantas que apresentam histórico etnobotânico conhecido, ou seja, que vêm sendo tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos, grupos étnicos e pela população de um modo geral;
- (3) plantas endêmicas;
- (4) plantas cujo desenvolvimento se dá em regiões de grande biodiversidade, tais como em florestas temperadas e tropicais.

Entre estas estratégias, a busca por plantas que apresentam histórico etnobotânico constitui uma escolha empregada por pesquisadores em todo o mundo. A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de fungos endofíticos obtidos de plantas medicinais, cujos metabólitos apresentaram atividade biológica. Neste contexto, é razoável supor que a atividade farmacológica atribuída a algumas espécies vegetais possa estar relacionada, de alguma forma, às substâncias produzidas por micro-organismos endofíticos (incluindo fungos) ou

pela planta em resposta a uma infecção (ARNOLD et al., 2000; FERRARA, 2006). Algumas vezes, os micro-organismos associados às plantas, são capazes de produzir substâncias com efeitos terapêuticos mais efetivos que as produzidas pelas plantas hospedeiras (STROBEL; LONG, 1998). Alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por endofíticos demonstraram que algumas linhagens são capazes de produzir os mesmos metabólitos produzidos pelas plantas hospedeiras. Um exemplo clássico disso consiste na obtenção do paclitaxel produzido por *Taxomyces andreanae* associado à planta *Taxus brevifolia* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). O fungo *Seimatoantlerium tapuiense* obtido de uma *Rubiaceae* (*Maguireothammus speciosus*) também produz paclitaxel, além de outros fungos endofíticos (STROBEL, 2002). Estes resultados apontam para novas fontes potenciais para a obtenção de paclitaxel e sugerem que este seja um metabólito de ocorrência comum em endofíticos (MOMESSO, 2008). Outros exemplos recentes são a produção do inibidor de síntese de RNA, a camptotecina, obtida do fungo endofítico *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005a), o anticancerígeno podofilotoxina, produzida pelos endofíticos *Phialocephala fortinii* e *P. hexandrum* (EYBERG et al., 2006), a vincristina (anticancerígeno) isolada a partir do fungo endofítico *Mycelia sterilla* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004), a produção de hipericina (KUSARI et al., 2008) com uma extensa variedade de atividades biológicas, por um fungo endofítico isolado de *Hypericum perforatum* (Figura 3). No entanto, os fungos endofíticos também são produtores de metabólitos secundários bioativos diferentes dos produzidos pelas plantas e com características estruturais únicas. Estes metabólitos são de interesse para utilização na medicina e agricultura. O fungo endofítico *Pestalotiopsis theae* (*Amphisphaeriaceae*), obtido a partir de ramos de uma planta não identificada na China, foi capaz de produzir quatro novos metabólitos nomeados como pestaloteol A-D, entre os quais o pestaloteol C inibiu a replicação do vírus HIV-1LAI em células C8166 com o valor de EC₅₀ de 16, 1 µM (LI et al. 2008). O metabólito enfumafungina (glicosídeo triterpeno) produzido pelo fungo endofítico *Hormonema* sp., obtido de folhas de *Juniperus communis* é um inibidor específico da síntese de 1,3 β glucana em células fúngicas com EC₅₀ de 0,07 µM sobre a proliferação de *Candida albicans* (ONISHI et al., 2000; PELÁEZ et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2000; GARCIA-EFFRON et al., 2009). Modificações estruturais do metabólito enfumafungina (Figura 4) resultaram no desenvolvimento do MK-3118, um metabólito semi-sintético de uso oral (inibidor da síntese de β-1,3-glucana) com atividade inibitória potente contra *C. albicans* (EC₅₀ de 0,6 ng /mL) e *Aspergillus fumigatus* (1,7 ng/mL). O MK-3118 vem sendo submetido a ensaios clínicos na fase I como o

primeiro medicamento oral inibidor da síntese de glucana para uso na terapia de infecções fúngicas (MOTYL et al., 2010).

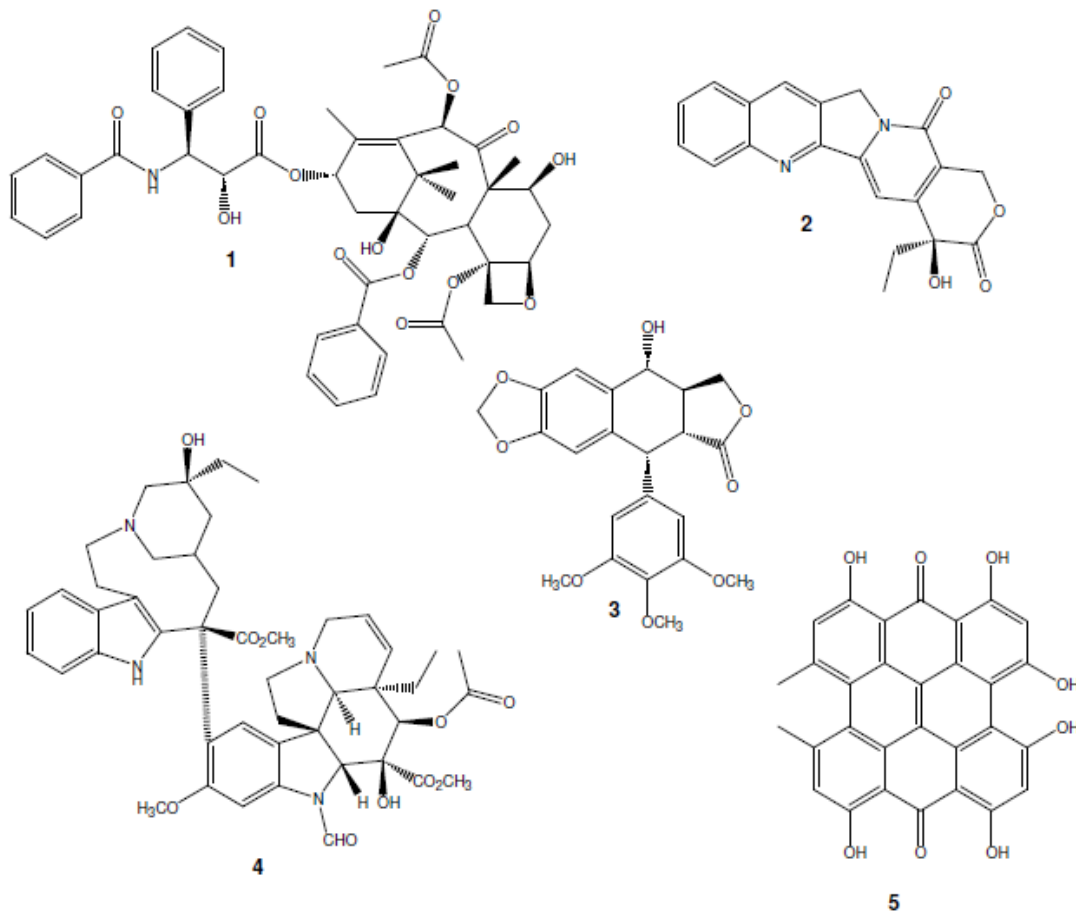


FIGURA 3 Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos: (1) paclitaxel, (2) camptotecina, (3) podofilotoxina, (4) vincristina e (5) hipericina. **Fonte:** MOMESSO, 2008.

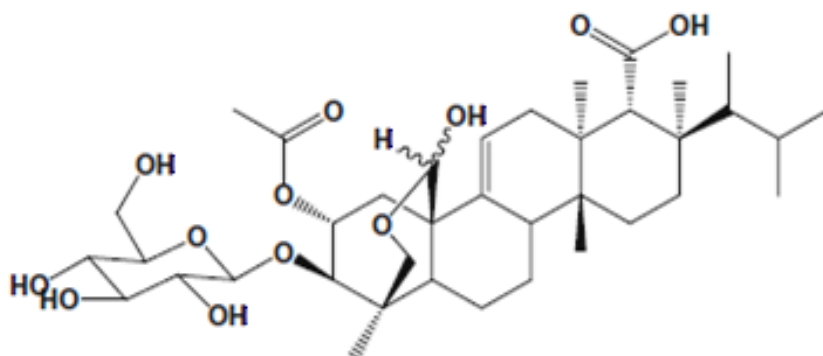


Figura 4 Metabólito secundário enfumafungina, com propriedades antifúngicas, produzido pelo fungo endofítico *Hormonema* sp. **Fonte:** ALY et al. (2011).

Kumar e Kaushik (2012) mostraram em sua revisão vários metabólitos biofungicidas (alcalóides, terpenóides, esteróides, isocumarinas e cromonas, fenólicos e voláteis) isolados e

caracterizados de fungos endofíticos, tais como: (i) o novo metabólito tetralona [(3S)-3,6,7-trihidroxi- α -tetralona] isolado de *Phoma* sp., que tem atividade antimicrobiana contra os fitopatôgenos *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* (OLIVEIRA et al., 2009), (ii) os metabólitos bioativos 7-hidroximeleina e orcinol (isolados de *Penicillium* sp., endofítico de *Alibertia macrophylla*), que têm atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cl. sphaerospermum* (OLIVEIRA et al, 2011) e (iii) os três metabólitos cladosporina, isocladosporina e 5'-hidroxiasperentina, isolados do fungo endofítico *Cladosporium cladosporioides*, com potencial como protótipo para o desenvolvimento de biopesticidas contra espécies de *Colletotrichum* e *Phomopsis* (WANG et al., 2013). Portanto, os fungos endofitos proporcionam uma fonte rica de muitos agentes agroquímicos, os quais podem ser utilizados como alternativa para substituir pesticidas sintéticos, considerando o aumento da incidência da resistência de fungos fitopatogênicos, e toxicidades potenciais para o ambiente e os mamíferos (KUMAR; KAUSHIK, 2012; WANG et al., 2013).

2.4 A FAMÍLIA CACTACEAE

2.4.1 Aspectos botânicos e distribuição geográfica

As Cactáceas constituem um grupo extremamente diversificado, com um impressionante conjunto de estratégias adaptativas, evolutivas e ecológicas que lhes conferem uma grande capacidade de desenvolvimento nos diferentes habitat (ALVES et al., 2008). Segundo Rizzini (1982), as espécies de *Cactaceae* que ocorrem no Brasil podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com o seu hábitat:

- i) silvícolas - que habitam florestas pluviais: amazônica e atlântica, com predominância de espécies epífitas;
- ii) savanícolas – ocorrem no cerrado;
- iii) campestres – ocorrem em campos rupestres de Minas Gerais;
- iv) litorâneas – ocorrem no litoral brasileiro;
- v) xerófilas – que ocorrem no bioma Caatinga, abrangendo o maior número de espécies.

As cactáceas encontram-se subdivididas em três subfamílias: *Pereskioideae*, *Opuntioideae* e *Cactoideae* (WALLACE, 1995). Recentemente foi proposta uma nova subfamília, *Mahiuenioideae* (SOUZA; LORENZI, 2005). Cronquist (1988) observou *Cactaceae* como uma das poucas grandes famílias das dicotiledôneas com claro significado ecogeográfico. A família é endêmica para o Novo Mundo distribuída desde o Canadá até a Patagônia, sendo mais freqüente nas zonas climáticas áridas entre 35°N e S de latitude, mas conspicuamente ausente da Região Amazônica (BARTHLOTT, 1979; BOYLE; ANDERSON, 2002; TAYLOR; ZAPPI, 2004), com exceção de três subespécies de *Rhipsalis baccifera* (Muell.): *Rhipsalis baccifera* subsp. *mauritima*, subsp. *erythrocarpa* e subsp. *horrida*, encontradas no Velho Mundo (MAXWELL, 1998, 1999). Três gêneros ocorrem nas Ilhas Galápagos no pacífico, e uma espécie endêmica de *Cereus* (Mill.) ocorre nos penhascos de rochas vulcânicas de Fernando de Noronha no Atlântico leste da costa nordeste do Brasil (BARTHLOTT, 1979).

Dos três centros geográficos de diversidade e endemismo que são reconhecidos para *Cactaceae*, o primeiro compreende o México e sudoeste dos Estados Unidos, onde ocorrem 50 gêneros e 550 espécies (HUNT, 1999) e estima-se que 73% dos gêneros e 78% das espécies são endêmicas (HERNÁNDEZ; GODÍNEZ, 1994). Esta diversidade corresponde a ¼ dos gêneros descritos para *Cactaceae* (aceitos pela IOS – International Organization for Succulent Plant Research) e com ⅓ destas espécies endêmicas (HERNÁNDEZ; GINDÍNEZ, 1994; TAYLOR, 1997; BOYLE; ANDERSON, 2002), com relevante destaque para as 160 espécies do gênero *Mammillaria* (Haw.) para o México, das quais 94% são endêmicas (HERNÁNDEZ; GODÍNEZ, 1994). O segundo centro de concentração da diversidade de *Cactaceae* é localizado na porção central dos Andes na América do Sul (Peru, Bolívia, nordeste do Chile e da Argentina) e o terceiro centro está em grande parte restrita ao nordeste brasileiro e desta forma, aos domínios morfoclimáticos do bioma Caatinga, onde ocorrem aproximadamente 40 gêneros e 200 espécies, destas 76% são endêmicas (TAYLOR; ZAPPI, 2004; SOUZA; LORENZI, 2005).

2.4.1.1 O gênero *Melocactus* (Link & Otto)

O gênero *Melocactus* tem como centro de diversidade proposto o estado da Bahia no nordeste do Brasil; entretanto, encontra-se distribuído desde as restingas litorâneas do estado do Rio de Janeiro, passando pelos estados do Nordeste do Brasil e chegando até o México e

lhas do Caribe (TAYLOR, 1991). Esta ampla distribuição e diversidade são marcadas por endemismos oriundos provavelmente por áreas vicariantes. Para o gênero *Melocactus* constituído de um total de 36 espécies (ANDERSON, 2001), 14 são encontradas na Bahia, das quais 11 são endêmicas (TAYLOR, 2000) e 12 subespécies apresentando algum grau de ameaça: *M. conoideus*, *M. deinacanthus*, *M. glaucescens*, *M. paucispinus*, *M. pachyacanthus* subsp. *pachyacanthus*, *M. azureus* subsp. *ferreophilus*, *M. azureus* subsp. *azureus*, *M. violaceus* subsp. *margaritaceus*, *M. violaceus* subsp. *ritteri*, *M. violaceus* subsp. *violaceus*, *M. pachyacanthus* subsp. *viridis*, *M. lanssensianus* (IUCN, 2012).

Espécies de *Melocactus* apresentam um cefálio terminal como característica marcante do gênero. Para algumas espécies o cefálio pode determinar o fim do crescimento em altura das estruturas vegetativas, desta forma este tipo de cefálio é classificado como terminal (TAYLOR, 1991). Diferentemente das espécies de cactos colunares (como *Ferocactus acanthodes* e *Carnegiea gigantea*), onde o crescimento em altura vegetativa é determinante da idade da planta (JORDAN; NOBEL, 1982; NOBEL, 1988; PIERSON; TURNER, 1998), o gênero *Melocactus* apresenta a altura do cefálio como indicativo da idade da planta (TAYLOR, 1991) e estrutura etária populacional da fase adulta (TAYLOR, 1991; HUGHES, 2011).

A espécie *Melocactus ernestii* Vaupel (Figura 5), endêmica do semi-árido brasileiro, compreende dentro do gênero a maior amplitude de distribuição geográfica, ocorrendo desde o NE de Minas Gerais até os Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba, com disjunções em inselbergs gnáissicos e rochas cristalinas e areníticas. A amplitude de distribuição geográfica na qual a espécie *M. ernestii* se encontra é composta de nichos e gradientes ambientais distintos, mas com predomínio de ambientes com precipitação média anual de 1.000 mm (TAYLOR; ZAPPI, 2004).

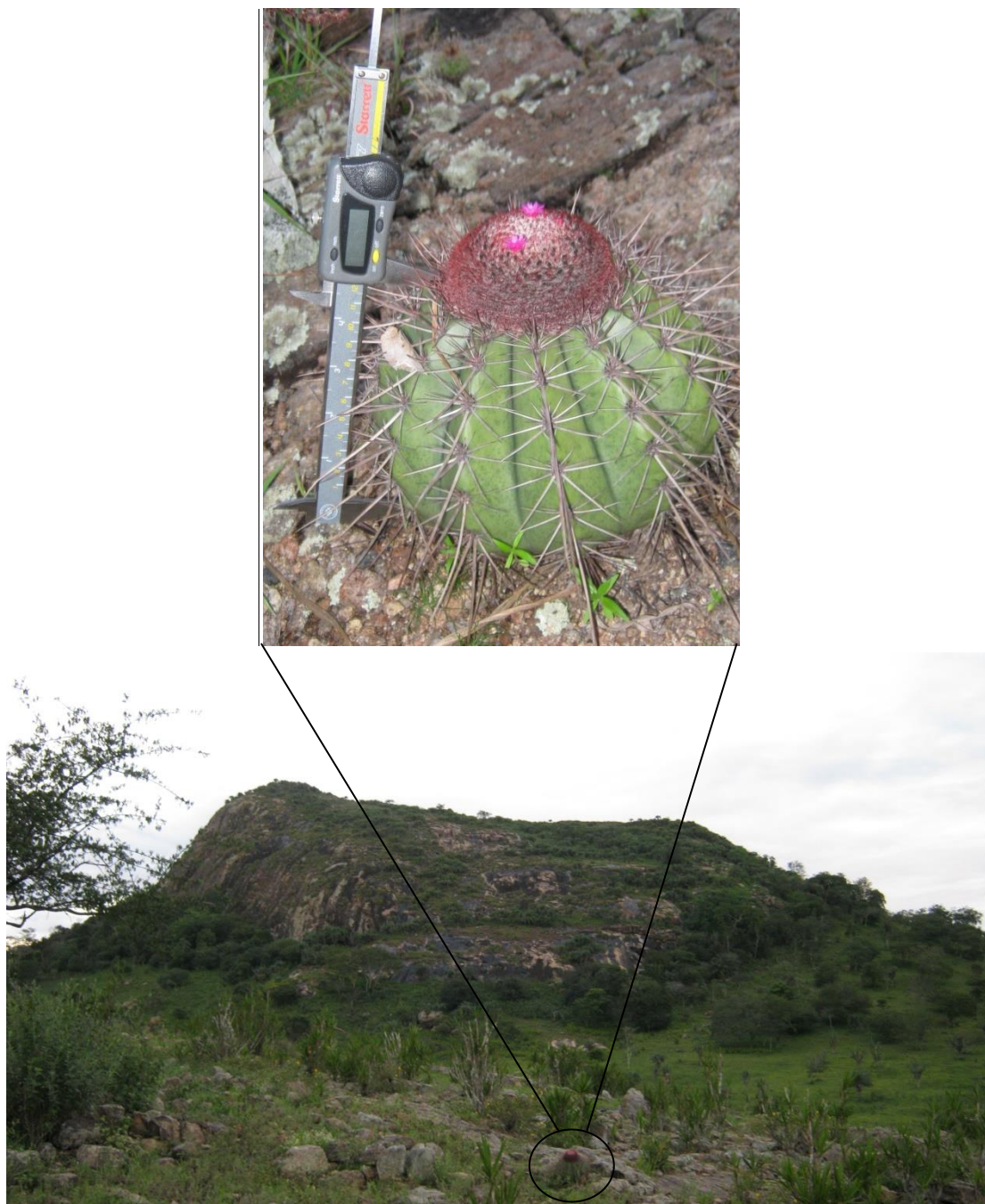


Figura 5 *Melocactus ernestii* sobre afloramento rochoso no município de Ipirá - Bahia (Fotos: Frederic M. Hughes).

2.4.1.2 O gênero *Opuntia* (*Opuntioideae*; Stevens 2001–2008).

O gênero *Opuntia*, incluído em *Opuntioideae*, é representado por cerca de 2300 espécies xerófitas e nativo das Américas ocorrendo desde o Canadá até o extremo sul da América do Sul, mas com maior diversidade no México (POWELL; WEEDIN, 2004; DE-FELICE, 2004). Essas espécies também conhecidas popularmente como opúntias, nopaleas ou palmas-forrageiras são perenes e possuem caules planos e podem ser prostradas ou eretas e

até mesmo formar pequenas árvores, geralmente, produzem muitos frutos com sementes abundantes e são facilmente propagados por fragmentos de caule. Muitas espécies se desarticulam facilmente nos nós, um mecanismo comum e eficiente de multiplicação clonal (BENSON, 1982; REBMAN; PINKAVA, 2001).

A taxonomia do gênero *Opuntia* nunca foi bem resolvida, pelos seguintes motivos: (i) apresentam extrema plasticidade fenotípica, e são pobremente estudadas ecologicamente; (ii) são potencialmente capazes de formar híbridos com caracteres intermediários entre táxons bem definidos; (iii) e numerosos caracteres morfológicos, são difíceis de preservar em herbários (MAJURE; ERVIN, 2007). No entanto, as opúntias apresentam uma morfologia característica, como resultado de adaptações xerofíticas onde, geralmente, há a presença de cutículas e cera, que reduzem a quantidade de água perdida por transpiração; folhas modificadas em forma espinhos e gloquídeos que diminuem a área da superfície da planta, taxa de transpiração e os efeitos termoregulatórios; rápido crescimento das raízes e sistemas de raízes rasas que maximizam a absorção de água quando longos períodos de seca são quebradas pela chuva (LEWIS, 1977; NOBEL, 1978, 1983; POWELL; WEEDIN, 2004; MAUSETH, 2006; MAJURE et al., 2010).

Dentre as espécies do gênero, a *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. (Figura 6) é um dos cactos mais tolerantes ao frio (até -24°C), provavelmente originado no sudoeste dos Estados Unidos e norte do México e então dispersado do leste para o sudoeste dos Estados Unidos (NOBEL, 1996; LARGAY; SNEDDON, 2009; MAJURE et al., 2010). É comumente conhecido como “figo-do-inferno” e “língua do diabo” e tem se destacado como uma das mais estudadas, utilizadas e difundida especialmente na América do Norte e Central e no Mediterrâneo, devido ao seu uso como planta ornamental, fonte de frutos e caules, forragem e medicinal (NOBEL, 1996; STINTZING; CARLE, 2005). Na Coreia *O. humifusa* é cultivada em larga escala por resistir ao inverno coreano, onde as temperaturas são abaixo de -20°C , enquanto a maioria das outras espécies de cactos cresce somente em regiões tropicais (GOLDSTEIN; NOBEL, 1994).

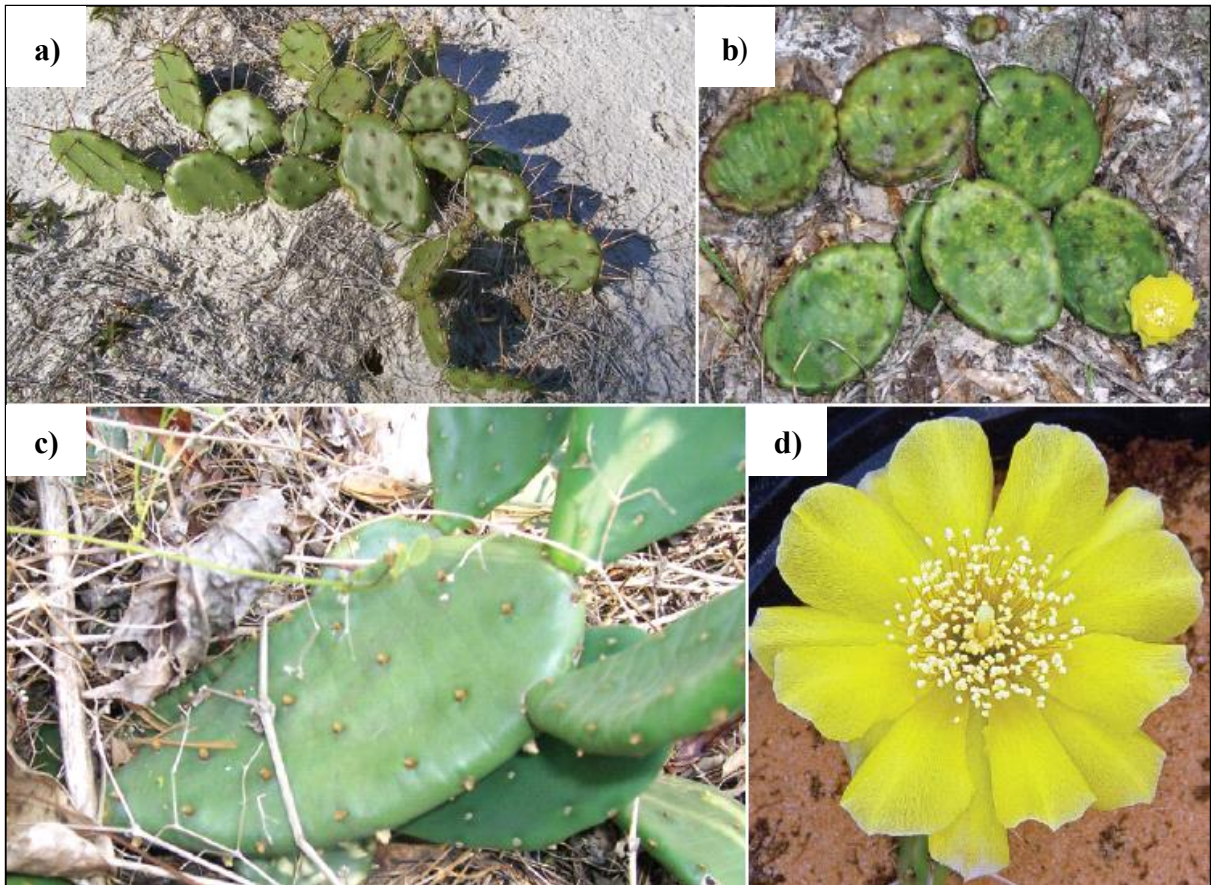


Figura 6 *Opuntia humifusa*: com (a) e sem espinhos (b), gloquídeos (c) e flor (d). **Fonte:** MAJURE; ERVIN, (2008).

2.4.2 Utilização na medicinal tradicional da família *Cactaceae*

As cactáceas são vegetais amplamente utilizados na medicina tradicional por curandeiros e tribos indígenas no México, como analgésicos, antibióticos, diuréticos, para tratar problemas intestinais, tosses, afecções cardíacas e nervosas, úlceras e também são utilizadas para controlar diabetes e colesterol (HOLLIS; SHEINVAR, 1995). Os chineses curavam abscessos com a polpa da planta e os indianos usavam o fruto como alimentos e também xarope para tratar tosse e asma. Na Itália, as flores têm servido como um diurético. Um chá é preparado a partir das flores de cactos para tratar colite. Em Israel, pesquisadores descobriram que as flores secas podem ser utilizadas para tratar o aumento da próstata (NEFZAQUI; NAZARENO; MOURID, 2008).

As opúntias têm sido amplamente utilizadas como medicinal em zonas áridas do mundo, tais como regiões do Brasil, México, Ásia Ocidental e África (INGLESE et al., 2002; NEFZAQUI; SALEM, 2002; MAJURE; ERVIN, 2008). Barbera et al. (1999) descreveram o uso medicinal do gênero *Opuntia* no México para tratamentos relacionados a diabetes,

diarreia, obesidade e inflamação. Além destes usos, a literatura também cita a raiz de *O. fulgida* no tratamento de diarreias, os cladódios de *O. fuliginosa* e *O. streptacantha* para o tratamento da gastrite, fadiga, dificuldade respiratória e lesão hepática após uso abusivo de álcool; já os cladódios de *O. humifusa* são utilizados no tratamento de feridas, verrugas e doenças pulmonares (LEWIS, 1977; FOSTER; DUKE, 2000; SHAPIRO; GONG, 2002).

No Brasil vários estudos citam a utilização de cactáceas com propriedades terapêuticas Agra et al. (1996), Mota (1997), Costa-Neto; Moraes (2000), Guerreiro et al. (2000), Tourinho (2000) e Andrade (2002) (Tabela 1). Andrade (2002) reuniu informações sobre a utilização de cactáceas com propriedades medicinais por meio de um levantamento em alguns municípios do semi-árido Baiano. Neste trabalho foram mencionados 21 problemas de saúde, que são tratáveis com cactos, dentre eles se destacam: inflamação na vaginal, uretra e no útero, infecção urinária, gripe, rendidura (reumatismo), engasgo, ressecamento e barriga inchada (constipação), coluna (doenças vertebrais), sífilis, distúrbios renais e digestivos, “estrepe” que é inflamação nos dedos das mãos ou dos pés por uma ponta de pau, cólica, doença do tempo (envelhecimento) e disenteria.

Tabela 2 Utilização terapêutica das espécies da família *Cactaceae* no Brasil.

Espécie	Parte da planta	Uso terapêutico	Referência
<i>Cereus jamacaru</i>	chá da raiz	Inflamação na vagina, no útero e uretra, hemorroidas, gripe, sífilis, distúrbios renais, digestivos, respiratórios e hepáticos, e doenças vertebrais	Agra et al. (1996, 2007), Tourinho (2000) e Andrade (2002)
	Espinho	Inflamação nos dedos das mãos ou dos pés por uma ponta de pau ("estrepe")	Andrade (2002)
	Caule	Distúrbios renais, febre, no controle do colesterol alto, úlceras estomacais, sífilis, vermífugo, cicatrizante, antitumoral de origem glandular, cardiotônico, anti-inflamatório, e doenças vertebrais	Correa (1969), Gomes (1972), Lima (1996), Albuquerque e Andrade (2002), Andrade et al. (2006a,b), Magalhães (2006), Agra et al. (2007).
<i>Cereus</i> sp.	chá do cladódio	Febre	Mota (1997)
	caule macerado	Febre, problemas intestinais e constipação (intestino preso)	Mota (1997)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	mucilagem do cladódio	Engasgo, inflamação, reumatismo ("rendidura") e constipação ("ressecamento" e "barriga inchada")	Andrade (2002)
	chá do cladódio	Dor gastro-intestinal	Andrade (2002)
	chá da raiz	Inflamação na vagina e no útero, infecção urinária e gripe	Andrade (2002)
<i>Opuntia palmadora</i>	chá da raiz	Inflamação na uretra	Andrade (2002)
<i>Opuntia</i> sp.	mucilagem do cladódio	Tumor	Andrade (2002)
<i>Melocactus</i> sp.	chá do cladódio	Cólicas e distúrbios no intestino	Andrade (2002)
	xarope do cladódio	Gripe e pneumonia	Andrade (2002)
<i>Melocactus zehntneri</i>	xarope do cladódio	Tosse e bronquite	Agra et al. (1996)
	suco da polpa	Debilidades físicas	Agra et al. (1996)
<i>Harrisia adscendens</i>	chá da raiz	Doenças vertebrais	Guerreiro et al. (2000)
<i>Pilosocereus catiingicola</i>	Cladódio	Verme	Guerreiro et al. (2000)

2.4.3 Propriedades terapêuticas da família *Cactaceae*

Opuntia tem sido o gênero mais estudado na área da farmacologia para *Cactaceae*. Alguns autores relacionam propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória, antidiurética e antitumoral de extratos de frutos, flores e, principalmente, cladódios de *Opuntia* (AHMAD et al., 1996; BERGAOUI et al. 2007; PARK et al. 1998, 2001; GALATI et al. 2001, 2003; ZOU et al., 2005). Em *O. streptacantha* foi detectada a presença de propriedades antivirais contra os vírus de DNA, como herpes e vírus de RNA, tais como a gripe tipo A e vírus da imunodeficiência humana (HIV). O princípio ativo foi localizado no tecido exterior do cladódio e atribuído a uma proteína com mecanismos de ação desconhecido (AHMAD et al., 1996). Bergaoui et al. (2007) estudaram a composição química e atividade antifúngica de metabólitos voláteis obtidos das folhas, flores e frutos de *O. lindheimeri* var. *linguiformis* (L. Benson), folhas e flores de *O. macrorhiza* (Engelm) e folhas de *O. microdasys* (Lehmann) localizadas na Tunísia. Esses extratos voláteis foram testados contra os fungos *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium axysporum*, *Pythium ultiman* e *Rhizoctonia solani* e um forte efeito inibitório dos extratos voláteis das três espécies foi observado contra *A. solani* (BERGAOUI et al., 2007). Lee, Kim e Lee (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações de *O. humifusa* e a fração com acetato de etila (700 ppm) exibiu forte inibição contra cinco bactérias: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas fluorescens*.

Yoon et al. (2009) demonstraram que a fração aquosa dos frutos de *O. humifusa* inibe a proliferação de células MCF-7, linhagem do câncer de mama em humanos. Hahm et al. (2010) demonstraram que extratos de *O. humifusa* inibiram a proliferação de células de glioblastoma humano (U87MG) por meio da detenção do ciclo celular na fase G1, enquanto Kim et al. (2013) mostraram que células do câncer de cólon (SW480) são susceptíveis aos metabólitos bioativos presentes no extrato de *O. humifusa* e que este extrato pode ter potencial na prevenção do câncer através da modulação de marcadores de apoptose e inibição de vias inflamatórias.

Galati et al. (2003) constataram que o nível de colesterol (LDL) e triglicérides em ratos foram fortemente reduzidos após 30 dias de uma administração diária (1 g/kg) de cladódios de *O. ficus-indica* liofilizados. O trabalho de Ennouri et al. (2005) demonstrou que

o óleo de sementes de *O. ficus-indica* também diminui o colesterol plasmático LDL (colesterol VLDL) em ratos, sem qualquer efeito sobre concentrações de HDL-colesterol.

Outra espécie estudada foi *Cereus jamacaru*, o extrato hidro-etanólico de *C. jamacaru* apresentou inibição tumoral evidente sobre tumores induzidos (Sarcoma 180) em camundongos (SOUZA et al., 2001). Silveira et al. (2006) verificaram que em concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg do extrato etanólico de *C. jamacaru* não provocou nenhuma alteração hematológica quando administrado nos quatro primeiros dias da gestação das ratas Wistar.

2.4.4 Fungos endofíticos associados à espécies da família *Cactaceae*

Até o momento existem poucas informações sobre fungos endofíticos associados à *Cactaceae*. Apenas quatro trabalhos foram encontrados na literatura até o momento (FISHER et al., 1994; SURYANARAYANAN et al. 2005; BEZERRA et al., 2012, 2013). Fisher et al. (1994) realizaram um estudo preliminar relatando a ocorrência de endofíticos em *Opuntia stricta* coletada de regiões semi-áridas da Austrália. Estes endofíticos foram obtidos a partir do caule de quatro plantas em quatro locais distintos na Austrália e um total de 23 táxons foram obtidos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Ascochyta*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Coniella*, *Coniothyrium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geniculosporium*, *Leptosphaeria*, *Nigrospora*, *Nodulisporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Sardaria*. A maioria dos táxons inclui espécies cosmopolitas e apenas *Coniothyrium opuntiae* e *Phomopsis cacti* foram sugeridos como colonizadores específicos.

Suryanarayanan et al. (2005) detectaram a presença de fungos endofíticos em 21 espécies de cactos representados pelos gêneros *Carnegiea*, *Consolea*, *Cylindropuntia*, *Echinocereus*, *Mammillaria* e *Opuntia* que ocorrem em várias localidades do Arizona, EUA. Os 900 isolados endofíticos obtidos representaram 22 espécies de fungos e *Alternaria* sp., *Aureobasidium pullulans* e *Phoma* spp. foram obtidos das cactáceas avaliadas. Neste estudo, a diversidade de endofíticos foi considerada baixa e não foi observada especificidade do hospedeiro entre os endofíticos; entretanto, as frequências de colonização das poucas espécies de endofíticos foram consideradas altas e comparáveis às descritas para os colonizadores de plantas tropicais. Espécies de *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* comumente obtidos como endofíticos de plantas de habitats “moderadamente úmido” estiveram ausentes nos cactos estudados (SURYANARAYANAN et al., 2005).

Bezerra et al. (2012) estudaram a riqueza de fungos endofíticos associados à *Opuntia ficus-indica* na região semi-árida (Caatinga) do Brasil. Neste estudo foram isolados 44 endofíticos identificados como táxons gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monodictys*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Tetraploa* e *Xylaria*. As espécies mais comumente encontradas foram *Cladosporium cladosporioides* (43%) e *Cl. sphaerospermum* (15,99%); *Acremonium terricola*, *Monodictys castaneae*, *Penicillium glandicola*, *Phoma tropica* e *Tetraploa aristata* foram relatadas pela primeira vez como fungos endofíticos para o Brasil. Bezerra et al. (2013) também exploraram riqueza e estimaram a frequência de espécies do cacto *Cereus jamacaru* também na região semi-árida (Caatinga) do Brasil. Foram identificados 59 táxons, sendo *Cladosporium cladosporioides* e *Fusarium oxysporum* as espécies mais frequentes, seguidas de *Acremonium implicatum*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma viride*, *Chrysonilia sitophila* e *Aspergillus flavus*. Quarenta e sete espécies foram relatadas pela primeira vez como endofíticos para *Cactaceae* e 18 como fungos endofíticos para o Brasil. Como reportado por Suryanarayanan et al. (2005) as espécies *Colletotrichum* e *Phyllosticta* comumente reportadas como fungos endofíticos não foram isoladas de *Opuntia ficus-indica* e *Cereus jamacaru*.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diversidade de fungos endofíticos associados aos cactos *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa* presentes em ecossistemas do Brasil e Estados Unidos, respectivamente, bem como estudar estes micro-organismos como fonte de metabólitos antimicrobianos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e isolar fungos endofíticos presentes nas raízes, espinhos e cladódios de *Melocactus ernestii* e dos cladódios de *Opuntia humifusa*;
- Depositar todos os isolados de *M. ernestii* na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG para preservação *ex situ* da biodiversidade de fungos tropicais;
- Identificar os fungos endofíticos por meio de técnicas morfológicas e moleculares;
- Realizar análises de diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às plantas hospedeiras;
- Preparar os extratos de todos os fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras;
- Avaliar todos os extratos obtidos por meio de ensaios antimicrobianos;
- Isolar e elucidar quimicamente os metabólitos antimicrobianos produzidos pelos fungos endofíticos selecionados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETAS DO MATERIAL BOTÂNICO

Neste trabalho foram selecionadas duas espécies de cactos para isolamento dos fungos endofíticos. *Melocactus ernestii* foi coletada no Brasil e *Opuntia humifusa* nos Estados Unidos da América. As coletas referentes à espécie *M. ernestii* foram realizadas nos municípios de Pedra Azul, no dia 04 de julho de 2010, em Minas Gerais (15°59'29"S, 41°18'17,6"W) e Ipirá, no dia 25 de abril de 2011, na Bahia (12°11'04"S, 39°28'16"W). Em cada área foram coletadas raízes, espinhos e cladódios de 30 indivíduos aparentemente sadios. Uma exsicata representativa do material vegetal das duas localidades (Pedra Azul e Ipirá) foi depositada no herbário BHCB da UFMG e registrados com os números 141490 e 154338, respectivamente. As coletas de *O. humifusa* foram realizadas em duas áreas: sítio 1 (N36.86140 W90.95036) e sítio 2 (N36.91370 W89.53330), no dia 6 de julho de 2012, ambos no estado do Missouri, neste caso, cladódios foram coletados de 18 indivíduos em cada sítio, totalizando 36 indivíduos. Todo o material foi estocado em sacos plásticos a 10°C e processados em até 24 horas para o isolamento dos fungos endofíticos.

4.2 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Todo material coletado foi processado, lavado com água e detergente neutro, com auxílio de uma esponja para a remoção dos micro-organismos epifíticos e outros contaminantes. Em seguida, o material foi imerso em etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2%, por 3 minutos, e por último em água destilada esterilizada por no mínimo 2 minutos. Após a desinfecção superficial, cinco fragmentos (aproximadamente 0,5 cm) da raiz, cladódio e espinho de cada indivíduo foram plaqueados em meio Ágar batata dextrose (BDA, 20% batata, 2% glicose, 2% ágar) e em meio Ágar extrato de malte (AEM, 2% extrato de malte e 2% ágar), ambos acrescidos de cloranfenicol (200 mg/mL), para tecidos de *O. humifusa* foi utilizado somente o meio de cultura BDA, e em seguida as placas foram incubadas a 28°C. Como controle, após o processo de desinfestação, foi inoculado 0,1 mL da última água destilada esterilizada, em três placas de Petri com BDA. As placas permaneceram incubadas nas mesmas condições do isolamento. Diariamente as placas foram monitoradas quanto ao crescimento dos fungos, durante 60 dias de incubação.

Os fungos filamentosos foram armazenados em triplicata, em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967) e em glicerol 15% a - 80°C. As leveduras foram purificadas utilizando o meio ágar Sabouraud (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona

1% e ágar 2%). Para a criopreservação, as culturas puras foram inoculadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e de fosfato de sódio 0,2%) a 28°C, sob rotação (200 rpm), após o período de 24 horas foi acrescido de 15% glicerol e depositado no ultrafreezer a -80°C. Os fungos preservados obtidos de *M. ernestii* foram depositados na coleção de Cultura do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMGCB).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

As leveduras foram agrupadas de acordo com as características macromorfológicas das colônias (cor, tamanho, borda, forma, aspecto e textura). As colônias dos fungos filamentosos foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Os grupos de isolados de leveduras e fungos filamentosos foram submetidos à análise molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se o iniciador GTG₅, de acordo com Lieckfeldt et al. (1993). Com base no perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR com o iniciador GTG₅, um isolado dentre os que apresentaram um mesmo padrão de bandas foi selecionado para sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores NL1 e NL4, para as leveduras, e para sequenciamento para da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do DNA ribossomal, do gene do fator de alongamento (TEF1) e o gene da β-butulina para os fungos filamentosos.

4.3.1 Extração do DNA total

4.3.1.1 Leveduras e fungos filamentosos obtidos de *Melocactus ernestii*

O DNA genômico dos isolados de leveduras foi extraído segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1986), com modificações. Os isolados de leveduras foram crescidos em Agar Sabouraud por 24 horas a 25°C. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL Tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 10%), agitado em vórtex e aquecido a 65°C por 30 minutos. Após esta etapa, foi adicionado 200 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) e homogeneizou-se por inversão. Em seguida, centrifugou-se a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. Transferiu-se a fase superior para

novo tubo e para a precipitação do DNA foi utilizado foi adicionado 100 µL de isopropanol e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. O DNA foi lavado com 200 µL de álcool 70% e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. A amostra foi seca por aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente, dissolvido em 100 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM).

A extração de DNA dos fungos filamentosos foi realizada conforme Rosa et al. (2009), sendo o DNA extraído a partir de micélio produzido em 5 mL de meio líquido (extrato de malte, 2%). Os micélios foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%) e 3 esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro) e posteriormente submetidos a trituração no equipamento Bullet Blender™ 24 (Uniscience). Os tubos foram acrescidos 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60°C em banho-maria. Após essa etapa, foram adicionados 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos a 65°C. Em seguida, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). Após homogeneização, o tubo será incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0°C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado 50% do volume de isopropanol e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% p/v e a suspensão foi cuidadosamente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 15 minutos, 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) foram adicionados e a mesma será incubada a 65°C por 60 minutos para hidratação do DNA. Os produtos obtidos de leveduras e fungos filamentosos foram quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies) e estocados a -20°C até sua utilização.

4.3.1.2 Leveduras e fungos filamentosos obtidos de *Opuntia humifusa*

O DNA dos isolados foi extraído utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), com modificações na lise das células (FREDLUND et al.; 2008). Os produtos

obtidos de leveduras e fungos filamentosos foram quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies) e estocados a -20°C até sua utilização.

4.3.2 Obtenção dos amplicons

4.3.2.1 Amplificação utilizando o iniciador GTG₅

As reações de amplificação foram feitas para volume final de 25 µL contendo 2,0 µL de DNA (50-100 ng), 2,0 µL do iniciador GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') 10 µmol.L⁻¹, 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,1 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf). O programa consistiu de desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguidos de extensão final a 72°C por seis minutos. Após as reações de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Eurobio) a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5% (TBE – 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

4.3.2.2 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

Dentre as leveduras que apresentarem perfis moleculares distintos, um isolado foi selecionado para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') segundo Lachance et al. (1999). A reação de PCR será realizada em um volume final de 50 µL contendo: 2,0 µL de DNA (100 ng), 1,0 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol.L⁻¹, 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.3.2.3 Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4

Os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White et al. (1990) (Figura 5). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 2,0 µL de DNA (100 ng), 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol.L⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl₂ 25mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

4.3.2.4 Amplificação utilizando os iniciadores EF1-728F e EF1-986R

Os iniciadores EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') e EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') foram utilizados para amplificação do gene do fator de alongamento, conforme descrito por Carbone e Kohn (1999). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 2,0 µL de DNA (100 ng), 1,0 µL de cada iniciador EF1-728F e EF1-986R 10 µmol.L⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 56°C e 30 segundos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 7 minutos a 72°C.

4.3.2.5 Amplificação utilizando os iniciadores β-butulina

Os iniciadores T1- BT2b, T1 (5'- AACATGCGTGAGATTGTAAGT - 3') e BT2b (5' - ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC - 3') foram utilizados para amplificação do gene da β -butulina, conforme descrito por Glass e Donaldson (1995). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo 2,0 μ L de DNA (100 ng), 1,0 μ L de cada iniciador EF1-728F e EF1-986R 10 μ mol.L⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,3 μ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 59°C e 90 segundos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 7 minutos a 72°C.

Todos os produtos de PCR (ITS1-ITS4, EF1-728F - EF1-986R e T1- BT2b) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

4.3.3 Purificação dos amplicons

Os amplicons oriundos de fungos endofíticos isolados de *M. ernetii* foram purificados utilizando Etanol-EDTA. Ao produto de PCR (45 μ L) foi adicionado 11,25 μ L de EDTA 125 mM e 135 μ L de etanol absoluto, que foi homogeneizado e mantido à 25°C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.000 r.p.m. por 25 minutos e o sobrenadante foi retirado e descartado. A seguir, foram adicionados 120 μ L de etanol 70% e o tubo foi centrifugado a 13.000 r.p.m. por 10 minutos e o etanol retirado. O tubo foi deixado à temperatura ambiente por 90 minutos para evaporação do resíduo de etanol. Foram adicionados 10 μ L de água ultrapura. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37°C por 40 minutos. O produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies) e ajustado para concentração de 100 ng/ μ L para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

Os produtos de PCR oriundos de fungos endofíticos isolados de *O. humifusa* foram purificados utilizando o Kit de purificação de PCR QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia, CA). O produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies) e ajustado para concentração de 10 ng/ μ L para ser utilizado nas reações de

sequenciamento, o qual foi realizado em um aparelho modelo ABI 3730XL, Applied Biosystems (Foster City, CA).

4.3.4 Sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons foram realizadas utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 μL , em que foram colocados: 1 μL do iniciador a ($5 \mu\text{mol}^{-1}$), 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 a 5 μL de DNA (de modo que a reação final contenha entre 5 e 20 ng) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36°C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96°C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50°C e 4 minutos de extensão final a 60°C .

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 μL de EDTA a 125 mM, 1 μL de acetato de amônio e 50 μL de etanol 96% (Merck), em cada poço. A placa foi submetida ao vortex brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 r.p.m à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 r.p.m à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foi acrescentado 10 μL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi armazenada a 4°C , protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

4.3.5 Análise computacional das sequências

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequencias senso e/ou antisense de cada amostra foram submetidos ao aplicativo Phred online em [HTTP://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/](http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/) para avaliação da qualidade das bases dos mesmos, sendo utilizadas apenas as posições com escore maior do que 20, ou seja, menos de um erro a cada 100 bases sequenciadas. A seguir, os cromatogramas foram conferidos

manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (® 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas.

As sequências finais de DNA foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology. De acordo com Gazis et al. (2011), sequências obtidas a partir da região ITS podem apresentar problemas na identificação de alguns táxons pertencentes ao filo *Ascomycota*. Por esta razão, os seguintes critérios foram utilizados para interpretação das sequências obtidas em comparação às sequências de fungos depositadas no GenBank: para as sequências com identidade \geq a 99%, os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade de 98%, os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero, mas entre o gênero e o epíteto específico empregou-se c.f (c.f. é uma abreviação do termo latino “compare com”); e sequências com identidade entre 95 e 97%, somente o gênero foi aceito; para sequências com identidade $<$ 95% os isolados foram identificados como espécies desconhecidas ou identificados em família, classe ou ordem (GODINHO et al., 2013). Informações sobre os níveis taxonômicos dos fungos foram obtidas nos bancos de dados MycoBank (www.mycobank.org) e Index Fungorum (www.indexfungorum.org).

4.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o método MUSCLE (EDGAR, 2004) com ajustes manuais para a melhoria visual, onde necessário, no programa Mega Versão 5.2 (TAMURA et al., 2011). O alinhamento para cada gênero estudado foi preparado incluindo sequências de linhagens tipo, de coleções de cultura e/ou publicada em jornais indexados obtidas do GenBank para aumentar a acurácia das identificações. Para cada região ITS1-5.8S-ITS2, TEF1, β -butulina e análise combinada do gênero *Diaporthe*, árvores filogenéticas foram construídas utilizando análises de Máxima Parcimônia pelo modo de busca heurística no PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2001) com adição de 100 replicas de sequências aleatórias e tree-bisection-reconnection (TBR) como algoritmo de rearranjo. Para limitar o esforço computacional, o número máximo de árvores salvas foi de 75.000. Todos os estados de caráter foram tratados como desordenados e com mesmo peso. Gaps foram tratados como quinta base. O suporte dos ramos foi avaliado como porcentagem de *bootstrap* (BP) a partir de 1.000 repetições de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Para análise

combinada do gênero *Diaporthe* também foram contruídas árvores por meio da inferência Bayesiana usando cadeias de Markov aliada a simulações de Monte Carlo (MCMC) realizada no programa MrBayes 3.1.2. (HUELSENBECK; RONQUIST, 2003). Quatro MCMC foram executadas simultâneamente, com mais de 2.000.000 gerações, usando aleatoriamente árvores de partida e os valores padrão a partir do modelo de evolução nucleotídica mais apropriado para condução das análises Bayesianas; dois critérios foram utilizados para estimar o modelo de evolução nucleotídica – MrModeltest 2.3 (NYLANDER, 2004): o modelo com melhor ajuste para o conjunto de dados por critério de informação Akaike e os testes de razão de verossimilhança implementado em MrModeltest 2.3. Árvores foram amostradas a cada 100 gerações, resultando em uma amostragem total de 20 001 árvores. As primeiras 5.000 árvores foram descartadas como “burnin”. A partir das árvores restantes, foi criada uma árvore de consenso usando o comando “sumt”, para determinar a probabilidade posterior dos clados. Comprimentos de ramo foram estimados como valores médios acima das árvores amostradas. A análise Bayesiana foi repetida quatro vezes, sempre utilizando árvores de partida aleatórias e valores iniciais aleatórios para os parâmetros do modelo de evolução nucleotídica para testar a independência dos resultados da repetição das topologias anteriores durante o avanço em cadeia (HUELSENBECK et al., 2002). Clados com probabilidade posterior (PP) > 0,95 foram considerados suportados.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS POR TÉCNICAS DE MACRO E MICROCULTIVO

Os fungos endofíticos bioativos selecionados para o fracionamento químico biomonitorado que apresentaram informações inconclusivas nas análises filogenéticas foram submetidos às técnicas de Macro e Microcultivos. No macrocultivo foi observado aspectos macroscópicos (aspecto, textura, medida de crescimento da cultura e pigmentação) dos fungos filamentosos nos meios BDA, AEM e Ágar Aveia (AA, aveia em flocos 10% e ágar 2%), incubados por 7 dias a 25°C Para a técnica de Microcultivo em Lâmina (RIDDELL, 1950) foi recortado um pequeno quadrado de aproximadamente 2cm² do meio de cultura e colocado sobre uma lâmina histológica. O fungo foi então semeado nas quatro pontas do quadrado e colocado sobre a lâmina histológica e lamínula sobre a sementeira. Todo o conjunto foi colocado no interior de uma placa de Petri sobre um suporte de vidro e papel filtro embebido em água esterilizada. O microcultivo foi então encaminhado para estufa com temperatura de 25°C Após 20 dias de crescimento fúngico foram retirados a lamínula e o meio de cultivo, e a lâmina foi corada com lactofenol para visualização em microscópio óptico.

4.6 RIQUEZA, EQUABILIDADE E DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram calculadas curvas de acúmulo de espécies, por meio do número de espécies de fungos endofíticos obtidos para cada planta. A proposta dessas curvas é que elas representem o número de espécies descobertas, plotadas em um gráfico que nos indique qual foi a quantidade de esforço empregado para se inventariar uma área, neste caso, a comunidade endofítica do hospedeiro. Quando a curva de acúmulo atinge uma assíntota (formato de uma curva que se estabiliza quando o valor do eixo y não muda, tornando a curva sempre paralela ao eixo x) é porque, virtualmente, todas as espécies de um hospedeiro já foram coletadas (COLWELL; CODDINGTON, 1994). Os estimadores de riqueza *Bootstrap*, *Chao 1*, *Jackknife 1* e *Jackknife 2* foram calculados a partir de 1000 reamostragens aleatórias das amostras com reposição (*bootstrap*), e suas médias e desvios-padrões foram relatados.

Medidas de diversidade α são comumente utilizadas para descrever o quão diversa é uma comunidade e apresentam diferentes pressupostos, vantagens e limitações. Para a análise dos dados foram calculados: (i) o índice de riqueza de Margalef $[(S-1)/\ln(n)]$, valores inferiores a 2,0 são considerados como denotando áreas de baixa biodiversidade e valores superiores a 5,0 são considerados como indicador de grande biodiversidade, (ii) o inverso do índice de Simpson (D), que combinam os efeitos de riqueza e equabilidade de espécies. Simpson ($\ln S$ com transformação logarítmica) mede a chance de dois indivíduos, escolhidos ao acaso em uma mesma comunidade, pertencerem a mesma espécie, $L = - \sum (p_i^2)$, onde 0 = todos os táxons estão presentes em iguais quantidades e 1 = um táxon domina completamente a comunidade, e (iii) o Índices de Simpson $(1 - D)$ que mede a equitabilidade (“*evenness*”), onde 1 representa a máxima diversidade, ou seja, todas as espécies são igualmente abundantes e 0 representa mínima diversidade. Valores de índices de diversidade maximizam a perda de informação biológica sobre a comunidade endofítica (GUREVITCH et al., 2009). Considerando esta possibilidade de perda de informação nos índices, foi utilizada a curva de abundância para quantificar e comparar as comunidades. Curva de abundância é uma maneira de descrever hierarquias de abundâncias relativas. Comunidades com elevada dominância de uma única espécie e baixa riqueza de espécies terá um formato gráfico muito diferente daquela representando uma comunidade altamente diversa e sem forte dominância, com muitas espécies comuns e com um alto número total de espécies; sendo mais úteis para propósitos descritivos do que para comparações quantitativas.

Análises comparativas entre as partes da planta de *M. ernestii* foram conduzidas a partir das métricas dos índices de diversidade diferencial β . Estes índices refletem o quanto duas partes da planta diferem em função dos conjuntos de OTUs que abrigam (WHITTAKER, 1972; MAGURRAN, 2004). OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) é um termo originalmente cunhado por Sneath e Sokal (1973) (proponentes da Taxonomia Numérica) para denominar as unidades (indivíduos, populações, espécies, gêneros, famílias, etc) em análise. As relações da composição de espécies entre dois ambientes (partes da planta: raiz, cladódio e espinho), como o número de espécies compartilhadas (*a*), o número de espécies perdidas (*b*), e o número de espécies ganhas (*c*) são considerados e ponderados. Para o estudo da diversidade β foi utilizado o índice β_{HI} [$\beta_{HI} = (S / \infty_{med}) - 1$] de Harrison et al. (1992), em que *S* = total de espécies encontrado nas duas partes das plantas e ∞_{med} = média da riqueza das duas partes das plantas, que corresponde ao inverso do índice de diversidade de Whittaker, pertencente ao grupo de medida de continuidade de espécies (KOLEFF et al., 2003), em função da dependência aos valores de espécies compartilhadas (*a*), que sinalizam para uma semelhança na composição endofítica das partes das plantas, ou para a continuidade de nichos de uma área à outra.

Análise de agrupamento foi conduzida a partir da matriz de distância de Manhattan com algoritmo single linkage de agrupamento. O critério de escolha da matriz de distância e algoritmo de agrupamento seguiu o parâmetro do coeficiente de correlação cofenética: medida que varia de 0 a 1, e indica a distorção entre a matriz de distância e a topologia encontrada pelo algoritmo de agrupamento; quanto mais próximo de 1 menor a distorção entre as matrizes e a topologia encontrada (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). Todas as análises de medidas de riqueza e diversidade foram conduzidas no software PAST v.2.12 (HAMMER et al., 2001).

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.7.1 Obtenção do extratos brutos

4.7.1.1 Extratos hidro-alcóolicos

Os fungos filamentosos e leveduras obtidas foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA a 28°C com umidade de 70-80%. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi transferido para tubos cônicos de 50 mL contendo

35 mL de etanol 60% PA (Vetec). Cladódios, espinhos e raízes de *M. ernestii* foram coletados de três indivíduos, escolhidos aleatoriamente, e colocados em tubos cônicos de 50 mL com contendo 35 mL de etanol 60% PA (Vetec). O conteúdo dos tubos foi macerado a 10°C durante 48 horas, em seguida os extratos foram filtrados com papel de filtro e transferidos para frascos de vidro de 20 mL e para tubos de 1,5 mL. Todos os extratos brutos obtidos foram secos em centrífuga a vácuo “Speed Vac” (Savant) com temperatura de 35°C, solubilizados em solução de DMSO (dimetilsulfóxido) a uma concentração de 100 mg/mL e depositados na Extratoteca Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos (UFMG).

4.7.1.2 Extratos diclorometânicos

Os extratos diclorometânicos foram produzidos após crescimento dos fungos endofíticos em placas de Petri (90 mm diâmetro) contendo 20 mL de BDA por 15 dias a 25°C ± 2°C (ROSA et al. 2013). Após este período os fungos em meio de cultura foram liofilizados para remoção de água por 48 horas, cortado em pequenos fragmentos e transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de diclorometano (DCM, Fisher, USA).

Para os extratos vegetais de *O. humifusa*, os tecidos amostrados foram secos em liofilizador por 2 dias. Posteriormente, os tecidos foram individualmente macerados e transferidos para frascos de vidro tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de DCM. Após 48 horas a temperatura ambiente, a fase orgânica de todos os extratos foi coletada e seca em centrífuga à vácuo com temperatura inferior a 40°C. As alíquotas dos extratos secos foram estocadas a -20°C para posterior utilização nos ensaios biológicos. Extração similar foi realizada utilizando meio de cultura BDA e o extrato utilizado como controle nos ensaios biológico

4.7.2 Triagem da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos fúngicos e vegetais foi avaliada pelo método de microdiluição em placa de acordo com metodologia descrita nas normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS M7 – A6, vol. 23 n° 2) para bactérias; *7.1 Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS-EUCAST, 2002) para leveduras, com modificações e o “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos” (NCCLS M38 – A2, vol.22,

n° 16) para fungos filamentosos, com modificações. Os micro-organismos alvos utilizados nos ensaios foram: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 60193, *C. Krusei* ATCC 6258 e *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740.

Bactérias e leveduras foram previamente crescidas a 30 e 37°C nos meios Miller-Hinton (Difco) e Sabouraud (Himedia), respectivamente. Após 24 h de incubação, os inóculos foram preparados pela suspensão de duas a cinco colônias nos meios Mueller-Hinton e RPMI1640 (suplementado com 2% de glicose) para bactérias e leveduras, respectivamente. Cinquenta microlitros do inóculo foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, sendo que a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro para $1-2 \times 10^8$ células/mL para bactérias e 1×10^6 células/mL para leveduras. A absorbância foi medida em comprimentos de onda de 625 nm e 530 nm para bactérias e leveduras, respectivamente. Em cada poço usado para teste foram adicionados 25 µL de cada extrato dissolvido em DMSO, bem como 25 µL da solução com a droga nos poços de controle positivo, e 25 µL do meio. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL, e as concentrações das drogas usadas como controles positivos para leveduras e bactérias, respectivamente, de 2 µg/mL (Anfotericina B – SIGMA/USA) e 32 µg/mL (Cloranfenicol – SIGMA/USA); e dos extratos de 250 µg/mL.

Após o preparo das placas, as mesmas foram agitadas por cerca de 20 minutos a 200 r.p.m. e em seguida incubadas por 24 h a 37°C para leveduras e 30°C para bactérias. Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), o conteúdo homogeneizado e as placas novamente incubadas à mesma temperatura de crescimento dos respectivos inóculos por 4 horas. Nas mitocôndrias das células alvos, o MTT é metabolizado em formazan, revelando a presença de células metabolicamente ativas. Após o metabolismo do MTT, foram adicionados 100 µL/poço de SDS/isopropanol (5%), que rompe a membrana celular dos microrganismos alvos e disponibiliza no meio o formazan. A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), com a absorbância de 570 nm. A absorbância dos poços testes foi comparada com a absorbância do poço controle contendo apenas o micro-organismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula: Porcentagem de Inibição = (Densidade óptica poço controle – DO poço tratado) X 100/ Densidade óptica do poço controle.

Para determinação da atividade antifúngica contra fungo filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740, culturas puras de *Cl. sphaerospermum* foram previamente crescidas em meio ágar BDA, a 25°C no escuro e ao atingir a maior fase de esporulação (7-10 dias), uma alçada dos esporos dos fungos foi transferida para cerca de 5 mL de salina e submetida à agitação em vórtex. A concentração do inóculo foi determinada em espectrofotômetro (ESPINEL-INGROFF et al., 1991; WEDGE et al., 1998) (absorbância de 625 nm) e as suspensões foram ajustadas até atingir a concentração final de 1.0×10^6 conídios/mL. Cinquenta microlitros do inóculo foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços, juntamente com 25 µL dos extratos (concentração final no poço de 250 µg/ml) e 25 µL do meio RPMI. Após o preparo das placas, as mesmas foram agitadas por cerca de 20 minutos a 200 r.p.m. e em seguida incubadas por 48 h a 25°C. O crescimento fúngico foi avaliado pela medida da absorbância em cada poço em comprimento de onda de 620 nm. A droga fungicida benomil (Sigma/USA), na concentração de 1,16 µg/ml, foi usada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e foram considerados ativos os extratos com valor de inibição igual ou maior que 70%.

4.7.3 Determinação da concentração inibitória mínima

Os extratos etanólicos e diclorometânicos dos isolados fúngicos selecionados foram submetidos ao ensaio de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. Foram realizadas diluições seriadas dos extratos de 250 até 0,488 µg/mL. O meio de cultura, a padronização do inóculo, os controles positivos e negativos e a leitura dos resultados foram realizados conforme descrito acima, na triagem da atividade antimicrobiana, para os respectivos micro-organismos alvos.

4.7.4 Determinação da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos

4.7.4.1 Ensaio de bioautografia

Os ensaios para determinação da atividade antifúngica foram realizados no *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* (ARS/NPURU/USDA) como parte do estágio de doutorado sanduíche. Utilizaram-se como micro-organismos alvos os seguintes fungos fitopatogênicos: *Colletotrichum acutatum*, *Co. fragariae* e *Co. gloesporioides* obtidos do Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Poplarville, MS.

Os fitopatógenos alvos foram crescidos em BDA (Difco/EUA) em placas de Petri de 9 cm e incubados a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente branca ($55 \pm 5 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$) com 12 horas de fotoperíodo para estimulação da esporulação. Após 7–10 dias, 5 mL de água destilada esterilizada foram adicionados as placas de crescimento das colônias e, com o auxílio de uma alça de plástico em formato de “L”, os conídios dos fungos alvos foram liberados. A suspensão aquosa formada com os conídios foi filtrada por meio de Miracloth (Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA) para remoção do micélio. A concentração dos conídios foi determinada com auxílio de espectrofotômetro (WEDGE; KUHAJEK, 1998) com curva padrão baseada na absorvância de 625 nm, e as suspensões ajustadas com água destilada estéril a uma concentração de 1.0×10^6 conídios/mL. As concentrações conidiais padrão foram determinadas por meio da curva padrão de cada espécie fúngica. Curvas de turbidez padrão foram periodicamente validadas utilizando um contador de partículas (Bechman/Coulter Z1) e contagem de hemocitômetro. Avaliação dos crescimentos micelial e conidial para experimentos de microdiluição em caldo foram avaliados utilizando leitor de microplaca (Packard –SpectraCount/ Packard Instrument Co., Meriden, CT).

Os extratos brutos foram diluídos em diclorometano (DCM, Fisher, USA), aplicados 160 μg em uma placa de sílica gel (UNIPLATE™) e seca à temperatura ambiente. Posteriormente, cada placa foi borrifada com uma suspensão conidial (10^5 esporos/mL) da espécie alvo e incubadas em câmara úmida a 26°C com 12 horas de fotoperíodo durante quatro dias. Como controles positivos foram utilizados os antifúngicos pesticidas comerciais benomil (1,16 $\mu\text{g}/\text{ponto}$), ciprodinil (0,9 $\mu\text{g}/\text{ponto}$), azoxistrobina (1,61 $\mu\text{g}/\text{ponto}$) e captan (1,2 $\mu\text{g}/\text{ponto}$) (Chem Service, Inc. West Chester, PA).

O diâmetro das zonas de inibição do crescimento fúngico foi avaliado após 4 – 5 dias de incubação. Zonas claras de inibição indicaram a presença de atividade antifúngica em cada extrato (WEDGE et al., 2009), e zonas não totalmente claras, consideradas difusas, indicaram atividade fungistática. Os extratos que apresentaram halos claros de inibição foram utilizados em novos testes de validação.

4.7.4.2 Ensaio de microdiluição em placa

A avaliação dos compostos antifúngicos isolados contra a esporulação de fungos filamentosos foi realizada pelo método de microdiluição em placa, de acordo com metodologia descrita nas normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS M27-A) para leveduras, com modificações (WEDGE; KUHAJEK, 1998; WEDGE

et al., 2000). Neste ensaio foram utilizados os seguintes fitopatógenos como alvos: *Colletotrichum acutatum*, *Co. fragariae*, *Co. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis obscurans* e *P. viticola*.

Os compostos puros foram testados de acordo com protocolo descrito por Wedge et al. (1998) frente as espécies fúngicas em três diferentes concentrações: 75, 150 e 300 µM. Como controles positivos foram utilizados os fungicidas azoxistrobina e captan, nas concentrações de 0.3, 3.0 e 30 µM. Todos os testes foram realizados em duplicata.

O crescimento fúngico foi avaliado pela absorbância de cada poço a 620 nm após 0, 24, 48 e 72 horas, exceto para *P. obscurans* e *P. viticola*, que os dados foram obtidos após 120 e 144 horas. Os valores médios de absorbância e erros padrão foram determinados e representados graficamente, sendo que os gráficos foram utilizados para avaliar a inibição do crescimento fúngico. Diferenças na germinação dos esporos e no crescimento micelial em cada poço da placa de 96 poços demonstraram a sensibilidade a cada concentração dos compostos puros, e indicaram efeitos fungicidas ou fungistáticos.

4.8 Seleção dos extratos para análise química

Após os ensaios realizados, os extratos ativos foram selecionados para os experimentos de desreplicação a fim de caracterizar os metabólitos presentes nos extratos brutos ou frações ativas. Tais experimentos foram realizados no *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* (ARS/NPURU/USDA).

4.9 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A primeira parte dos experimentos de desreplicação consistiu na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um aparelho Inova 600 MHz da fabricante Varian (Palo Alto, CA) ou em um aparelho Varian 400 MHz modelo EUR0020 (Palo Alto, CA). As amostras foram preparadas a aproximadamente 10 mg/mL em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e analisadas em tubos de RMN de 3 mm. Todos os espectros de RMN foram processados pelo programa MestReNova v8.1.2-11880 (Mestrelab Research, S. L., 2013). Todos os espectros de ^{13}C foram registrados em experimentos de DEPT de 90 e 135°.

4.10 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos

Os extratos brutos e frações com presença majoritária de ácidos graxos a partir dos espectros de RMN de ^1H foram submetidos à análise quantitativa e qualitativa destas substâncias. Os tempos de retenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos utilizados neste trabalho estão identificados em parêntese: ácido caprótico (6:0), ácido caprílico (8:0), ácido cáprico (10:0), ácido undecanóico (11:0), ácido láurico (12:0), ácido tridecanóico (13:0), ácido mirístico (14:0), ácido miristoléico (14:1), ácido pentadecanóico (15:0), ácido cis-10-pentadecenóico (15:1), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoléico (16:1), ácido heptadecanóico (17:0), ácido cis-10 heptadecenóico (17:1), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1n9c), ácido elaídico (18:1n9t), (LA) ácido linoléico (18:2n6c), ácido linolelaídico (18:2n6t), ácido gamma-linolênico (18:3n6), ácido pinolênico (18:3n6), ácido estearidônico (18:4n3), (ALA) ácido α -Linolênico (18:3n3), ácido nonadecanóico (19:0), ácido araquídico (20:0), ácido cis-11-eicosenóico (20:1), ácido cis-11-14-eicosadienóico (20:2), ácido heneicosanóico (21:0), ácido siadônico (20:3n6), ácido cis-8-11-14-eicosatrienóico (20:3n6), ácido arachidônico (20:4n6), (ETE) cis-11,14,17-ácido eicosatrienóico (20:3n3), (EPA) ácido eicosapentaenóico (20:5n3), ácido beénico (22:0), ácido erúxico (22:1n9), ácido cis-13,16-Docosadienóico (22:2), (DPA) ácido docosapentaenóico (22:5n3), (DHA) ácido docosahexaenóico (22:6n3), ácido tricosanóico (23:0) e ácido lignocérico (24:0). Os padrões de ácidos graxos foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ou Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN). Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês FAME) utilizados na análise dos extratos brutos e frações ativas foram ou sintetizados a partir de um ácido graxo livre correspondente (reação de diazometano) ou analisados com uma mistura de padrões de referência da Supelco (St. Louis, MO), 18919.

Os ácidos graxos livres foram convertidos ao seu éster metílico correspondente pela reação com diazometano e éter, sendo utilizado um Mini Diazald®, aparato da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Resumidamente, 2,5 g de KOH foi dissolvido em 4 mL de água deionizada e a mistura mantida em um recipiente, sendo posteriormente adicionados 5 mL de etanol a mistura. Um funil de separação contendo 2,5 g de *diazald* dissolvido em 22,5 mL de éter foi acoplado ao recipiente, o qual foi aquecido a 65°C em banho maria. Durante o aquecimento, por um período de 50 minutos, a solução de *diazald* foi gotejada na mistura em aquecimento. Após este período, o frasco foi resfriado utilizando um banho de acetona e gelo seco. O diazometano co-destilado (CH_2N_2) em solução de éter foi armazenado em frasco de vidro e mantido a -20°C para posterior uso.

Para a análise, a cada amostra de extrato ou fração ativa foi adicionada 500 μL de éter dietil e 500 μL da solução de CH_2N_2 . O frasco com a solução foi mantido aberto, a temperatura ambiente e overnight em uma capela de exaustão, a fim de completar a reação e permitir a evaporação do solvente e CH_2N_2 . Após a reação o produto éster metílico foi dissolvido em 500 μL de éter dietil e analisado em GC-MS.

4.11 Cromatografia Gasosa – Análise com Detector por Ionização de Chama (GC-FID)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás CP-3800 (Varian), o qual foi equipado com uma coluna capilar DB-23 Agilent Technologies (comprimento: 60 m; diâmetro interno: 0,25 mm; espessura do filme: 0,25 μm). Durante a operação utilizou-se a seguinte condição: temperatura de injeção, 270°C; temperatura da coluna, 130°C mantido por 1 minuto seguido por 130° a 170°C por 6,5°C/min seguido por 170 a 215°C por 2,8°C/min e mantido por 12 min seguido por 215 a 230°C por 40°C min e mantido por 3 minutos; volume de injeção de 1L (*split* 20:1); 3,0 ml/min fluxo constante; temperatura FID de 300°C. Ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por injeção de padrões comercialmente disponíveis e pela comparação do tempo de retenção dos desconhecidos (presentes nos extratos ou frações ativas). Os ácidos graxos das amostras em estudo foram quantificados pelo cálculo da porcentagem da área baseado na combinação da área total: a área de cada pico obtido foi dividida pela área total de todos os picos do cromatograma e multiplicado por 100, a fim de obter a porcentagem.

4.12 Fracionamento químico biomonitorado

Após a análise dos espectros de RMN de ^1H , os extratos brutos selecionados foram submetidos ao fracionamento químico biomonitorado visando à purificação e identificação dos prováveis metabólitos responsáveis pela atividade biológica. Inicialmente, realizou-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do (s) extrato(s) bruto(s) a fim de selecionar os solventes para o fracionamento. As análises de CCD foram realizadas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária e um painel de misturas de solventes como fase móvel. As placas foram a princípio reveladas pela luz UV (254, 305 e 363 nm) e, também pelo calor, após aplicação de spray de Godin (Godin A, 5% de H_2SO_4 em etanol + Godin B 1 g de vanilina em 100 mL de etanol). A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador e avaliadas por

CCD. Baseado no perfil da CCD, as frações que continham mesmas distribuições de compostos foram reunidas.

4.13 Análises de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

Após a realização dos ensaios antifúngicos com as frações obtidas, 1 mg de todas as frações ativas foram dissolvidas em DCM (1000 μ L) e analisadas pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Utilizaram-se uma coluna DB-5 (coluna capilar de sílica fundida 30 m \times 0,25 mm, 0,25 μ m de espessura do filme) operado usando as seguintes condições: temperatura do injetor de 240°C; temperatura da coluna foi de 60-240°C a 3°C/min em seguida, mantida a 240°C por 5 minutos; gás de arraste, hélio; e volume de injeção de 5 μ L (splitless).

4.14 Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

Foram utilizadas alíquotas dos compostos na concentração de 0,1 mg/mL (solubilizadas em metanol) e os espectros de massas em alta resolução foram obtidos usando Agilent 1100HPLC para JEOL AccuTOF (JMS-T100LC), (Peabody, MA).

4.15 Elucidação estrutural dos constituintes químicos

A identificação das moléculas foi realizada sob supervisão do Dr Charles Cantrell, químico especialista em produtos naturais, a partir dos dados obtidos após os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C , CG-FID, CG-EM e LC-MS3 somado a pesquisas realizadas em banco de dados comerciais, como *Dictionary of Natural Products* e *SciFinder Scholar*.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DE DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Melocactus ernestii*

5.1.1 Identificação de fungos endofíticos isolados de *Melocactus ernestii*

Ao final do processo de isolamento foram identificadas 99 espécies de fungos endofíticos (Tabela 3; Figura 7). Oito táxons de fungos filamentosos foram identificados em nível de espécie baseado na similaridade (99 e 100%) das sequências de ITS com sequências de isolados depositados em Coleções de Culturas internacionais. Apenas duas espécies de leveduras foram isoladas do cladódio de *M. ernestii* e foram identificadas como *Aureobasidium pullulans* UFMG CM-Y360 e *Candida parapsilosis* UFMG CM-Y361.

As sequências TEF1 e β -butulina dos táxons *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347 e *Phoma* sp. UFMGCB 6409 mostraram baixa similaridade quando comparadas com sequências depositadas no GenBank e foram identificados em nível de gênero. Enquanto a sequência TEF1 do táxon *Fusarium solani* UFMGCB 5685 mostrou alta similaridade (99% de identidade) com a sequência de referência *Fusarium solani* NRRL32789 [DQ247098], confirmando a identificação pela região ITS. As sequências TEF1 e β -butulina do táxon *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 mostrou alta similaridade (99% de identidade) com as sequências de *Diaporthe* sp. CBS119639 [343928 e 344170, respectivamente] e a identificação permaneceu em nível de gênero (Figura 21-a, b).

Dentre os táxons dos fungos endofíticos pertencentes ao filo Ascomycota, apenas três táxons foram identificados como Ascomycota sp., os demais táxons foram incluídos no subfilo Pezizomycotina representado três classes: Sordariomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes e Pezizomycetes; e o subfilo Saccharomycotina representado pela classe Saccharomycetes.

Tabela 3 Identificação molecular dos fungos endofíticos associados aos cladódios, espinhos e raízes de *Melocactus ernestii*. A identificação foi conduzida usando BLASTn da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2).

Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Parte da planta	Resultado Top BLAST [nº de acesso no GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto [nº de acesso GenBank] ^b
5694 ^{*c}	29	C, E, R	<i>Preussia minima</i> [AY510425]	99	99	463	<i>Preussia</i> sp. 1 [KJ471480]
5829 ^{*d}	21	C, R	<i>Fusarium oxysporum</i> [DQ790535]	100	99	521	<i>Fusarium oxysporum</i> [KJ471481]
5753 ^{*d}	17	R	<i>Cochliobolus eragrostidis</i> [JN943449]	100	99	518	<i>Cochliobolus eragrostidis</i> [KJ471482]
5656 [*]	14	C	<i>Mycoleptodiscus indicus</i> [GU980696]	100	100	470	<i>Mycoleptodiscus indicus</i> [KJ471483]
5890 ^{*d}	11	R	<i>Fusarium solani</i> [JQ625574]	100	100	454	<i>Fusarium solani</i> [KJ471484]
5765 [*]	13	E, R	<i>Sphaerobolus stellatus</i> [AY650264]	74	87	463	<i>Sphaerobolaceae</i> sp. [KJ471506]
6344	10	C, R	<i>Hypocrea peltata</i> [AB742527]	99	91	442	<i>Hypocreaceae</i> sp. 1 [KJ471485]
6378 [*]	9	R	<i>Sordariomycetes</i> sp. [JQ761382]	100	98	498	<i>Sordariomycetes</i> sp. [KJ471552]
CM-Y360	8	C	<i>Aureobasidium pullulans</i> [KC433759]	100	100	449	<i>Aureobasidium pullulans</i> [KJ471577]
5841 [*]	8	R	<i>Knufia perforans</i> [JN040506]	100	90	491	<i>Chaetothyriaceae</i> sp. 1 [KJ471518]
6396 [*]	8	R	<i>Dothideomycetes</i> sp. [JQ760268]	75	93	603	<i>Pezizomycotina</i> sp. 2 [KJ471554]
5858	7	C, E, R	<i>Nigrospora oryzae</i> [DQ219433]	99	98	405	<i>Nigrospora</i> sp. [KJ471524]
6364 [*]	6	R	<i>Periconia macrospinosa</i> [JN859363]	100	93	471	<i>Halosphaeriaceae</i> sp. [KJ471545]
5757	6	R	<i>Dothideomycetes</i> sp. [JQ759888]	90	90	538	<i>Pezizomycotina</i> sp. 1 [KJ471504]
6371	5	R	<i>Cortinarius</i> sp. [JX316774]	24	85	609	<i>Agaricomycetidae</i> sp. [KJ471550]
6741	5	E, R	<i>Penicillium</i> sp. [AB734793]	100	99	424	<i>Penicillium</i> cf. <i>griseofulvum</i> [KJ471570]
6409 ^{*d}	5	C, R	<i>Phoma</i> sp. [GQ352490]	100	100	463	<i>Phoma</i> sp. 3 [KJ471522]
6368	5	R	<i>Camarographium koreanum</i> [JQ044432]	82	86	471	<i>Pleosporales</i> sp. [KJ471547]
5758 ^d	4	E, R	<i>Aspergillus calidoustus</i> [KC253951]	100	100	488	<i>Aspergillus calidoustus</i> [KJ471505]
5665	4	R	<i>Ceratobasidium</i> sp. [HQ630980]	100	95	586	<i>Ceratobasidiaceae</i> sp. 1 [KJ471490]
5878	4	R	<i>Knufia petricola</i> [KC978745]	96	90	544	<i>Chaetothyriaceae</i> sp. 2 [KJ471528]
5693 ^c	4	C, E	<i>Preussia africana</i> [JQ031265]	100	99	445	<i>Preussia minimoides</i> [KJ471496]
5882	3	C	<i>Ascomycota</i> sp. [HQ607933]	100	99	545	<i>Ascomycota</i> sp. 3 [KJ471531]
6427 ^c	3	R	<i>Bartalinia pondoensis</i> [JQ425386]	100	99	443	<i>Bartalinia</i> sp. [KJ471560]
6715	3	R	<i>Chaetomium cupreum</i> [JQ676206]	99	96	481	<i>Chaetomium</i> sp. 2 [KJ471564]
6430 ^c	3	C	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> [JX966576]	100	100	485	<i>Cladosporium</i> sp. [KJ471561]
6414 [*]	3	R	<i>Neosartorya fischeri</i> [FJ624264]	100	100	477	<i>Neosartorya fischeri</i> [KJ471558]
6420	3	R	<i>Peyronellaea prosopidis</i> [KF777181]	100	99	423	<i>Peyronellaea prosopidis</i> [KJ471559]
5827 ^{*c}	3	R	<i>Phoma</i> sp. [KF177690]	100	100	443	<i>Phoma</i> sp. 2 [KJ471516]

Tabela 3 Continuação

Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Parte da planta	Resultado Top BLAST [nº de acesso no GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto [nº de acesso GenBank] ^b
6362	2	R	<i>Ascomycota</i> sp. [AM944355]	100	86	449	<i>Ascomycota</i> sp. 1 [KJ471544]
6369	2	R	<i>Ascomycota</i> sp. [HQ607885]	99	90	482	<i>Ascomycota</i> sp. 2 [KJ471548]
5677	2	R	<i>Waitea circinata</i> [HE964994]	99	90	525	<i>Ceratobasidiaceae</i> sp. 3 [KJ471491]
5687	2	R	<i>Ceratobasidium</i> sp. [KC193238]	100	100	561	<i>Ceratobasidium</i> sp. [KJ471494]
5848	2	R	<i>Chaetomium gracile</i> [GU966502]	99	99	481	<i>Chaetomium gracile</i> [KJ471520]
5745 ^c	2	C	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [KF053200]	100	99	458	<i>Colletotrichum</i> sp. 1 [KJ471501]
6336 ^d	2	R	<i>Curvularia brachyspora</i> [AF212308]	100	99	530	<i>Curvularia brachyspora</i> [KJ471536]
6348	2	R	<i>Gelasinospora udagawae</i> [NR077163]	100	99	473	<i>Gelasinospora udagawae</i> [KJ471540]
5682 ^d	2	R	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> [HQ607976]	100	99	505	<i>Microsphaeropsis arundinis</i> [KJ471493]
6726	2	R	<i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i> [JN021547]	73	86	491	<i>Montagnulaceae</i> sp. 2 [KJ471565]
6740 ^d	2	R	<i>Penicillium citrinum</i> [KF530863]	100	99	473	<i>Penicillium citrinum</i> [KJ471569]
6748 ^d	2	R	<i>Penicillium griseofulvum</i> [KF530869]	100	99	465	<i>Penicillium</i> cf. <i>citrinum</i> [KJ471573]
6737 ^d	2	E	<i>Penicillium steckii</i> [HM469415]	100	99	507	<i>Penicillium steckii</i> [KJ471568]
6339 ^c	2	R	<i>Phoma proteae</i> [JQ044433]	100	99	423	<i>Phoma</i> sp. 1 [KJ471537]
5887 ^c	2	C, E	<i>Preussia persica</i> [GQ292750]	100	98	469	<i>Preussia</i> sp. 2 [KJ471534]
6752	2	E	<i>Picoa juniperi</i> [JN392151]	43	92	438	<i>Pyronemataceae</i> sp. [KJ471574]
5655 ^d	2	R	<i>Rhizopycnis vagum</i> [HQ610506]	100	100	426	<i>Rhizopycnis vagum</i> [KJ471488]
5699	2	R	<i>Setophoma terrestris</i> [KF251247]	100	100	474	<i>Setophoma terrestris</i> [KJ471497]
6408 ^d	2	R	<i>Setosphaeria rostrata</i> [JX966631]	100	99	549	<i>Setosphaeria rostrata</i> [KJ471557]
5651	2	E	<i>Devriesia strelitziae</i> [EU436763]	99	91	437	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp. 1 [KJ471487]
5661 ^d	2	E	<i>Xylaria</i> sp. [FJ175176]	97	93	470	<i>Xylariaceae</i> sp. 4 [KJ471489]
6351 ^c	1	R	<i>Aspergillus felis</i> [KF558318]	100	99	488	<i>Aspergillus</i> cf. <i>felis</i> [KJ471542]
5881 ^c	1	R	<i>Aspergillus malodoratus</i> [AF033485]	98	95	459	<i>Aspergillus malodoratus</i> [KJ471530]
5884 ^d	1	C	<i>Astrocystis sublimbata</i> [GU322447]	100	99	432	<i>Astrocystis sublimbata</i> [KJ471532]
CM-Y361	1	C	<i>Candida parapsilosis</i> [JX441607]	100	100	447	<i>Candida parapsilosis</i> [KJ471578]
5688	1	R	<i>Thanatephorus cucumeris</i> [AJ000202]	97	95	629	<i>Ceratobasidiaceae</i> sp. 2 [KJ471495]
6390	1	R	<i>Sphaerodes fimicola</i> [JQ034510]	82	88	432	<i>Ceratostomataceae</i> sp. [KJ471553]
6401	1	R	<i>Chaetomium strumarium</i> [JQ796877]	100	91	477	<i>Chaetomiaceae</i> sp. [KJ471556]

Tabela 3 Continuação.

Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Parte da planta	Resultado Top BLAST [nº de acesso no GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto [nº de acesso GenBank] ^b
5790	1	C	<i>Chaetomium</i> sp. [AB728554]	99	99	470	<i>Chaetomium</i> sp. 1 [KJ471509]
5811	1	C	<i>Chaetomium subglobosum</i> [JX280852]	94	100	450	<i>Chaetomium subglobosum</i> [KJ471513]
6352	1	R	<i>Chaetomium succineum</i> [JX280855]	100	99	412	<i>Chaetomium succineum</i> [KJ471543]
5800 ^c	1	R	<i>Cochliobolus geniculatus</i> [JN943416]	99	99	552	<i>Cochliobolus</i> sp. [KJ471511]
5775 ^c	1	C	<i>Colletotrichum boninense</i> [KF819619]	100	99	464	<i>Colletotrichum</i> sp. 2 [KJ471507]
5799	1	R	<i>Coniochaeta</i> sp. [HM595555]	100	96	524	<i>Coniochaetaceae</i> sp. [KJ471510]
5888 ^c	1	E	<i>Curvularia affinis</i> [GQ352486]	100	100	504	<i>Curvularia</i> sp. [KJ471535]
5822	1	R	<i>Daldinia</i> sp. [AY315403]	100	99	506	<i>Daldinia</i> sp. [KJ471515]
5678 ^d	1	R	<i>Diaporthe raonikayaporum</i> [KC343188]	100	99	424	<i>Diaporthe raonikayaporum</i> [KJ471492]
6340 ^d	1	R	<i>Diaporthe phaseolorum</i> [KC771507]	100	95	499	<i>Diaporthe</i> sp. 1 [KJ471538]
6350 ^d	1	R	<i>Diaporthe</i> sp. [KC343202]	100	99	550	<i>Diaporthe</i> sp. 2 [KF850394]
5821	1	E	<i>Epicoccum</i> sp. [JN113038]	53	92	405	<i>Dothideomycetes</i> sp. [KJ471514]
5879	1	R	<i>Exophiala</i> sp. [EU035421]	94	91	560	<i>Herpotrichiellaceae</i> sp. [KJ471529]
5867	1	R	<i>Trichoderma brevicompactum</i> [KF294835]	89	95	474	<i>Hypocreaceae</i> sp. 2 [KJ471526]
5842	1	C	<i>Lecythophora</i> sp. [JX624284]	100	99	485	<i>Lecythophora</i> sp. [KJ471519]
5749	1	R	<i>Magnaporthe grisea</i> [JQ936264]	87	91	441	<i>Magnaporthaceae</i> sp. [KJ471503]
6370	2	R	<i>Paraconiothyrium</i> sp. [JX868785]	78	99	571	<i>Montagnulaceae</i> sp. 1 [KJ471549]
5851	1	E	<i>Phaeothecoidea proteae</i> [EU707898]	100	91	428	<i>Mycosphaerellaceae</i> sp. [KJ471521]
6345	1	R	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> [KF531820]	100	99	497	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> [KJ471539]
5700	1	R	<i>Neurospora africana</i> [GQ922531]	100	98	350	<i>Neurospora</i> sp. [KJ471498]
6400 ^c	1	R	<i>Penicillium daleae</i> [JQ776543]	100	99	510	<i>Penicillium</i> sp. 1 [KJ471555]
5868 ^c	1	R	<i>Penicillium janthinellum</i> [AY373921]	100	99	504	<i>Penicillium</i> sp. 2 [KJ471527]
6366	1	R	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> [KF155295]	99	96	422	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [KJ471546]
6706	1	C	<i>Dothideomycetes</i> sp. [KF513534]	99	91	496	<i>Pezizomycotina</i> sp. 3 [KJ471563]
5787	1	R	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp. [KC478551]	100	99	413	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp. [KJ471508]
6736 ^d	1	E	<i>Phoma gardeniae</i> [JX966640]	100	99	426	<i>Phoma gardeniae</i> [KJ471567]
5712 ^d	1	E	<i>Preussia minimoides</i> [KF557658]	100	99	465	<i>Preussia minimoides</i> [KJ471500]
5747	1	R	<i>Sclerostagonospora</i> sp. [JX517283]	100	99	474	<i>Sclerostagonospora</i> sp. [KJ471502]
6703	1	R	<i>Monosporascus ibericus</i> [JQ973832]	99	91	447	<i>Sordariales</i> sp. [KJ471562]

Tabela 3 Continuação.

Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Parte da planta	Resultado Top BLAST [nº de acesso no GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto [nº de acesso GenBank] ^b
6734	1	C	<i>Westerdykella dispersa</i> [AY943055]	100	96	435	<i>Sporormiaceae</i> sp. [KJ471566]
6376	1	R	<i>Thozetella</i> sp. [GU973799]	100	99	420	<i>Thozetella</i> sp. [KJ471551]
5837	1	R	<i>Gymnopus melanopus</i> [AY263442]	100	95	477	<i>Tricholomataceae</i> sp. [KJ471517]
6754	1	C	<i>Dermatocarpon dolomiticum</i> [EF014212]	41	91	438	<i>Verrucariaceae</i> sp. 1 [KJ471575]
6755	1	R	<i>Endocarpon pallidulum</i> [DQ826735]	40	87	427	<i>Verrucariaceae</i> sp. 2 [KJ471576]
6742 ^c	1	E	<i>Xylaria laevis</i> [GU324746]	100	99	466	<i>Xylaria</i> sp. 3 [KJ471571]
5709 ^d	1	E	<i>Xylaria berteri</i> [JQ936299]	100	98	419	<i>Xylaria</i> sp. 1 [KJ471499]
5643 ^d	1	C	<i>Xylaria intracolorata</i> [GU324741]	100	96	412	<i>Xylaria</i> sp. 2 [KJ471486]
5803 ^d	1	E	<i>Anthostomella conorum</i> [EU552099]	93	85	453	<i>Xylariaceae</i> sp. 1 [KJ471512]
5885 ^d	1	C	<i>Anthostomella eucalyptorum</i> [DQ890026]	74	94	406	<i>Xylariaceae</i> sp. 2 [KJ471533]
5857	1	E	<i>Xylaria</i> sp. [HE585035]	48	97	560	<i>Xylariaceae</i> sp. 3 [KJ471523]
6747 ^d	1	E	<i>Xylaria</i> sp. [JX997749]	98	99	486	<i>Xylariaceae</i> sp. 5 [KJ471572]
5864 ^d	1	C	<i>Xylaria</i> sp. [DQ480352]	97	95	584	<i>Xylariaceae</i> sp. 6 [KJ471525]

^a Código da Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

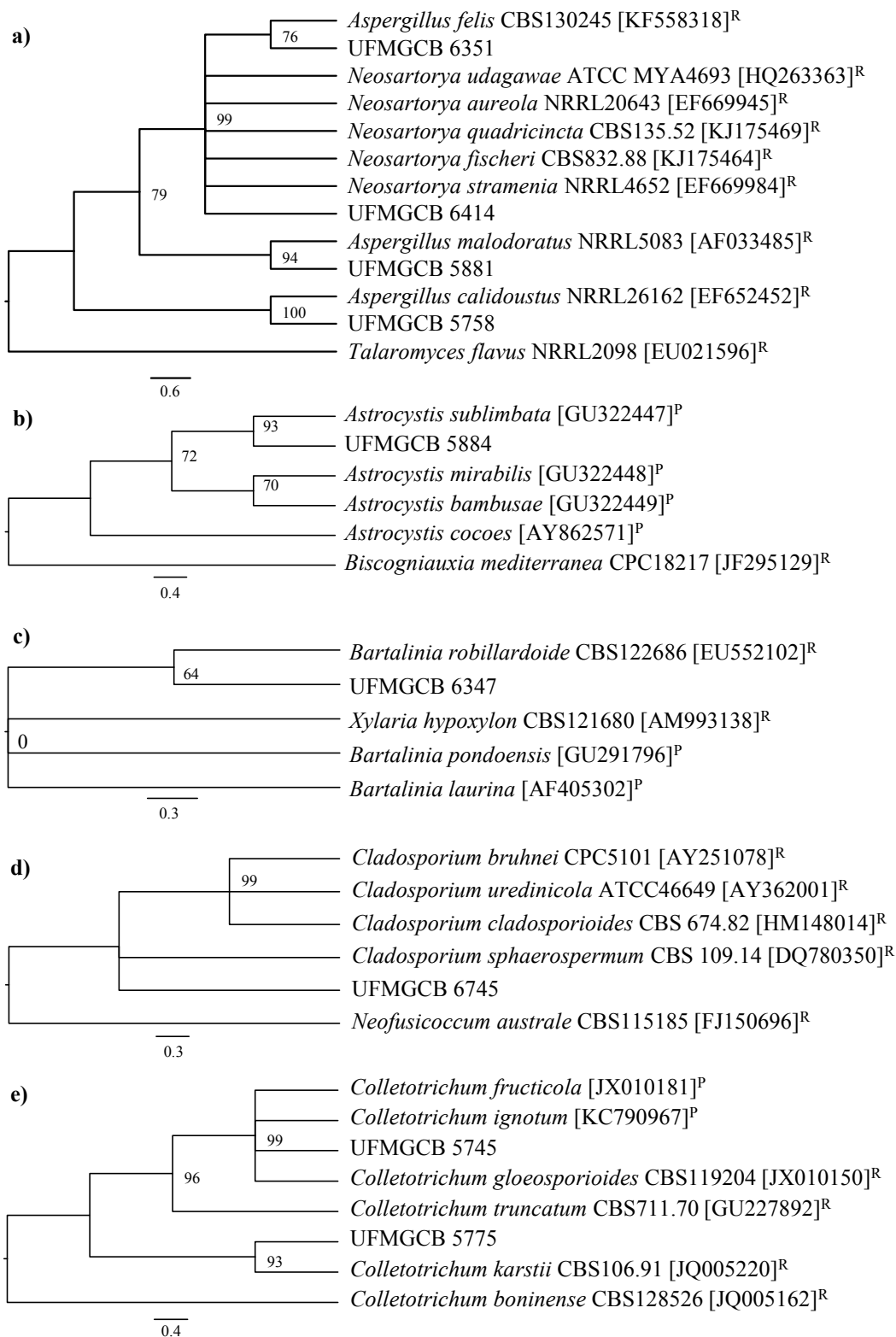
^b Sequências de ITS depositadas no GenBank.

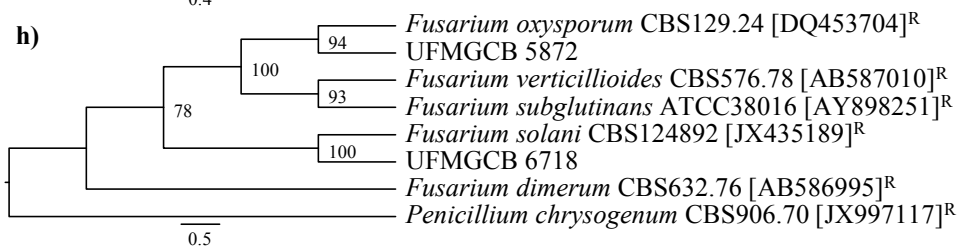
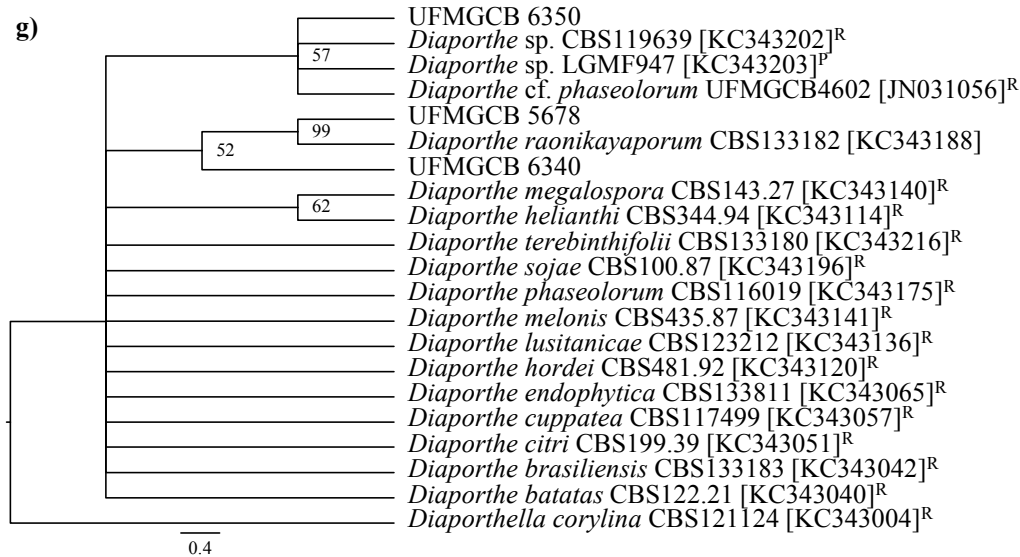
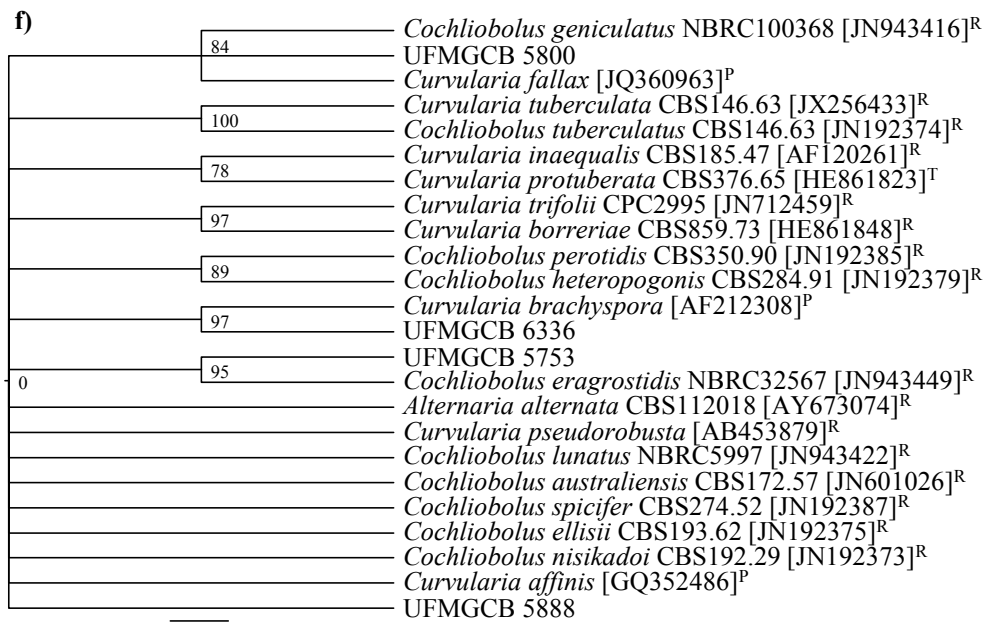
^c Posição taxonômica sugerida por análises filogenéticas.

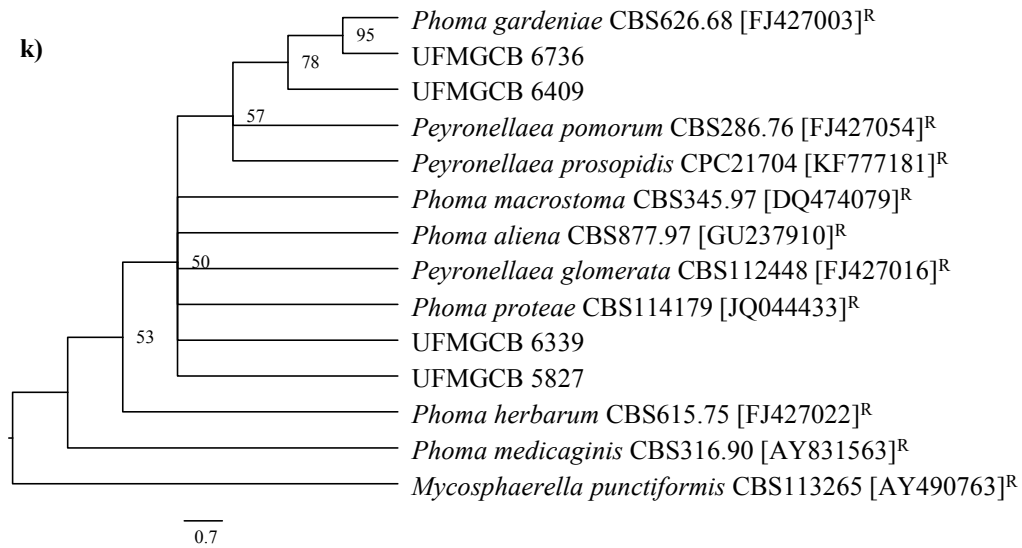
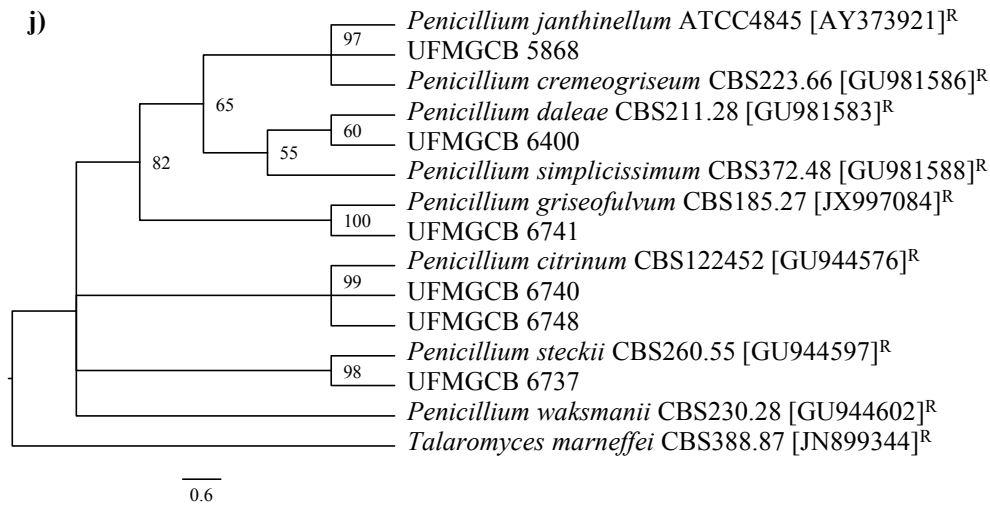
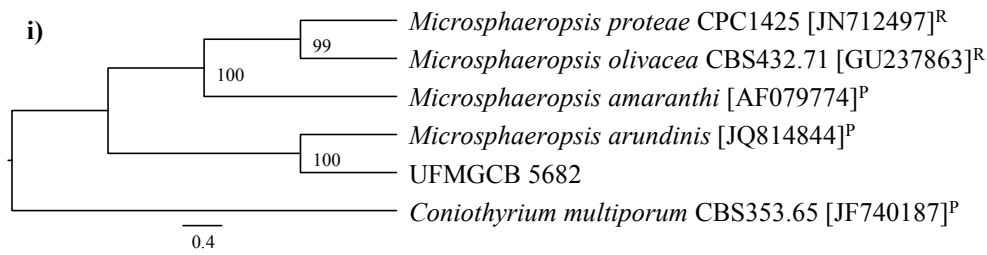
^d Posição taxonômica confirmada por análises filogenéticas.

*Fungos endofíticos isolados de Pedra Azul (Minas Gerais) e Ipirá (Bahia).

C = cladódio, E = espinho e R = raiz.







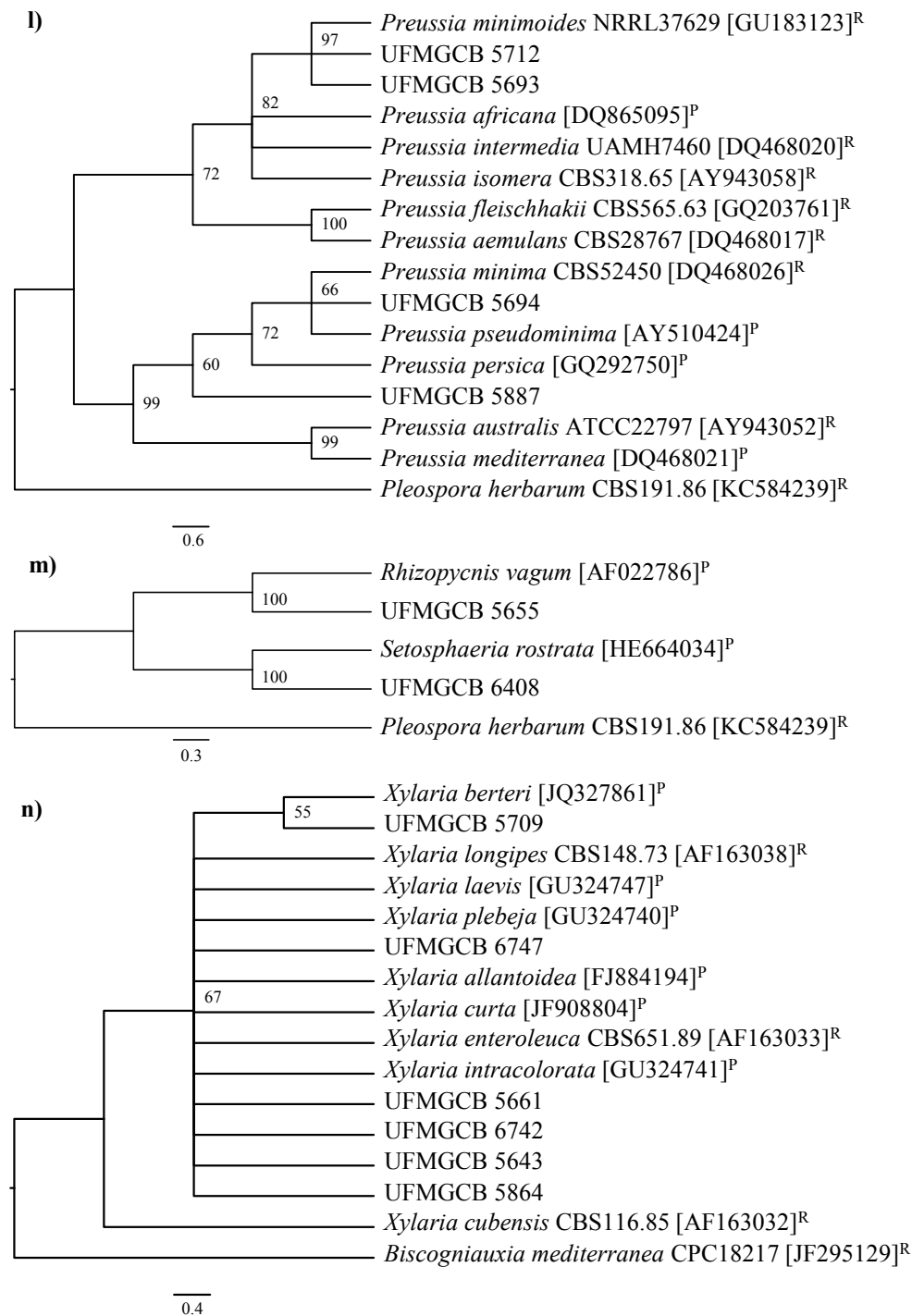


Figura 7 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia da região transcrita interna de fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii*: **a)** *Aspergillus*, **b)** *Astrocystis*, **c)** *Bartalinia*, **d)** *Cladosporium* **e)** *Colletotricum*, **f)** *Curvularia*, **g)** *Diaporthe*, **h)** *Fusarium*, **i)** *Microsphaeropsis*, **j)** *Penicillium*, **k)** *Phoma*, **l)** *Preussia*, **m)** *Rhizopycnis* e *Setosphaeria* e **n)** *Xylaria*. R = sequências de isolados depositados em Coleções de Culturas internacionais; P = sequências de isolados publicadas em jornais indexados.

5.1.2 Análise de diversidade de fungos endofíticos isolados de *Melocactus ernestii*

A partir de 1.800 fragmentos, o total de 316 (cladódio = 55, espinho = 48 e raiz = 209) fungos endofíticos foi isolado de 58 das 60 plantas analisadas. Noventa e nove espécies de fungos foram obtidas dos tecidos de *M. ernestii*; 55 espécies da coleta realizada em Pedra Azul, sendo que 29 ocorreram com grupos com apenas um isolado (singletos) e 44 espécies da coleta realizada em Ipirá, com 20 singletos. A curva de acumulação de espécies das plantas (total de amostras), dos cladódios, dos espinhos e das raízes não estabilizaram, indicando que a amostragem não foi “representativa” (Figura 8); estes dados evidenciam que um maior esforço amostral poderia aumentar o número de espécies observado. Os estimadores *Bootstrap*, *Jackknife 1* e *Jackknife 2* indicaram estimativas de riquezas de espécies superiores às observadas, no entanto, *Chao 1* indicou que praticamente todas as espécies foram coletadas nos cladódios, espinhos e raízes (Tabela 4).

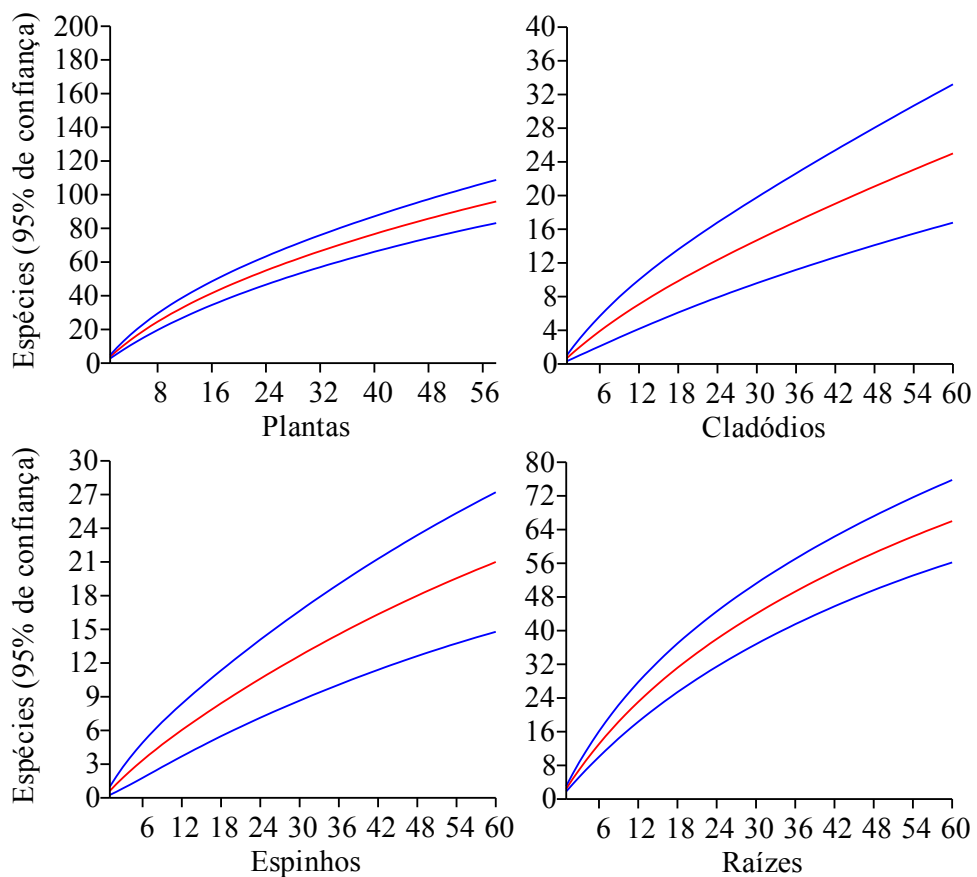


Figura 8 Curva de acumulação de espécies (linha vermelha), intervalos de confiança de 95% (linhas em azul), baseado em 2000 réplicas de *bootstrap*.

Tabela 4 Valores observados e valores esperados, baseados nos estimadores de riqueza *Chao 2*, *Jackknife 1*, *Jackknife 2* e *Bootstrap*, para cladódios, espinhos e raízes de *Melocactus ernestii*.

<i>Melocactus ernestii</i>	Nº observado de espécies	Estimadores de riqueza			
		<i>Chao 2</i>	<i>Jackknife 1</i>	<i>Jackknife 2</i>	<i>Bootstrap</i>
Cladódios	24	25,7 ± 11,1	25,4 ± 4,8	59,2 ± 8,1	32,3 ± 3,4
Espinhos	21	20,2 ± 6,2	21,8 ± 3,5	43,5 ± 6	26,8 ± 2,4
Raízes	65	64,3 ± 11,3	68,6 ± 7,1	120 ± 12,2	81,0 ± 4,9
Total	99	94 ± 14,9	99,4 ± 9,5	186,1 ± 16,2	119,2 ± 6,4

A riqueza-composição da comunidade endofítica foi distinta entre as partes de *M. ernestii*. Neste estudo foram identificadas 99 OTUs, as quais ocorreram em maior número na raiz, seguido pelo cladódio e espinho (Figura 9). Apenas duas OTUs co-ocorreram entre as três partes da planta (*Nigrospora* sp. e *Preussia* sp. 1). Duas OTUs co-ocorreram entre cladódio e espinho (*Preussia* sp. 2 e *Preussia minimoides*) e três entre raiz e espinho (*Aspergillus calidoustus*, *Penicillium* cf. *griseofulvum* e *Sphaerobolaceae* sp.). As comunidades endofíticas da raiz e cladódio compartilharam 3 OTUs: *Fusarium oxysporum*, *Hypocreaceae* sp. 1 e *Phoma* sp. 3 (Tabela 3; Figura 9).

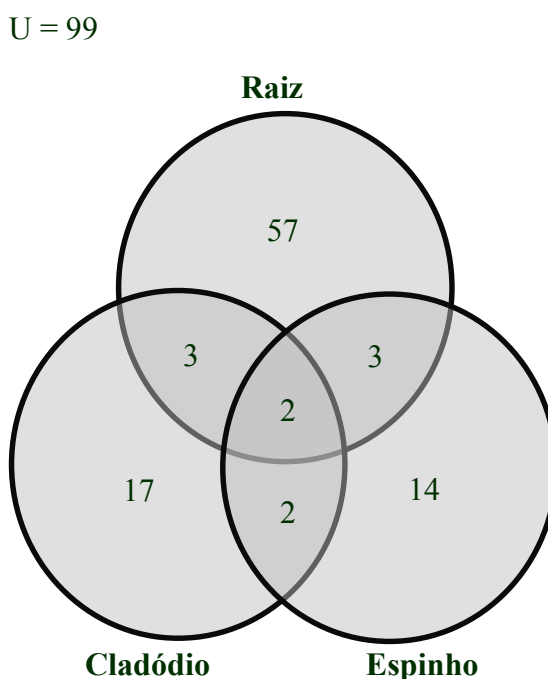


Figura 9 Compartilhamento de espécies fungos endofíticos entre partes da planta *Melocactus ernestii*. Valores representam riqueza de espécies. Números nas interseções correspondem às espécies de fungos endofíticos que co-ocorrem entre as partes da planta. (U) representa o conjunto universo ou todas as espécies de fungos. Ver Tabela 3 para nomes dos táxons endofíticos.

A distribuição dos isolados no cladódio, espinho e raiz mostrou-se homogênea com baixa dominância, como demonstrado pelos valores do índice de Simpson e a equitabilidade (Tabela 5). Os valores do índice de Margalef (>5) indicaram alta diversidade para as comunidades de fungos endofíticos, sendo a raiz a comunidade com maior diversidade (Tabela 5). As curvas de abundância foram congruentes com os valores dos índices de diversidade α (Figura 10). A comunidade endofítica associada à raiz apresentou maior distribuição proporcional das OTUs. *Cochliobolus eragrostidis* (5,3%), *Fusarium oxysporum* (5,3%) e *Fusarium solani* (3,4%) apresentaram as maiores abundâncias e foram as OTUs dominantes na raiz de *M. ernestii*. Na comunidade de endofíticos associada aos cladódios, *Mycoleptodiscus indicus* (4,4%) e *Aureobasidium pullulans* (2,5%) foram as OTUs dominantes. Para a comunidade do espinho, *Preussia* sp. 1 (6%) e *Sphaerobolaceae* sp. (4,1%) foram as OTUs dominantes (Figura 10; Tabela 3).

Tabela 5 Comparação entre medidas de diversidade de Unidades Taxonômicas Operacionais de fungos endofíticos para os diferentes nichos (i.e. cladódio, espinho e raiz) da espécie *Melocactus ernestii*.

Diversidade	Partes da Planta		
	Cladódio	Espinho	Raiz
Riqueza	24	21	65
Isolados	55	48	209
Diversidade α			
Dominance_D	0,11	0,16	0,03
Simpson_1-D	0,89	0,84	0,97
Margalef	5,74	5,17	12,17
Diversidade β			
Cladódio	0	0,65	0,85
Espinho	0,65	0	0,84
Raiz	0,85	0,84	0

Os valores de diversidade β variaram entre 65 e 85% evidenciando que o cladódio, o espinho e a raiz apresentaram comunidades diferentes. Este resultado pode ser observado pelo número aproximado da riqueza de espécies entre cladódio e espinho, associado a um número proporcionalmente baixo de espécies compartilhadas entre as três partes da planta (Tabela 5).

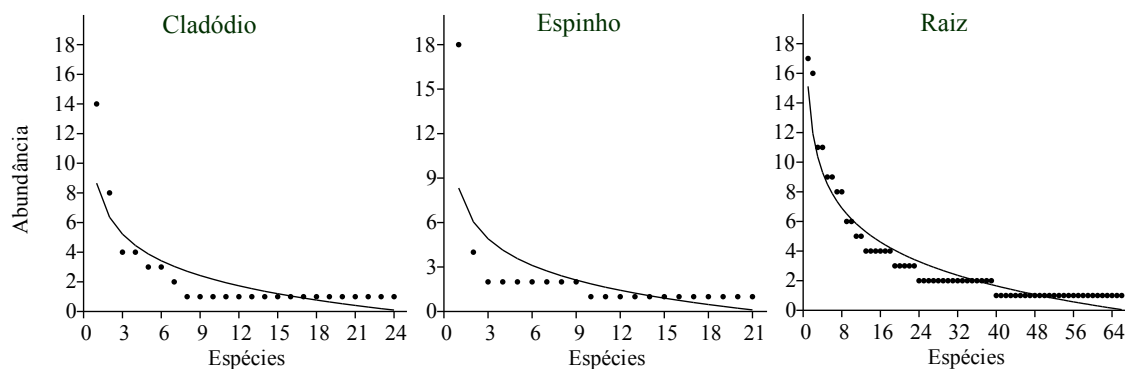


Figura 10 Curvas de abundância das espécies detectadas nas partes da planta *Melocactus ernestii*: cladódio, espinho e raiz. Pontos representam as espécies de fungos endofíticos no eixo vertical. O eixo horizontal ordena as espécies em ordem hierárquica, da mais a menos comum. Ver tabela 3 para singletos e demais espécies de fungos endofíticos.

Os resultados da diversidade β puderam ser corroborados pela análise de agrupamento, onde foram verificados dois grupos: um grupo formado somente por raiz; e outro grupo formado pelas comunidades mais similares: cladódio e espinho (Figura 11). Dentre os isolados do filo Ascomycota e subfilo Pezizomycotina, a classe com maior abundância foi Sordariomycetes (37,3%) representada pelas ordens Xylariales (*Amphisphaeriaceae* e *Xylariaceae*), Sordariales (*Chaetomiaceae* e *Sordariaceae*), Hypocreales (*Hypocreaceae* e *Nectriaceae*), Diaporthales (*Diaporthaceae*), Coniochaetales (*Coniochaetaceae*), Chaetosphaeriales (*Chaetosphaeriaceae*), Glomerellales (*Glomerellaceae*), Microascales (*Halosphaeriaceae*) e Magnaporthales (*Magnaporthaceae*). A classe Dothideomycetes foi representada pelas ordens Pleosporales (*Didymellaceae*, *Montagnulaceae*, *Phaeosphaeriaceae*, *Pleosporaceae*, *Sporormiaceae*), Capnodiales (*Cladosporiaceae*, *Mycosphaerellaceae*, *Teratosphaeriaceae*), Botryosphaeriales (*Botryosphaeriaceae*), Dothideales (*Dothioraceae*) e a espécie *Sclerostagonospora* sp. e *Rhizopycnis vagum* com a família e ordem descritas como *incertae sedis*. Essa classe foi a segunda mais diversa (33,8%) em relação à composição das espécies. As ordens Eurotiales (*Aspergillaceae*), Chaetothyriales (*Chaetothyriaceae* e *Herpotrichiellaceae*) e Verrucariales (*Verrucariaceae*) representadas pela classe Eurotiomycetes (11,7%). E a classe com menor abundância foi Pezizomycetes (0,6%) representada pela ordem Pezizales (*Pyronemataceae*). O subfilo Saccharomycotina foi representado por um singleto da classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales (*Candida parapsilosis*). O filo Basidiomycota foi representado somente pela classe Agaricomycetes com abundância de 9,1%, ordens Cantharellales (*Ceratobasidiaceae*), Agaricales (*Agaricomycetidae* e *Tricholomataceae*) e Geastrales (*Sphaerobolaceae*).

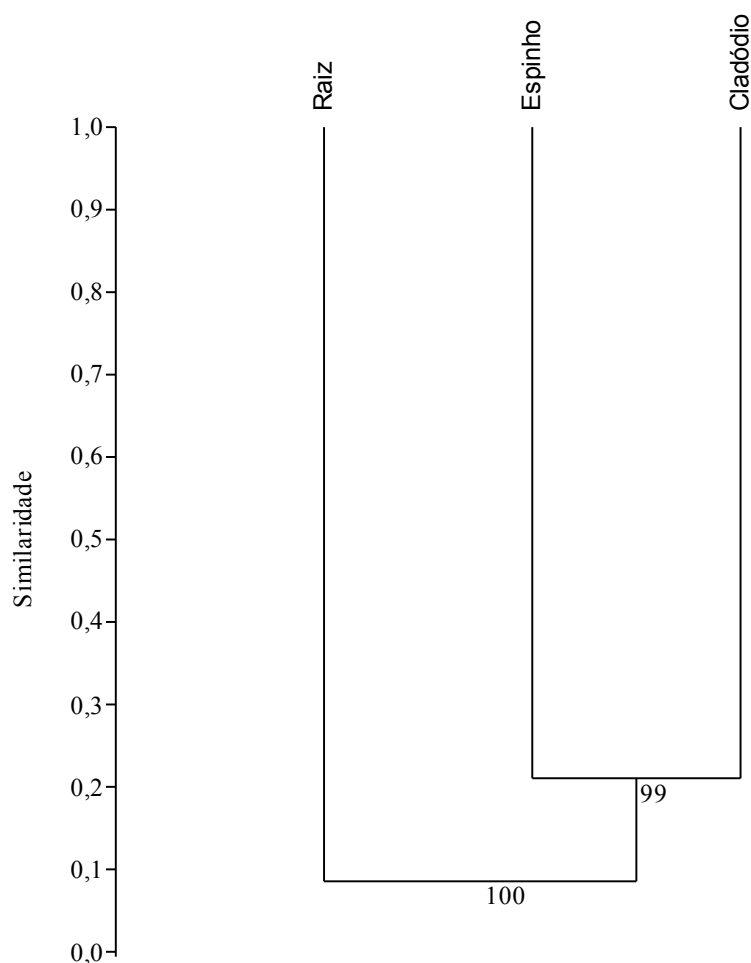


Figura 11 Dendrograma de similaridade baseado na matriz de abundância das comunidades endofíticas prospectadas em diferentes partes de *Melocactus ernestii*. A análise de agrupamento foi obtida pelo coeficiente de similaridade de Jaccard, método de ligação simples. Correlação cofenética = 0,999. Valor de *bootstrap* a partir de 5.000 repetições.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DE DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Opuntia humifusa*

5.2.1 Identificação de fungos endofíticos isolados de *Opuntia humifusa*

Ao final do processo de isolamento foram identificados 17 espécies de fungos endofíticos (Tabela 6; Figura 12,13, 14, 15 e 16). As análises de Máxima Parcimônia baseada na região ITS mostrou forte suporte (*bootstrap* $\geq 94\%$) para os clados contendo *Biscogniauxia mediterranea*, *Curvularia protuberate* e *Epicoccum nigrum* (Figura 13-b, d, e). Em contraste, as análises da região ITS para os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Paraconiothyrium*, *Pestalotiopsis* e *Phoma* não receberam suporte (Figura 13-a, c, f, g e h) e as sequências TEF1 e/ou β -butulina desses táxons, exceto *Cladosporium*, mostraram baixa similaridade quando

comparadas com sequências depositadas no GenBank e foram identificados em nível de gênero. As sequências TEF1 dos isolados de *Cladosporium* foram analisadas e os táxons *Cladosporium* cf. *asperulatum* e *Cladosporium* *funiculosum* foram identificados (Figura 14-b). A amplificação do gene TEF1 falhou para os oito isolados de *Cladosporium* sp., portanto, a posição filogenética desse grupo, relativa a este gene, permaneceu em gênero.

As árvores filogenéticas para o gênero *Diaphorte* geradas pelas análises de inferência Bayesiana e de Máxima Parcimônia apresentaram topologia muito similar (Figura 16-a, b). Os isolados do grupo *Diaphorte* sp. formaram um clado monofilético com alto suporte (probabilidade posterior e *bootstrap* $\geq 99\%$).

O isolado bioativo de *Alternaria* sp. 3 Ohu 13A1, cujo extrato foi selecionado para o fracionamento químico biomonitorado, apresentou informações inconclusivas na análise filogenética da região ITS e TEF1 em comparação a sequências de espécies tipo, de coleções de cultura e/ou publicadas em jornais indexados, bem como apresentou baixa similaridade com sequências de fungos depositadas no GenBank. A amplificação do gene β -butulina falhou para esse isolado e, portanto a identificação permaneceu em nível de gênero. Para identificar esse fungo, técnicas de macro e microcultivo foram realizadas. As colônias de *Alternaria* sp. 3 Ohu 13A1 apresentaram colônias marrom-escuro acinzentadas, com diâmetros de até 6 cm, em sete dias, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ nos meios BDA e AEM. Os conídios foram observados em cadeias (2-7), com 1-4 septos transversais e 1 septo longitudinal, com comprimento médio de 20 μm (15 - 24,7 μm) e largura média de 8,5 μm (5,6 - 11,5 μm). Baseado nestas características *Alternaria* sp. 3 Ohu 13A1 foi identificado como *Alternaria* cf. *arborescens* (Figura 17).

Tabela 6 Identificação molecular dos fungos endofíticos associados aos cladódios de *Opuntia humifusa*: identificação conduzida usando BLASTn da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2), do gene do fator de alongamento (TEF1) e o gene da β -tubulina.

Código Ohu	No. de isolados	Resultado Top BLAST [n° de acesso do GenBank]	Cobertura (%)	Identidade (%)	No. de pb sequenciados e analisados	Espécie ou grupo taxonômico proposto [n° de acesso do GenBank]
5B1	29	<i>Aureobasidium pullulans</i> [FN824492]	100	100	526	<i>Aureobasidium pullulans</i> [KF850387] ^b
13A1 ^e	18	<i>Alternaria alternata</i> [KF438091]	100	100	519	<i>Alternaria</i> sp. 3 [KJ471579] ^b [KR023652] ^c
8A ^e	14	<i>Diaporthe phaseolorum</i> [EU301113]	100	99	519	<i>Diaporthe</i> sp. [KF850394] ^b [KR023657] ^c [KR023649] ^d
26A ^e	10	<i>Alternaria alternata</i> [JQ070079]	100	100	540	<i>Alternaria</i> sp. 4 [KF850386] ^b [KR023651] ^c
7A ^e	9	<i>Alternaria alternata</i> [KC959211]	100	100	516	<i>Alternaria</i> sp. 2 [KF850385] ^b
2B ^e	8	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [JQ768318]	100	100	549	<i>Cladosporium</i> sp. [KF850389] ^b
2A ^e	5	<i>Cochliobolus</i> sp. [JX960581]	100	100	570	<i>Curvularia protuberata</i> [KF850392] ^b
17C1 ^e	4	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [JX981454]	100	100	523	<i>Cladosporium funiculosum</i> [KF850391] ^b [KR023656] ^c
17A ^e	2	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i> [EU821483]	100	99	570	<i>Paraconiothyrium</i> sp. [KF850396] ^b
18B1 ^e	2	<i>Pestalotiopsis clavispora</i> [KC537808]	100	100	461	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [KF850397] ^b
4B ^e	1	<i>Alternaria alternata</i> [KC692221]	100	100	550	<i>Alternaria</i> sp. 1 [KF850384] ^b [KR023650] ^c
8B2 ^e	1	<i>Alternaria alternata</i> [KF155521]	100	100	504	<i>Alternaria</i> sp. 5 [KJ471580] ^b [KR023653] ^c
19B ^f	1	<i>Biscogniauxia mediterranea</i> [EF026134]	100	100	530	<i>Biscogniauxia mediterranea</i> [KF850388] ^b [KR023654] ^c [KR023648] ^d
2C1 ^e	1	<i>Cladosporium bruhnei</i> [KC461496]	99	99	551	<i>Cladosporium</i> cf. <i>asperulatum</i> [KF850390] ^b [KR023655] ^c
7B	1	<i>Cryptococcus flavescens</i> [KC679297]	100	100	409	<i>Cryptococcus flavescens</i> [KF850393] ^b
23A ^f	1	<i>Epicoccum nigrum</i> [KC164754]	100	100	435	<i>Epicoccum nigrum</i> [KF850395] ^b
11B ^e	1	<i>Phoma novae-verbascicola</i> [KC411473]	100	100	515	<i>Phoma</i> sp. [KF850398] ^b

^a Código dos fungos endofíticos isolados de *Opuntia humifusa*.

^b Sequências da região transcrita interna depositadas no GenBank.

^c Sequências de do gene do fator de alongamento, depositadas no GenBank.

^d Sequências de β -tubulina, depositadas no GenBank.

^e Posição taxonômica sugerida por análises filogenéticas.

^f Posição taxonômica confirmada por análises filogenéticas.

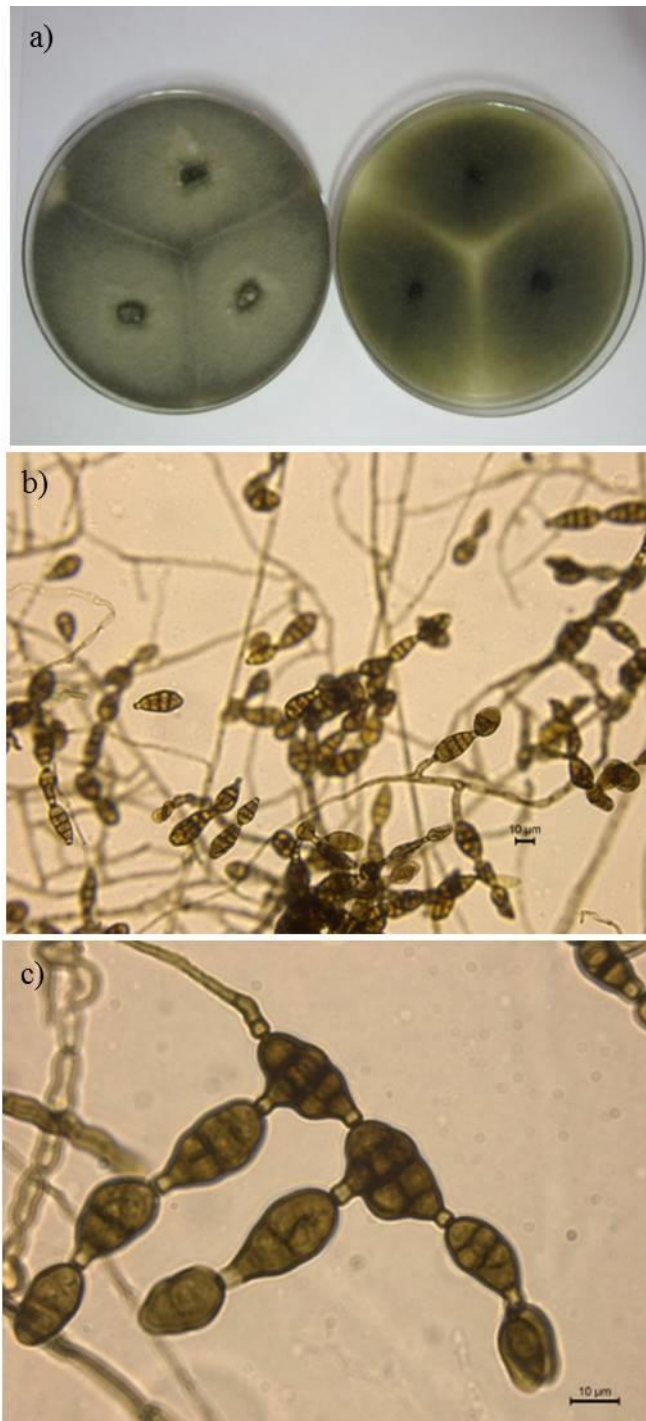
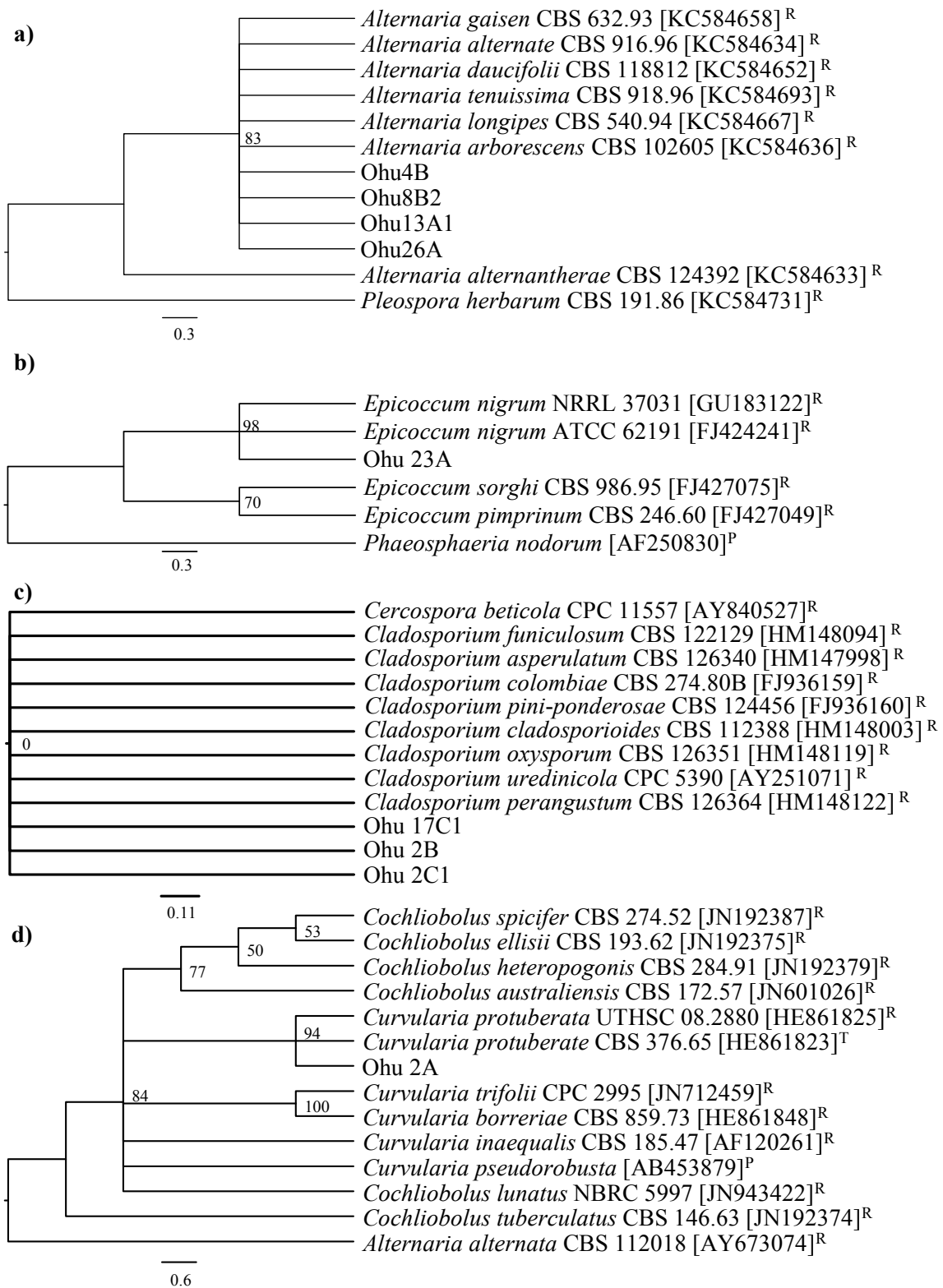


Figura 12 *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1: **a)** crescimento em meio Ágar batata dextrose (esquerda) e em meio Ágar extrato de malte (direita), **b)** conídeos sob objetiva 40x, **c)** conídeos sob objetiva 100x.



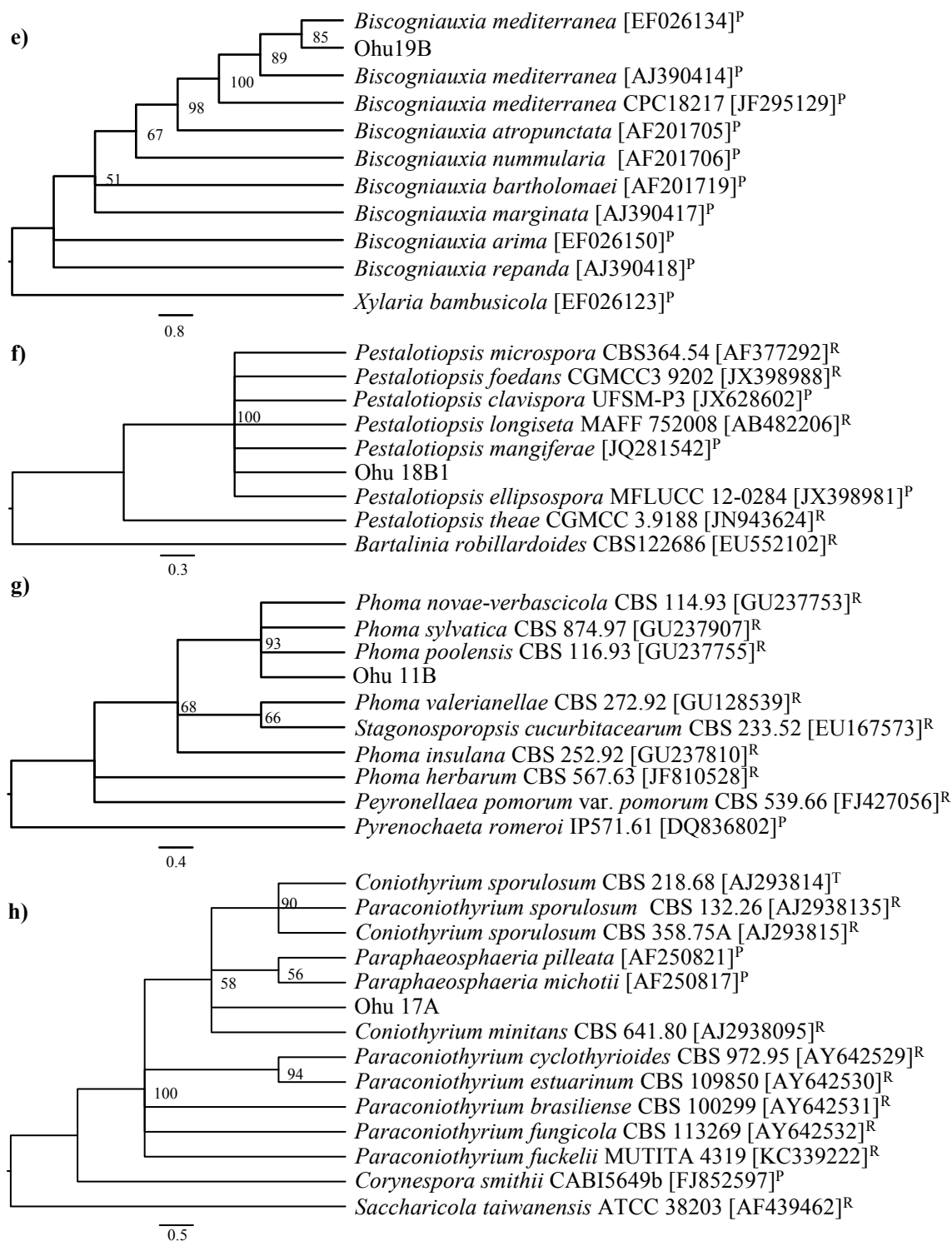


Figura 13 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia da região transcrita interna de fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa*: **a)** *Alternaria*, **b)** *Epicoccum*, **c)** *Cladosporium*, **d)** *Curvularia*, **e)** *Biscogniauxia*, **f)** *Pestalotiopsis*, **g)** *Phoma* e **h)** *Paraconiothyrium*. R = sequências de isolados depositados em Coleções de Culturas internacionais; P = sequências de isolados publicadas em jornais indexados.

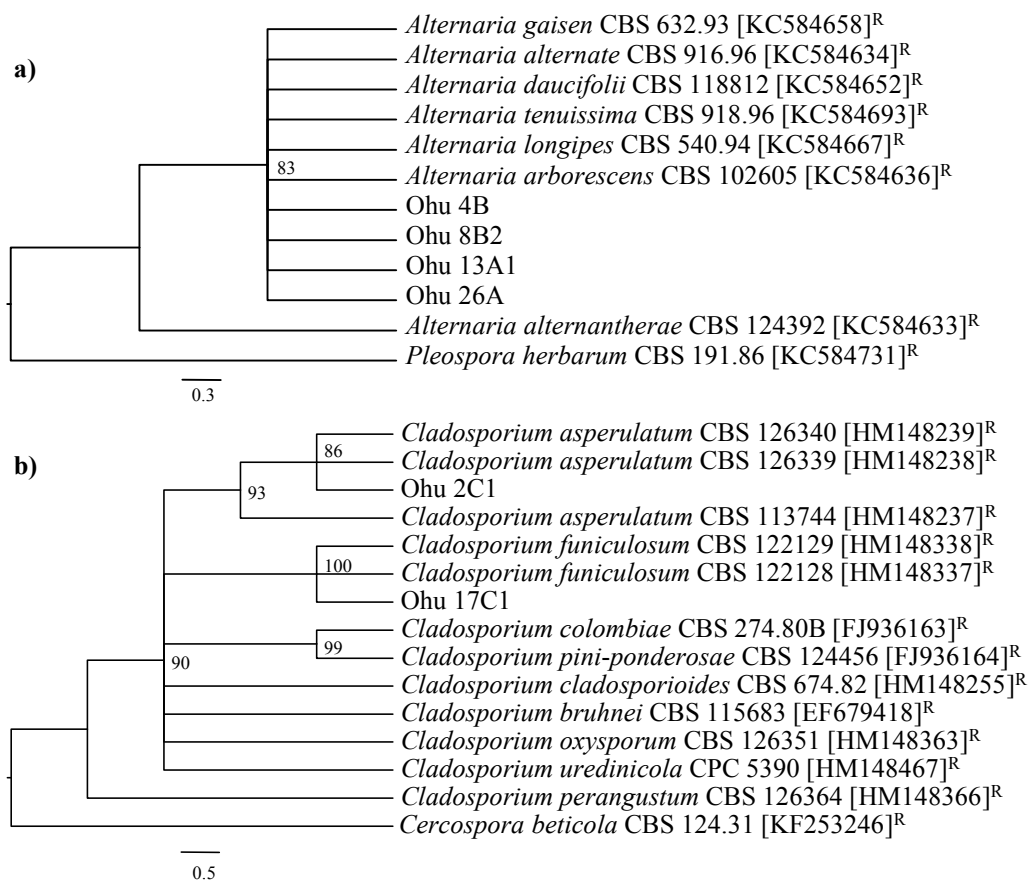


Figura 14 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia do gene do fator de alongamento de fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa*: **a)** *Alternaria* e **b)** *Cladosporium*. R = sequências de isolados depositados em Coleções de Culturas internacionais.

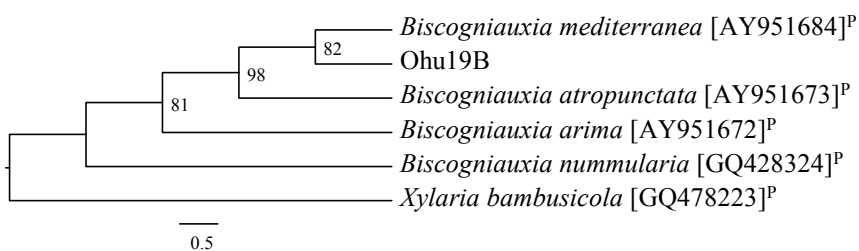


Figura 15 Árvores filogenéticas a partir da análise Máxima Parcimônia do gene da β -tubulina do fungo endofítico *Biscogniauxia mediterranea* associado à *Opuntia humifusa*. P = sequências de isolados publicadas em jornais indexados.

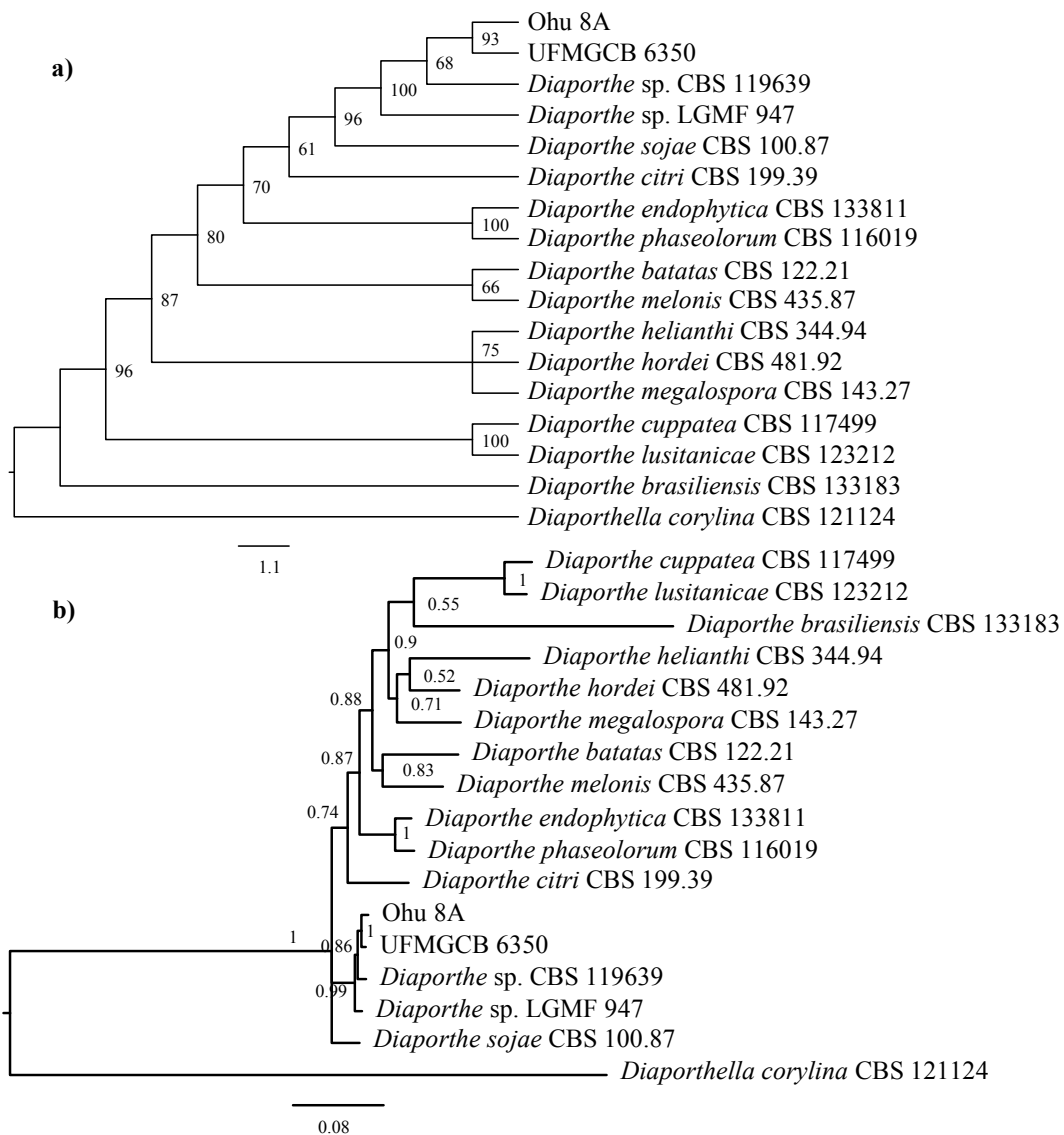


Figura 16 Árvores filogenéticas a partir da análise **(a)** Máxima Parcimônia e **(b)** Bayesiana de sequências combinadas da região transcrita interna, do gene do fator de alongamento e da β -tubulina do fungo endofítico *Diaporthe* sp. associado à *Opuntia humifusa*.

5.2.2 Análise de diversidade de fungos endofíticos isolados de *Opuntia humifusa*

A partir de 180 fragmentos, o total de 108 fungos endofíticos foi isolado de 34 das 36 plantas analisadas (sítio 1 = 46 e sítio 2 = 62 isolados). Dezesete espécies de fungos associados foram obtidos dos tecidos de *O. humifusa*, com índice de Margalef = 3,4 indicando moderada diversidade dentro da comunidade de fungos endofíticos. A curva de acumulação de espécies ficou próxima da estabilização, os estimadores indicando que a amostragem não foi “representativa” (Figura 17). Os estimadores de riqueza *Chao 1* ($17 \pm 3,94$) e *Jackknife 1* ($17,5 \pm 2,46$) indicaram que praticamente todas as espécies foram coletadas e, segundo o estimador *Bootstrap* ($20,1 \pm 1,7$), cerca de três espécies poderiam ter sido coletadas a mais, enquanto *Jackknife 2* ($31,3 \pm 4,24$) indicou estimativas de riquezas de espécies superiores às observadas, neste caso, estes dados evidenciam que um maior esforço amostral poderia aumentar o número de espécies nas áreas amostradas.

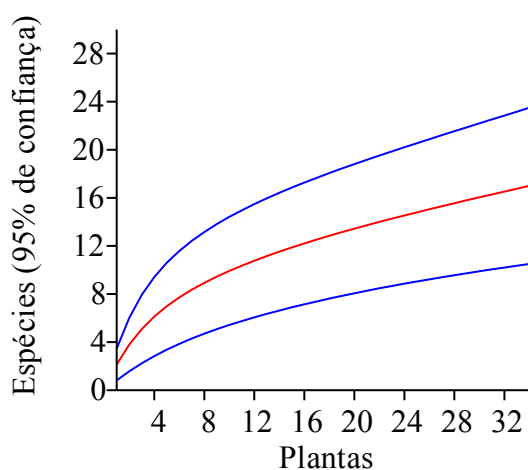


Figura 17 Curva de acumulação de espécies da comunidade de fungos endofíticos associada à *Opuntia humifusa* (linha vermelha), intervalos de confiança de 95% (linhas em azul), baseado em 2000 réplicas de *bootstrap*.

A distribuição dos isolados entre as 17 OTUs mostrou-se homogênea com baixa dominância, como demonstrado pelo Índice de Simpson (0,14) e a equitabilidade (0,85). As curvas de abundância foram congruentes com os valores dos índices de diversidade α , onde a maioria das espécies apresentou abundância com valores intermediários ou baixos, quando comparados com as poucas espécies com altos valores de abundância (Figura 18).

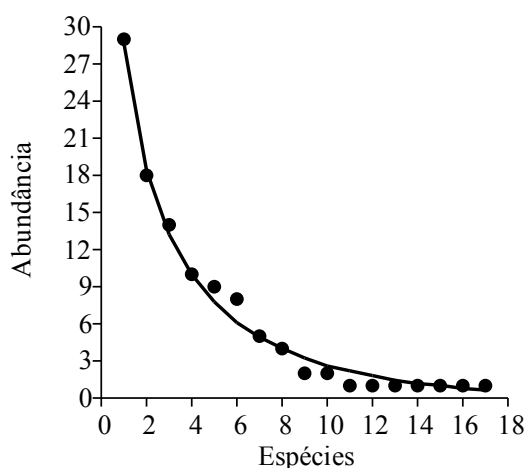


Figura 18 Curva de abundância das OTUs detectadas nos cladódios de *Opuntia humifusa*. Pontos representam as espécies (OTUs) de fungos endofíticos no eixo vertical. O eixo horizontal representa a abundância.

No cladódio três espécies foram dominantes (*Alternaria* cf. *arborescens*, *Aureobasidium pullulans* e *Diaporthe* sp.), representando 61 (55%) do total de isolados. Em contraste, 11,76% das espécies (*Paraconiothyrium* sp. e *Pestalotiopsis* sp.) foram representadas por dois isolados, enquanto 47,05% das espécies (*Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 5, *Biscogniauxia mediterranea*, *Cladosporium* cf. *asperulatum*, *Cryptococcus flavescens*, *Epicoccum nigrum* e *Phoma* sp.) foram únicas (singletos), representadas por apenas um isolado.

O sítio 1 foi mais diversificado e apresentou oito espécies exclusivas (*Alternaria* sp. 1, *Alternaria* sp. 5, *Cladosporium funiculosum*, *Curvularia protuberata*, *Cryptococcus flavescens*, *Paraconiothyrium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Phoma* sp.), enquanto o sítio 2 com três espécies exclusivas (*Alternaria* sp. 4., *Biscogniauxia mediterranea*, *Epicoccum nigrum*) contribuiu menos para a diversidade α . Seis espécies foram comuns a ambos os sítios (*Alternaria* cf. *arborescens*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Cladosporium funiculosum* e *Diaporthe* sp.).

Dentre os isolados do filo Ascomycota, a classe com maior abundância foi Dothideomycetes (81,25%) representada pelas ordens Pleosporales (*Alternaria*, *Epicoccum*, *Paraconiothyrium* e *Phoma*), Capnodiales (*Cladosporium*) e Dothideales (*Aureobasidium*). A classe Sordariomycetes (18,75%), representada pelas ordens Xylariales (*Biscogniauxia* e *Pestalotiopsis*) e Diaporthales (*Diaporthe*), foi encontrada como componente minoritário nas comunidades fúngica. A espécie *Cryptococcus flavescens* foi única representante do filo Basidiomycota.

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS

5.3.1 *Melocactus ernestii*

Os extratos obtidos a partir dos cladódios, raízes e espinhos de *M. ernestii* não apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto cinco extratos dos fungos endofíticos inibiram pelo menos um dos micro-organismos alvos (Tabelas 6). Não foi detectada a inibição dos extratos fúngicos contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Apenas o extrato de *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*. Os isolados *Fusarium solanii* UFMGCB 5689 e 5865 demonstraram atividade antifúngica seletiva contra *Cl. sphaerospermum*, com inibição de 78,7 e 96,6%, respectivamente. Os extratos dos *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347 e *Phoma* sp. UFMGCB 6409 apresentaram atividade antifúngica contra *C. krusei* (com inibição de 100 e 97%, respectivamente) e *Cl. sphaerospermum* (com inibição de 100 e 94,9%, respectivamente).

Os cinco isolados bioativos foram re-cultivados e, posteriormente, produzidos seus extratos hidro-alcóolicos e diclorometânicos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os extratos, hidro-alcóolico e diclorometânico, de *Fusarium solanii* UFMGCB 5689 perderam a atividade antimicrobiana após o re-cultivo. O extrato diclorometânico do isolado *Phoma* sp. UFMGCB 6409 apresentou porcentagem de inibição $\leq 70\%$ a 250 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Cl. sphaerospermum*, enquanto o extrato hidro-alcóolico não apresentou atividade antimicrobiana após o re-cultivo (Tabela 8). Além disso, os extratos diclorometânicos dos isolados *F. solanii* UFMGCB 5685, *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347 e *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 apresentaram os valores da CIM inferiores aos valores encontrados para os extratos hidro-alcóolicos (Tabela 8).

Os quatro extratos diclorometânicos que apresentaram atividade antimicrobiana após o re-cultivo foram produzidos em larga escala e selecionados para estudos de desreplicação a fim de caracterizar e, posteriormente, isolar e identificar seus metabólitos bioativos. Estes experimentos foram realizados como parte do estágio de doutorado sanduíche no *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* (ARS/NPURU/USDA).

Tabela 7 Atividade antimicrobiana dos extratos dos fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii* com inibição acima de 70%.

¹ UFMGCB	Táxon	Inibição (%)					
		Bactérias			Leveduras		Fungo Filamentoso
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. sphaerosperum</i>
5685	<i>Fusarium solanii</i>	-	-	-	-	-	78,7 ± 57
5689	<i>Fusarium solanii</i>	-	-	-	-	-	96,6 ± 28
6347	<i>Bartalinia</i> sp.	-	-	-	-	100 ± 12	97 ± 51
6350	<i>Diaporthe</i> sp.	71,7 ± 0	-	-	-	-	-
6409	<i>Phoma</i> sp.	-	-	-	-	100 ± 2	94,9 ± 2
Controles	Cloranfenicol	100 ± 0	-	-	-	-	-
	Benomil	--	--	--	--	--	96 ± 1,9
	Anfotericina B	--	--	--	100 ± 1	100 ± 2	--

¹UFMGCB = Código da Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; *E. coli* = *Escherichia coli* ATCC 11775; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus* ATCC 12600; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; *C. albicans* = *Candida albicans* ATCC 60193, *C. krusei* = *Candida krusei* ATCC 6258; *C. sphaerosperum* = *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740; "--" = não ativo; "--" não testado; "*" isolado não identificado.

Tabela 8 Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) e porcentagem de inibição dos extratos hidro-alcóolicos e diclorometânicos dos extratos bioativos de fungos associados à *Melocactus ernestii*.

¹ UFMGCB	Táxon	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)/Inibição (%)					
		<i>E. coli</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. sphaerosperum</i>	
		H ₂ O-EtOH ²	DCM ³	H ₂ O-EtOH ²	DCM ³	H ₂ O-EtOH ²	DCM ³
5685	<i>Fusarium solanii</i>	-	-	-	-	125 ⁴ (97,6 \pm 4,8) ⁵	31,5 ⁴ (91 \pm 1,3) ⁵
5689	<i>Fusarium solanii</i>	-	-	-	-	250 ⁴ (11 \pm 0,2) ⁵	250 ⁴ (17,4 \pm 0,5) ⁵
6347	<i>Bartalinia</i> sp.	-	-	250 ⁴ (88,3 \pm 1,9) ⁵	15,6 ⁴ (104,6 \pm 1,7) ⁵	250 ⁴ (99,3 \pm 1) ⁵	62,5 ⁴ (92,7 \pm 15,5) ⁵
6350	<i>Diaporthe</i> sp.	250 ⁴ (98,6 \pm 3,7) ⁵	125 ⁴ (98,3 \pm 5,6) ⁵	-	-	-	-
6409	<i>Phoma</i> sp.	-	-	250 ⁴ (0 \pm 0,2) ⁵	250 ⁴ (0 \pm 0,5) ⁵	250 ⁴ (39,3 \pm 1) ⁵	250 ⁴ (70,4 \pm 5,5) ⁵
Controles	Cloranfenicol		97 \pm 0	--	--	--	--
	Benomil	--	--	--	--		95 \pm 2
	Anfotericina B	--	--		100 \pm 2	--	--

¹UFMGCB = Código da Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; H₂O-EtOH² = extrato hidro-alcóolico; DCM³ = extrato diclorometânico; ⁴ = concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); ⁵ = porcentagem de inibição. *E. coli* = *Escherichia coli* ATCC 11775; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus* ATCC 12600; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145; *C. albicans* = *Candida albicans* ATCC 60193, *C. krusei* = *Candida krusei* ATCC 6258; *C. sphaerosperum* = *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740; "--" = não ativo; "--" = não testado.

Inicialmente os extratos *Fusarium solanii* UFMGCB 5865, *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347, *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 e *Phoma* sp. UFMGCB 6409 foram submetidos à bioautografia para avaliação da atividade antifúngica contra fungos de interesse na agricultura. Estes extratos foram testados a 160 µg frente aos fitopatógenos *Colletotrichum acutatum*, *Co. fragariae* e *Co. gloeosporioides*, agentes causais da antracnose em vegetais. O extrato de *Phoma* sp. UFMGCB 6409 apresentou zonas claras de inibição frente ao crescimento de todos os micro-organismos alvos de até 12 mm de diâmetro; os extratos de *Fusarium solanii* UFMGCB 5865 e *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 inibiram o crescimento de *Co. fragariae* e *Co. gloeosporioides* (com halos de até 22 mm de diâmetro) e geraram zonas difusas para *Co. acutatum*; e o extrato do isolado *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347 gerou zonas difusas para todos os micro-organismos alvos testados (Tabela 9).

Tabela 9 Atividade antifúngica de extratos dos fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii* por meio do ensaio de bioautografia contra três espécies *Colletotrichum*.

Extratos (160 µg)	Táxon	Média das zonas de inibição (mm) ± DP*		
		<i>Colletotrichum fragariae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
5685	<i>Fusarium solanii</i>	5 ± 0	5 ± 0	zona difusa
6347	<i>Bartalinia</i> sp.	zona difusa	zona difusa	zona difusa
6350	<i>Diaporthe</i> sp.	6 ± 0,5	22 ± 1	zona difusa
6409	<i>Phoma</i> sp.	7 ± 0	12 ± 0	6 ± 0,7
Controles	Benomil	18 ± 0	15 ± 0	0 ± 0
	Ciprodinil	zona difusa	20 ± 2	zona difusa
	Azoxistrobina	zona difusa	22 ± 0	zona difusa
	Captan	22 ± 2	15 ± 0,5	16 ± 1,5

Análises dos espectros de RMN de ¹H dos extratos bioativos foram realizadas e indicaram a presença majoritária de ácidos graxos nos extratos dos isolados *Fusarium solanii* UFMGCB 5865 e *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347 (Apêndice A). Esses extratos foram submetidos à Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-FID) e foi confirmada a presença de misturas de ácidos graxos (Tabela 10). O ácido palmítico foi majoritário para os extratos analisados, seguido do ácido oléico e do ácido pentadecanóico para *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347 e ácido linoléico e ácido oléico (Tabela 10).

As análises dos espectros de RMN de ¹H do extrato de *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 (Apêndice A) indicaram a presença de hidrogênios aromáticos e ausência de ácidos

graxos, e então selecionado para o fracionamento biomonitorado. O isolado *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 foi cultivado em larga escala em utilizadas 100 placas de Petri contendo o meio BDA, com rendimento de 800 mg de extrato diclorometânico. Nas análises de CCD, o extrato foi dissolvido a 1 mg/mL em DCM e conduzidas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Acetato de Etila/Hexano 80:20, Hexano/Éter 50:50, Hexano/Acetato de Etila 50:50 e Hexano/Acetato de Etila 80:20. Após a revelação em câmara de UV e com o revelador Godin a melhor condição foi obtida com a mistura Acetato de Etila/Hexano 80:20.

Tabela 10 Quantificação de ácidos graxos (%) produzidos por fungos endofíticos associados à *Melocactus ernestii*.

Ácidos graxos	Extratos brutos	
	<i>Bartalinia</i> sp. UFMGCB 6347	<i>Fusarium solani</i> UFMGCB 5685
Caprílico (8:0)	-	0,62
Cáprico (10:0)	0,15	-
Láurico (12:0)	0,33	-
Mirístico (14:0)	2,79	-
Miristoleico (14:1)	0,59	-
Pentadecanóico (15:0)	11,42	-
Palmítico (16:0)	40,87	40,54
Palmitoléico (16:1)	-	0,49
Heptadecanóico (17:0)	3,11	-
Cis-10-Hepadecenóico (17:1)	7,54	-
Estearico (18:0)	4,36	7,25
Elaídico (18:1n9t)	0,20	-
Oléico (18:1n9c)	19,74	14,5
Linolelaídico (18:2n6t)	-	0,29
(LA) Linoléico (18:2n6c)	3,68	36,2
Pinolênico (18:3n6)	0,95	-
Araquídico (20:0)	1,23	-
Estearidônico (18:4n3)	0,22	-
cis-8,11,14-Eicosatrienóico (20:3n6)	0,36	-
Eicosatrienóico (20:3n3)	1,83	-
Erúico (22:1n9)	0,55	-

“-” = ausência de ácidos graxos.

As análises dos espectros de RMN de ¹H do extrato de *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 (Apêndice A) indicaram a presença de hidrogênios aromáticos e ausência de

ácidos graxos, o qual foi então selecionado para o fracionamento biomonitorado. O isolado *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 foi cultivado em larga escala em utilizadas 100 placas de Petri contendo o meio BDA, com rendimento de 800 mg de extrato diclorometânico. Nas análises de CCD, o extrato foi dissolvido a 1 mg/mL em DCM e conduzidas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Acetato de Etila/Hexano 80:20, Hexano/Éter 50:50, Hexano/Acetato de Etila 50:50 e Hexano/Acetato de Etila 80:20. Após a revelação em câmara de UV e com o revelador Godin a melhor condição foi obtida com a mistura Acetato de Etila/ Hexano 80:20.

A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). O processo teve início com 409,4 mg de extrato de *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 foi dissolvido em 2 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge correndo a 40 mL/min, com modo de detecção UV a 254nm e 365nm, com o gradiente Hexano/Acetato de Etila 20:100, utilizando 2300 mL dos solventes.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida à CCD (Acetato de Etila/Hexano 80:20), e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em 6 frações [(1), 1-63, 17 mg; (2), 64-79, 178,7 mg; (3), 80-81, 1,5 mg; (4), 82-88, 45,1 mg; (5), 89-96, 12,8 mg; (6), 97-105, 2,6 mg, as quais foram concentradas em rota vapor e então submetidas ao ensaio antifúngico (bioautografia), sendo testadas sob as concentrações 10 e 100 µg.

A fração 2 inibiu o crescimento de *Co. fragarie*, *Co. gloerosporioides* a 10 µg, com halos de 4 e 9 mm, respectivamente, e 100 µg, com halos de 6 e 11 mm, respectivamente. A fração 2 gerou zona difusa para *Co. acutatum*, enquanto as demais frações apresentaram zonas difusas para todos os micro-organismos alvos avaliados. Os sinais obtidos de RMN de ¹H e ¹³C para a fração 2, juntamente com os dados obtidos a partir do LC-MS/MS, como fórmula molecular (*m/z* 494.22906 [M+H]⁺, calculado para C₂₈H₃₂N₁O₇, 494.21788; *m/z* 492.20808 [M-H]⁻, calculado para C₂₈H₃₀N₁O₇, 492.20223) permitiram identificar a molécula ativa como citocalasina H (Apêndice B). Os dados de RMN foram similares aos dados encontrados na literatura, descritos por Tao et al. (2008), corroborando a identificação da citocalasina H (Figura 19).

então submetidas ao ensaio antifúngico (bioautografia), sendo testadas sob as concentrações 10 e 100 µg.

As frações 11 e 12 inibiram o crescimento de *Co. fragarie* a 10 µg, com halos de 4 mm de diâmetro; a 100 µg as frações 11 e 12 inibiram *Co. fragarie* com halos de 5 mm de diâmetro e *Co. gloerosporioides* com halos de 10 e 15 mm de diâmetro, respectivamente. As demais frações apresentaram zonas difusas frente a todos os alvos testados, exceto a fração 1 que não apresentou atividade.

Com base no rendimento e na bioatividade, as frações 11 e 12 foram submetidas a RMN de ¹H, os quais indicaram a presença de hidrogênios aromáticos. As frações 11 e 12 foram solubilizadas a 1 mg/mL em DCM e submetidas as CCD conduzidas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Hexano/Éter 50:50, Clorofórmio/Acetona 80:20, Hexano/Isopropanol 80:20, Hexano/Acetato de Etila 60:40, Hexano/Acetato de Etila 70:30 e Hexano/Acetato de Etila 80:20. Após a revelação em câmara de UV e revelador Godin a melhor condição foi obtida com a mistura Hexano/Acetato de Etila 80:20.

As frações 11 e 12 foram submetidas à cromatografia em coluna em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). 45 mg da fração 11 e 65 mg da fração 12 de extrato foram separadamente solubilizadas em 1 mL de DCM e individualmente adsorvidas a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada no Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge correndo a 40 mL/min, com modo de detecção UV a 280 nm e 300 nm, com o gradiente Hexano/Acetato de Etila, em 3 etapas: (1) 0:0 até 0:15 utilizando 396 mL, (2) 0:15 até 0:50 utilizando 2700 mL, e (3) 0:50 até 0:100 utilizando 315 mL.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 15 mL em tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida a CCD (Hexano/Acetato de Etila 8:2 e Hexano/Acetato de Etila 5:5), e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em 7 sub-frações para a fração 11 [(11.1), 1-64, 4,2 mg; (11.2), 65-73, 19,8 mg; (11.3), 74-77, 16,8 mg; (11.4), 78-88, 31,4 mg; (11.5), 89-139, 4 mg; (11.6), 140-141, 8,3 mg; e (11.7), 142-207, 4 mg] e 16 sub-frações para a fração 12 [(12.1), 1-11, 3,6 mg; (12.2), 12-13, 2,3 mg; (12.3), 14-16, 2,5 mg; (12.4), 17-18, 2,1 mg; (12.5), 19-21, 2,1 mg; (12.6), 22-27, 2,2 mg; (12.7), 28-36, 2,8 mg; (12.8), 37-49, 3,4 mg; (12.9), 50-59, 2,9 mg; (12.10), 60-64, 2,1 mg; (12.11) 65-72, 2,7 mg; (12.12) 73-83, 36,9 mg; (12.13) 84-92, 9,7 mg; (12.14) 93-101, 4,4 mg; (12.15) 102-137, 5,3

mg, e (12.16) 138-207, 3 mg], as quais foram concentradas em rota vapor e então submetidas ao ensaio antifúngico (bioautografia), sendo testadas sob a concentração de 100 µg.

As sub-frações 11.4 e 12.12 inibiram o crescimento de *Co. fragarie* e *Co. gloerosporioides* sob a concentração de 100 µg, com halos de 5 mm. As demais frações não inibiram os micro-organismos alvos testados. As sub-frações 11.4 e 12.12 foram selecionadas para análises de RMN de ^1H e ^{13}C e CG-MS, e após as análises foi verificado que as duas sub-frações se tratava da mesma substância (Apêndice C). Com os resultados do RMN de ^1H e ^{13}C , CG-MS e LC-MS/MS (m/z 233.08905 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_3$, 233.11777) a molécula bioativa foi identificada como especiferona A (Apêndice C). Os dados de RMN foram similares aos dados encontrados na literatura, descritos por Nakajima et al. (1989), corroborando a identificação da Especiferona A (Figura 20).

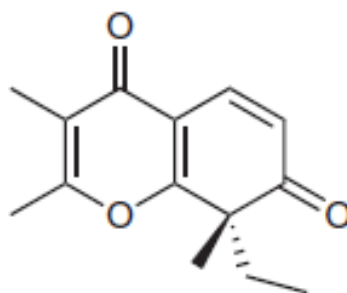


Figura 20 Metabólito especiferona A (fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$ e massa molecular de 232,279 g/mol) identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato bruto do táxon *Phoma* sp. UFMGCB 6409. **Fonte:** Nakajima et al. (1989).

5.3.2 *Opuntia humifusa*

Os 36 extratos obtidos a partir dos cladódios de *O. humifusa* não apresentaram atividade antifúngica, enquanto seis extratos dos fungos endofíticos apresentaram atividade antifúngica com zonas de inibição de 4,5 até 11,2 mm de diâmetro nos ensaios de bioautografia (Tabela 11). Análises dos espectros de RMN de ^1H dos extratos bioativos foram realizadas e indicaram a presença majoritária de ácidos graxos para os extratos dos fungos *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1 e *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A (Apêndice D). Esses extratos foram submetidos à CG-FID e confirmada a presença de misturas de ácidos graxos (Tabela 12). O ácido palmítico foi majoritário para todos os extratos analisados, seguido de ácido oleico para *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, ácido linoleico

(30,9%) *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, ácido láurico (36,6%) para *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1 e (27,2%) *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A (Tabela 12).

Tabela 11 Atividade antifúngica de extratos dos fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa* por meio do ensaio de bioautografia contra três espécies *Colletotrichum*.

Extratos brutos (160 µg)	Táxon	Média das zonas de inibição (mm) ± DP*		
		<i>Colletotrichum fragariae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
Ohu 8B2	<i>Alternaria</i> sp. 1	6 ± 2,82	6,5 ± 3,53	4,5 ± 0,7
Ohu 13A1	<i>Alternaria</i> cf. <i>arborescens</i>	8 ± 0	9 ± 0	8 ± 0
Ohu 30A	<i>Alternaria</i> sp. 3	4,5 ± 0,7	4,5 ± 0,7	11 ± 9,8
Ohu 19B	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	10 ± 0	zona difusa	9 ± 1,4
Ohu 17C1	<i>Cladosporium funiculosum</i>	zona difusa	zona difusa	4,5 ± 0,7
Ohu 17A	<i>Paraconiothyrium</i> sp.	5,5 ± 0,7	5,5 ± 0,7	11,25 ± 7,4
Controles	Benomil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Ciprodinil	29,75 ± 0,35	25,25 ± 1,06	30,5 ± 4,9
	Azoxistrobina	22 ± 2,82	30 ± 0	21 ± 4,24
	Captan	12,25 ± 1,76	12,75 ± 0,35	13,5 ± 2,12

*Desvio padrão.

As análises dos espectros de RMN de ¹H do extrato do fungo *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1 (Apêndice D) também indicaram a presença ácidos graxos, bem como a presença de hidrogênios aromáticos, sendo então selecionado para o fracionamento biomonitorado. O isolado *Alternaria* sp. 3 foi cultivado em larga escala sendo utilizadas 250 placas de Petri contendo BDA, as quais renderam 765 mg de extrato diclorometânico. Nas análises de CCD, o extrato bruto foi dissolvido a 1 mg/mL em DCM e conduzidas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Clorofórmio/Metanol 90:10, Clorofórmio/Metanol 80:20, Clorofórmio/Metanol 99:1, Clorofórmio/Acetona 95:5, Clorofórmio/Acetona 90:10 e Clorofórmio/Acetona 70:30. Após a revelação em UV e Godin a melhor condição foi obtida com a mistura Clorofórmio/Acetona 95:5.

Tabela 12 Quantificação de ácidos graxos (em porcentagem) produzidos por fungos endofíticos associados à *Opuntia humifusa*.

Ácidos graxos	Extratos brutos				Frações de <i>Alternaria</i> cf. <i>arborescens</i> Ohu 13A1			Frações de <i>Biscogniauxia mediterranea</i> Ohu 19B	
	<i>Alternaria</i> sp. 1 Ohu 8B2	<i>Alternaria</i> sp. 3 Ohu 30 ^a	<i>Cladosporium funiculosum</i> Ohu 17C1	<i>Paraconiothyrium</i> sp. Ohu 17A	F7	F8	F9	F7	F9
Caprílico (8:0)	0,85	0,32	-	-	-	-	-	-	-
Cáprico (10:0)	-	-	2,22	-	-	-	-	-	-
Undecanóico (11:0)	-	-	2,89	-	-	-	-	-	-
Láurico (12:0)	-	-	36,68	-	-	0,11	0,46	-	-
Mirístico (14:0)	0,64	0,52	-	0,82	0,19	0,68	1,39	0,16	0,17
Pentadecanóico (15:0)	1,29	1,57	-	0,59	-	-	-	-	-
Palmítico (16:0)	47,83	32,74	42,75	45,99	24,9	36,3	43,84	8,61	2,80
Palmitoléico (16:1)	0,96	1,14	-	2,47	2,27	2,71	1,97	1,43	2,18
Heptadecanóico (17 :0)	-	-	-	-	0,51	0,1	0,66	-	1,58
Cis-10-Heptadecenoico (17 :1)	-	-	-	-	0,21	0,18	-	-	-
Esteárico (18 :0)	16,51	11,14	15,43	4,04	5,37	5,22	5,05	0,07	-
Oléico (18:1n9c)	26,01	20,36	-	17,19	20,92	17,53	9,7	4,28	0,79
(LA) Linoléico (18:2n6c)	4,48	30,96	-	27,27	42,88	34,66	17,04	81,86	75,79
Pinolênico (18:3n6)	0,58	0,37	-	-	-	-	-	-	-
(ALA) α -Linolênico (18:3n3)	-	-	-	-	2,71	2,32	1,21	1,98	3,05
Nonadecanóico (19:0)	-	0,4	-	1,38	-	-	-	-	0,53
Araquídico (20:0)	0,8	0,41	-	0,21	-	-	5,71	0,91	2,12
cis-11- eicosenóico (20:1)	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-
Siadônico (20:3n6)	-	-	-	-	-	-	-	-	8,42
Arachidônico (20:4n6)	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-

Tabela 12 Continuação.

Ácidos graxos	Extratos brutos				Frações de <i>Alternaria</i> cf. <i>arborescens</i> Ohu 13A1			Frações de <i>Biscogniauxia mediterranea</i> Ohu 19B	
	<i>Alternaria</i> sp. 1 Ohu 8B2	<i>Alternaria</i> sp. 3 Ohu 30A	<i>Cladosporium funiculosum</i> Ohu 17C1	<i>Paraconiothyrium</i> sp. Ohu 17A	F7	F8	F9	F7	F9
(EPA) eicosapentaenóico (20:5n3)	-	-	-	-	-	-	1,63	-	-
cis-13,16-Docosadienóico (22:2)	-	-	-	-	-	-	3,79	-	-
(DPA) docosapentaenóico (22:5n3)	-	-	-	-	-	-	2,82	-	-
Lignocérico (24:0)	-	-	-	-	-	-	3,57	0,49	2,54

“-” = ausência de ácidos graxos.

A cromatografia em coluna do extrato do fungo *Alternaria cf. arborescens* Ohu 13A1 foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). 765 mg deste extrato bruto foi dissolvido em 2 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge correndo a 40 mL/min, com modo de detecção UV 254 e 360nm, com o gradiente Clorofórmio/Acetona, em 5 etapas: (1) 100:0 até 99:1 utilizando 600 mL, (2) 99:1 até 95:5 utilizando 800 mL, (3) 95:5 até 70:30 utilizando 800 mL, (4) 70:30 até 0:100 utilizando 800 mL, e (5) extensão de 0:100 utilizando 750 mL.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida à CCD (Clorofórmio/Acetona 95:5), e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em 10 frações [(1), 1-9, 30,2 mg; (2), 10-34, 444 mg; (3), 35-38, 24,4 mg; (4), 39-43, 156,7 mg; (5), 44-49, 32,1 mg; (6), 50-58, 15,3 mg; (7), 59-62, 38,5 mg; (8), 63-67, 60,6 mg; (9), 68-86, 56,4 mg; e (10), 87-169, 67,5 mg)], as quais foram concentradas em rota vapor e então submetidas ao ensaio antifúngico (bioautografia), sendo testadas sob as concentrações 10 e 100 µg.

As frações a de 10 µg não apresentaram atividade. Porém quando testadas à 100 µg, a fração 7 inibiu o crescimento de *Co. fragarie*, *Co. gloerosporioides* e *Co. acutatum* com halos de 8, 4 e 5 mm de diâmetro, respectivamente. A fração 8 também inibiu o crescimento de *Co. fragarie*, *Co. gloerosporioides* e *Co. acutatum* com halos de 7, 4 e 4mm de diâmetro. A fração 9 inibiu o crescimento de *Co. fragarie*, com halo de 6,5 mm de diâmetro. As frações 7, 8 e 9 que apresentaram atividade antifúngica foram submetidas à RMN de ¹H. Os espectros de RMN de ¹H indicaram a presença predominante de ácidos graxos para as três frações bioativas, as quais foram posteriormente submetidas a análises de CG-FID e foi confirmada a presença de misturas de ácidos graxos (Tabela 12).

As análises dos espectros de RMN de ¹H indicaram a presença de hidrogênios aromáticos e ausência de ácidos graxos para os extratos de *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B, o qual foi selecionado para o fracionamento biomonitorado. *Biscogniauxia mediterranea* foi cultivada em larga escala sendo utilizadas 250 placas de Petri contendo o meio BDA, as quais renderam 3,2 g de extrato diclorometânico. Nas análises de CCD, o extrato bruto foi dissolvido a 1 mg/mL em DCM e conduzidas em

sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Hexano/Acetato de Etila 80:20, Hexano/Éter 50:50, Hexano/Acetato de Etila 50:50 e Acetato de Etila/Hexano 80:20. Após a revelação em UV e Godin a melhor condição foi obtida com a mistura Hexano/Acetato de Etila 80:20.

A cromatografia em coluna do extrato do fungo *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). Uma grama deste extrato foi dissolvido em 2 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge correndo a 40 mL/min, com modo de detecção UV 254 e 280 nm, com o gradiente hexano:acetato de etila, em 3 etapas: (1) 100:0 até 98:2 utilizando 396 mL, (2) 98:2 até 30:70 utilizando 1500 mL, e (3) 30:70 até 0:100 utilizando 600 mL.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida a CCD (Hexano/Acetato de Etila 8:2), e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em 10 frações [(1), 1-21, 3,8 mg; (2), 22-26, 353,6 mg; (3), 27-28, 9 mg; (4), 29-35, 91,34 mg; (5), 36-39, 26,8 mg; (6), 40-45, 25 mg; (7), 46-47, 10,8 mg; (8), 48-51, 9,9 mg; (9), 52-58, 6,6 mg; e (10), 59-96, 22,8 mg)], as quais foram concentradas em rota vapor e então submetidas ao ensaio antifúngico (bioautografia), sendo testadas sob as concentrações 10 e 100 µg.

As frações sob a concentração de 10 µg não apresentaram atividade. Porém quando testadas à 100 µg, a fração 4 inibiu o crescimento de *Co. fragarie*, *Co. gloerosporioides* e *Co. acutatum* com halos de 6,5, 5 e 6 mm de diâmetro, respectivamente. A fração 7 inibiu o crescimento de *Co. fragarie* e *Co. acutatum* (com halos de 10 e 9 mm de diâmetro, respectivamente) e a fração 9 inibiu o crescimento de *Co. fragarie*, com halo de 5 mm de diâmetro.

As frações 4, 7 e 9 que apresentaram atividade antifúngica foram submetidas à RMN de ¹H e ¹³C. Os sinais exibidos pelos espectros da fração 4, juntamente com os dados obtidos a partir do LC-MS/MS (*m/z* 193.09086 [M+H]⁺, calculado para C₁₁H₁₃O₃, 193.08647; *m/z* 191.05360 [M-H]⁻, calculado para C₁₁H₁₁O₃, 191.07082), permitiram identificar a molécula ativa como (-)-5-metilmeleína (Apêndice E, Figura 21). Os dados de RMN obtidos são similares aos dados encontrados na literatura, descritos por Carpenter et al. (1980). Os espectros de RMN de ¹H das frações 7 e 9

indicaram a presença predominante de ácidos graxos, as quais foram posteriormente submetidas a análises de CG-FID e foi confirmada a presença de misturas de ácidos graxos (Tabela 12).

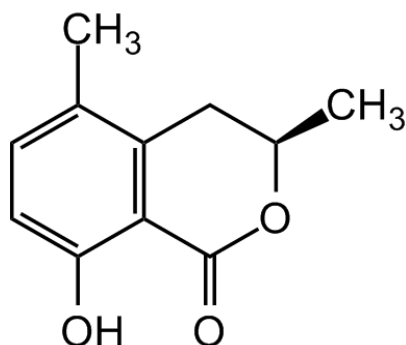


Figura 21 Metabólito (-)-5-metilmeleína (fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_3$ e massa molecular de 192 g/mol) identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato bruto do táxon *Biscogniauxia mediterranea*. **Fonte:** CARPENTER et al. (1980).

5.4 ENSAIOS DE MICRODILUIÇÃO EM PLACA COM METABÓLITOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa*

As substâncias (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A isoladas dos fungos endofíticos associados à *M. ernestii* e *O. humifusa* foram submetidas ao ensaio de microdiluição em placa frente *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis obscurans* e *Phomopsis viticola*. Os ensaios realizados com *B. cinerea* mostraram que as substâncias citocalasina H e (-)-5-metilmeleína estimularam o crescimento (6 até 34,4 %) sob as concentrações 75 e 150 μM em 72 horas e inibiram o crescimento do alvo (2,8 até 20,5%) sob a concentração de 300 μM em 48 e 72 horas. A especiferona A estimulou o crescimento de *B. cinerea* (1,4 até 21,6%) sob as concentrações testadas em 48 e 72 horas, exceto para a concentração 300 μM em 48 horas que mostrou fraca inibição de $2,8 \pm 6,6$ % (Figura 22).

A citocalasina H e (-)-5-metilmeleína estimularam o crescimento de *Co. acutatum* (6 até 34,4 %) sob as concentrações 75, 150 e 300 μM em 48 e 72 horas, exceto para a citocalasina H sob a concentração de 300 μM em 48 horas que mostrou fraca inibição de $2,9 \pm 4$ %. A especiferona A também estimulou o crescimento deste alvo a 75 μM em 48 horas e inibiu fracamente o crescimento de *Co. acutatum* ($0,6 \pm 3,2$

até $6 \pm 2,8\%$) sob a concentração de $300 \mu\text{M}$ em 48 e 72 horas (Figura 23). *Colletotrichum fragariae* obteve o seu crescimento estimulado frente às substâncias puras nas concentrações de 75, 150 e $300 \mu\text{M}$ em 48 e 72 horas, exceto para a citocalasina H e (-)-5-metilmeleína sob a concentração de $300 \mu\text{M}$ em 48 horas que mostrou fraca inibição, $16,2 \pm 2,4$ e $16,2 \pm 4,2\%$, respectivamente (Figura 24).

As substâncias (-)-5-metilmeleína e especiferona A estimularam o crescimento de *Co. gloeosporioides* ($5,2 \pm 2,2$ até $36,6 \pm 6,7\%$) nas concentrações 75, 150 e $300 \mu\text{M}$ em 48 e 72 horas, enquanto a citocalasina H na concentração de 150 e $300 \mu\text{M}$ em 48 horas inibiu de $50,1 \pm 9,6$ e $60 \pm 10,3\%$, respectivamente, e após 72 horas estimulou o crescimento de *Co. gloeosporioides* ($7,7 \pm 12,4$ até $40,9 \pm 9\%$) nas três concentrações avaliadas (Figura 25).

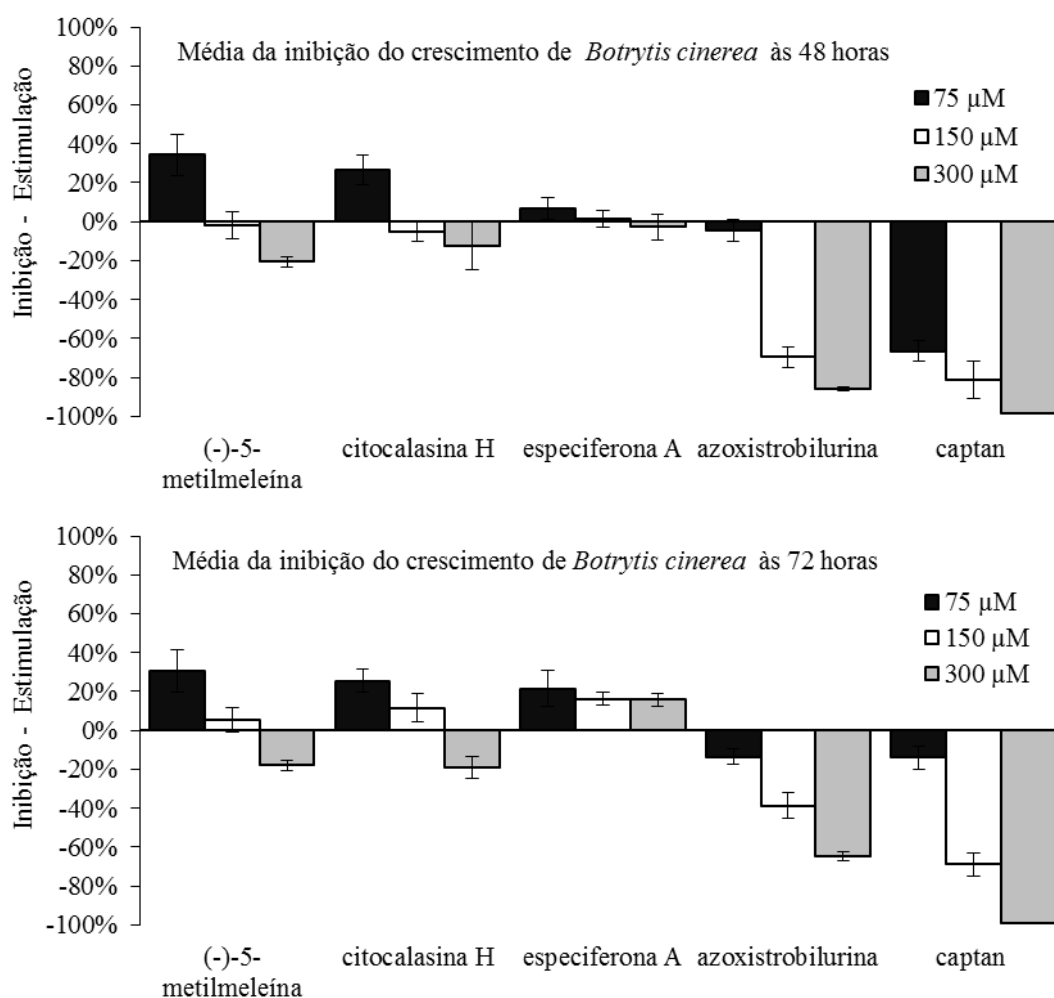


Figura 22 Médias de inibição do crescimento (%) de *Botrytis cinerea* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e $30 \mu\text{M}$. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

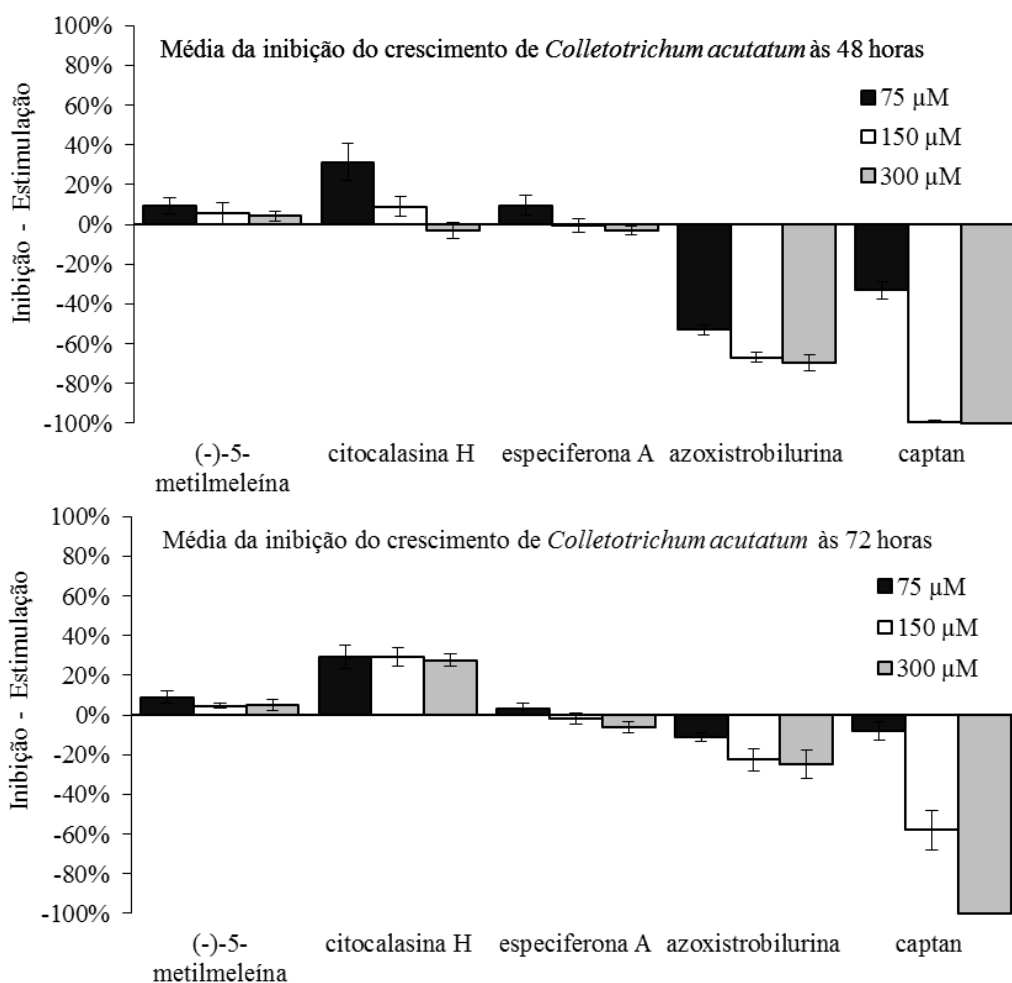


Figura 23 Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum acutatum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µM. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

Para os ensaios com *F. oxysporum*, as substâncias (-)-5-metilmeleína e especiferona A foram ativas com inibição de $2,7 \pm 3,5$ até $23,8 \pm 0,6\%$, nas concentrações de 75, 150 e 300 µM em 48 e 72 horas, enquanto a citocalasina H estimulou o crescimento de *F. oxysporum* em até $31,7 \pm 4,7\%$, concentrações 75, 150 e 300 µM em 48 e 72 horas (Figura 26).

As espécies mais sensíveis foram àquelas pertencentes ao gênero *Phomopsis*. As substâncias (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A inibiram o crescimento de *P. obscurans* e *P. viticola* nas concentrações 75, 150 e 300 µM em 120 e 144 horas, sendo as maiores porcentagens de inibição observadas à 300 µM. Entretanto, as

porcentagens de inibição observadas ainda foram menores que os valores de inibição dos controles utilizados (Figuras 27 e 28). Frente a *P. obscurans* as substâncias apresentaram maior inibição à 120 horas, exceto a citocalasina H, sob concentração de 300 μM , a qual apresentou maior inibição ($72,7 \pm 0,9\%$) às 144 horas. A (-)-5-metilmeleína também apresentou maior inibição às 144 horas ($19,4 \pm 7,1$ até $49,3 \pm 6,9\%$) quando testada contra 300 μM . Para as outras duas substâncias as inibições contra 300 μM quando comparadas às 120 e 144 horas foram variáveis (Figuras 27 e 28).

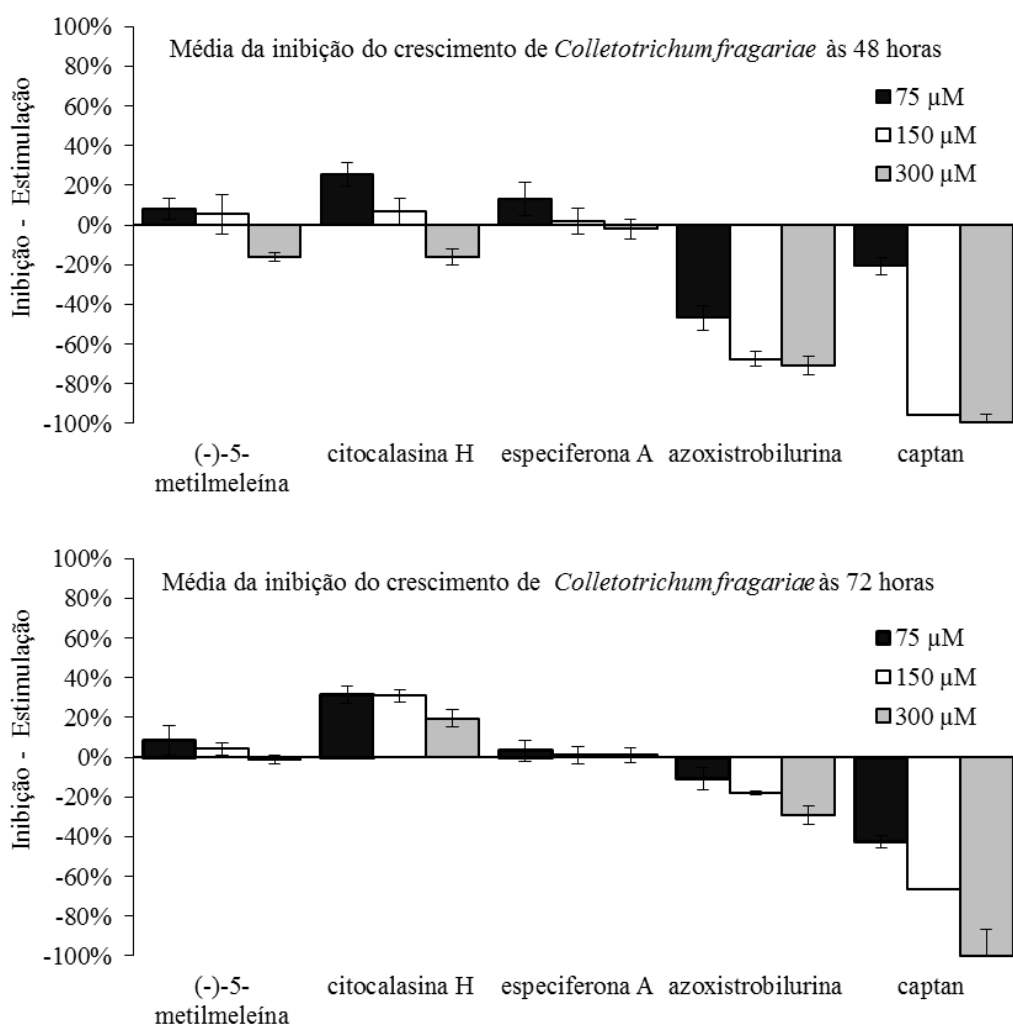


Figura 24 Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum fragariae* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

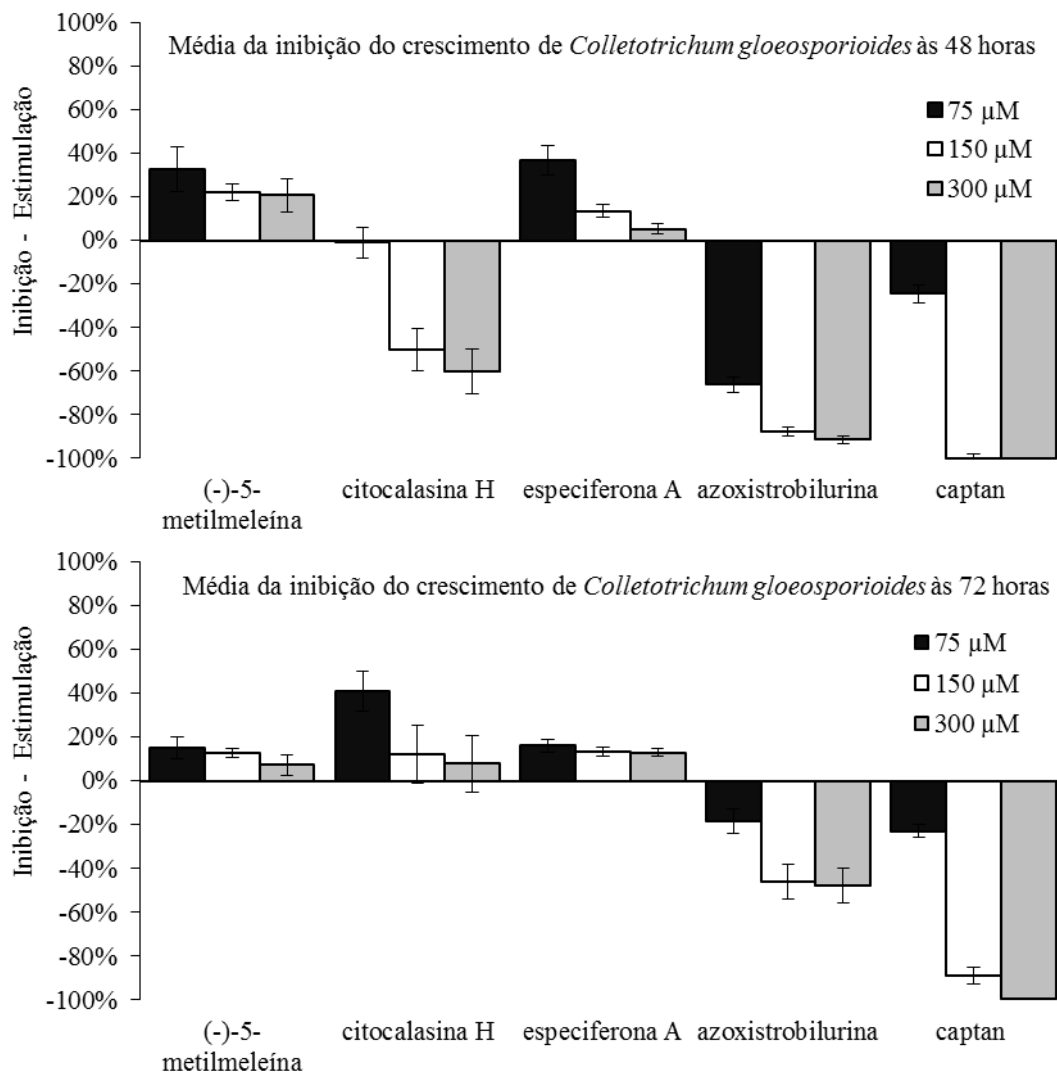


Figura 25 Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

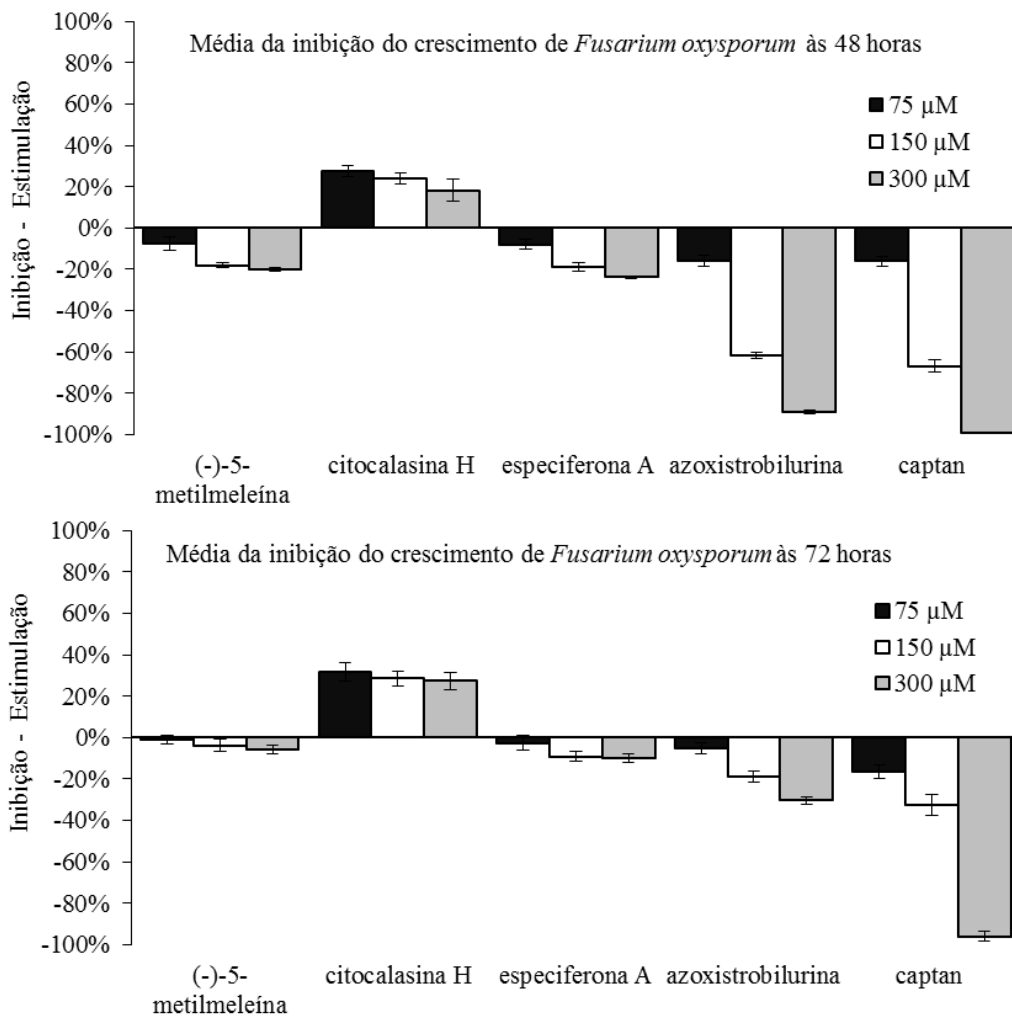


Figura 26 Médias de inibição do crescimento (%) de *Fusarium oxysporum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeléina, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µM. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

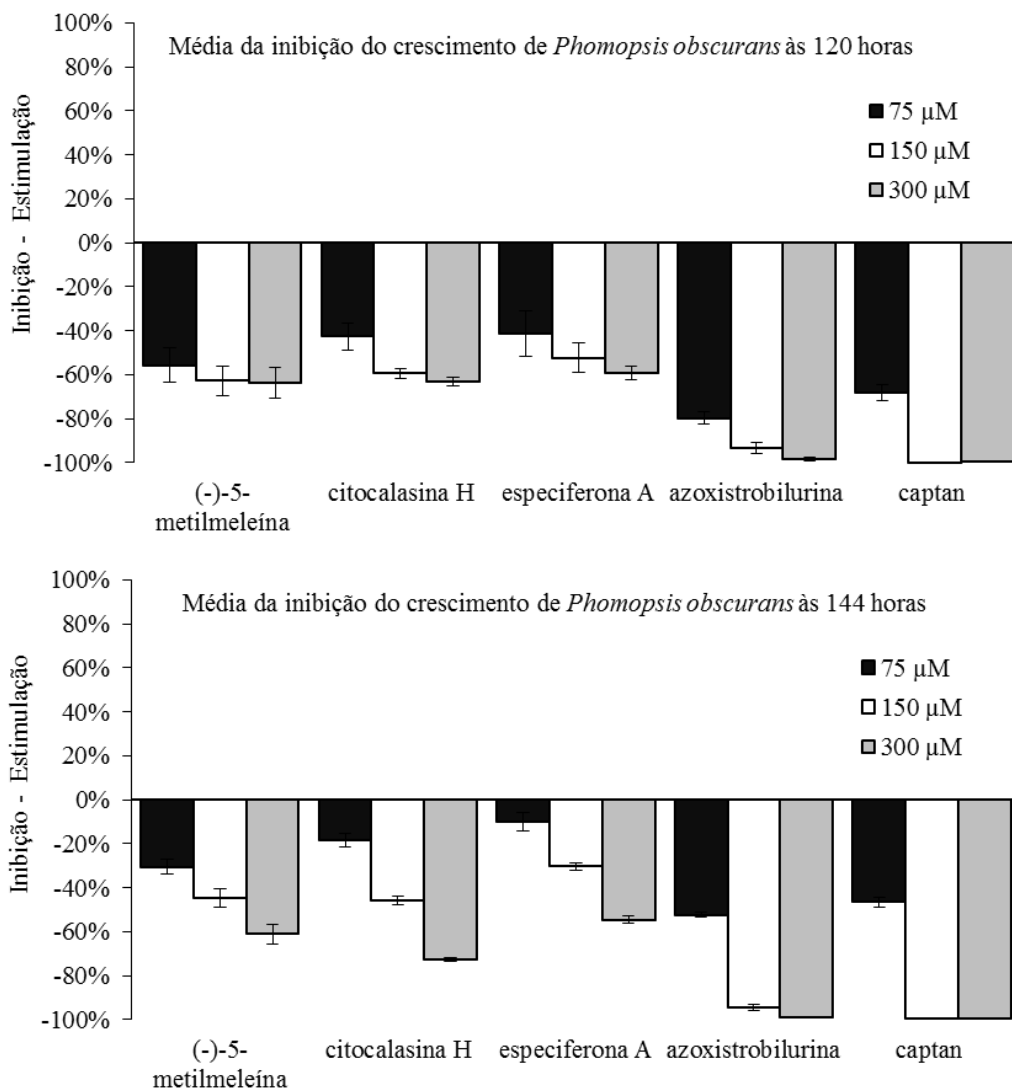


Figura 27 Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis obscurans* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µM. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

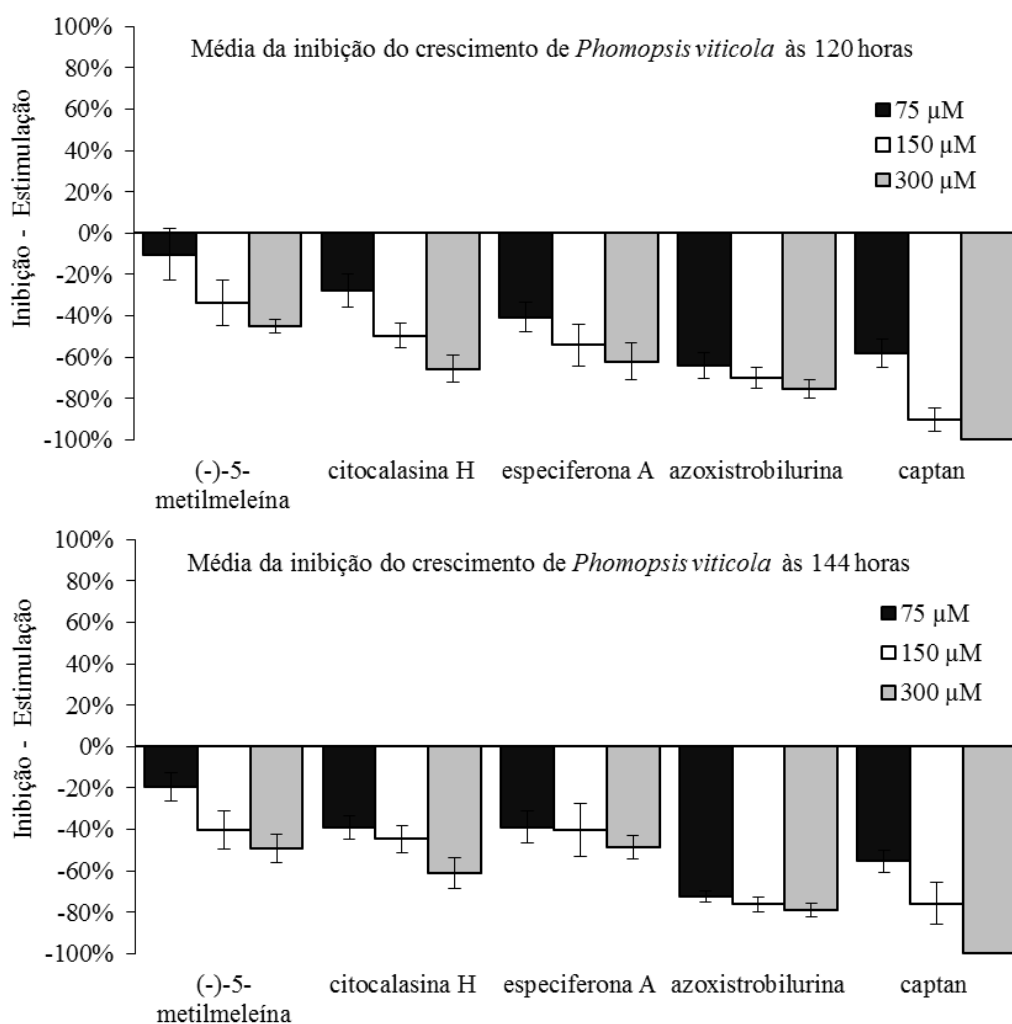


Figura 28 Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis viticola* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, citocalasina H e especiferona A utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 µM. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

As substâncias citocalasina H e especiferona A isoladas dos fungos endofíticos *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 e *Phoma* sp. UFMGCB 6409, respectivamente, também foram submetidas ao ensaio de microdiluição em placa frente aos micro-organismos alvos *E.coli*, *C. krusei* e *Cl. sphaerosperum*, os quais foram susceptíveis aos extratos brutos de *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 e *Phoma* sp. UFMGCB 6409 (Tabela 8). As substâncias apresentaram fraca atividade antimicrobiana contra *E.coli* e *C. krusei*, enquanto inibiram o crescimento de *Cl. sphaerosperum* de 22 até 55,6%, entretando as porcentagens de inibição observadas ainda foram menores que os valores de inibição dos controle utilizado (Figura 29, 30 e 31).

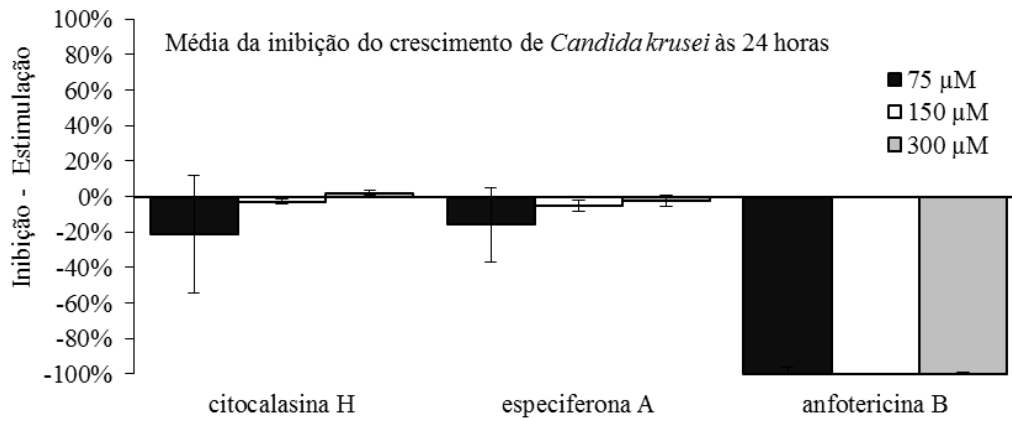


Figura 29 Médias de inibição do crescimento (%) de *Candida krusei* depois de expostos aos metabólitos citocalasina H e especiferona. Controle positivo: anfotericina B nas concentrações de 75, 150 e 300 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

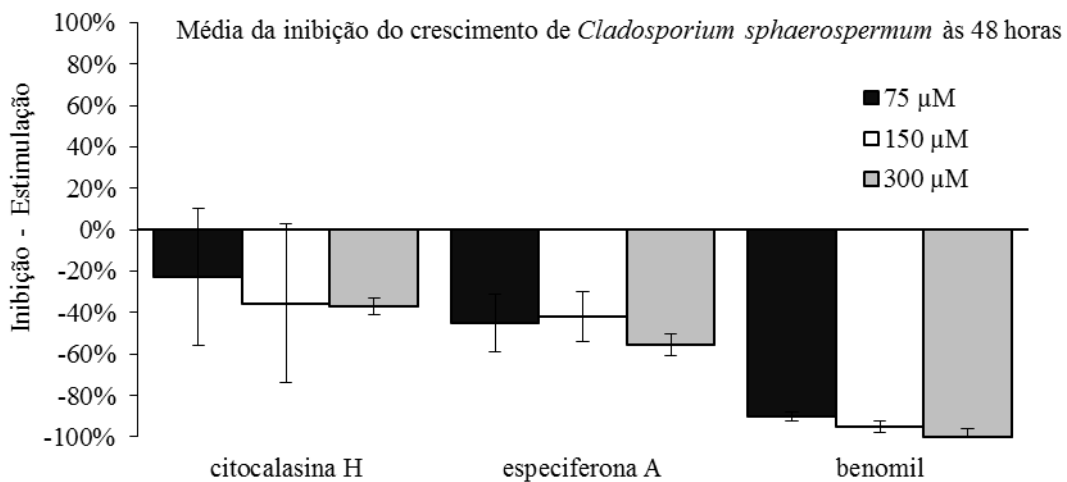


Figura 30 Médias de inibição do crescimento (%) de *Cladosporium sphaerospermum* depois de expostos aos metabólitos citocalasina H e especiferona. Controle positivo: benomil nas concentrações de 75, 150 e 300 μM . As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

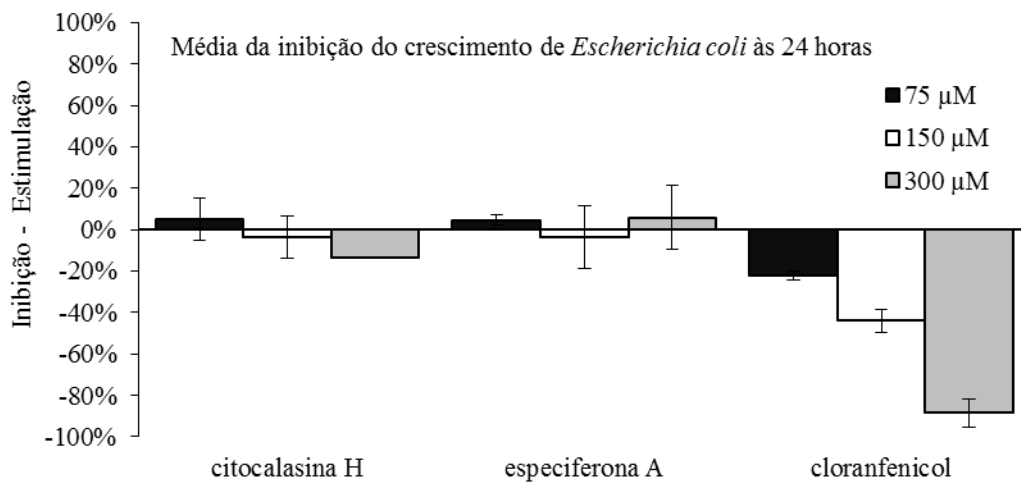


Figura 31 Médias de inibição do crescimento (%) de *Escherichia coli* depois de expostos aos metabólitos citocalasina H e especiferona. Controle positivo: cloranfenicol nas concentrações de 75, 150 e 300 µM. As medias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

6 DISCUSSÃO

6.1 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES DE DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Melocactus ernestii* E *Opuntia humifusa*

Estudos sobre fungos endofíticos de *Cactaceae* indicaram similaridade com nossos estudos. Fisher et al. (1994) estudaram 600 fragmentos dos cladódios de *Opuntia stricta* da Austrália e isolaram 617 fungos endofíticos pertencentes a 23 táxons (Ascomycota). Suryanarayan et al. (2005) utilizaram 1.050 fragmentos dos cladódios de 21 espécies de cactos do Arizona (EUA) e isolaram 900 fungos endofíticos pertencentes a 22 táxons (Ascomycota). Bezerra et al. (2012) utilizaram 45 fragmentos do cladódio de *Opuntia ficus-indica* no Brasil e obtiveram 44 fungos endofíticos pertencentes a 13 táxons (Ascomycota). Bezerra et al. (2013) utilizaram 1.215 fragmentos do cladódio de *Cereus jamacaru* no Brasil e isolaram 560 fungos endofíticos pertencentes a 59 táxons distribuídos em 30 gêneros: Ascomycotas (24), Basidiomycotas (4) e Zygomycotas (2).

Endofíticos pertencentes ao filo Basidimycota não são frequentemente isolados (CHLEBICKI, 2009) e em cactos há registro de oito espécies (*Rhodotorula foliorum*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. pilatii*, *R. sonckii*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sterigmatomyces elviae* e *Tritirachium dependens*) que foram isoladas do cladódio de *Cereus jamacaru* (BEZERRA et al., 2013). Neste estudo foram detectados nove endofíticos pertencentes à Basidiomycota ainda não reportados como endofíticos para família *Cactaceae*. A maioria deles foi representada pela classe Agaricomycetes, ordens Cantharellales (*Ceratobasidium* sp., *Ceratobasidiaceae* sp. 1, *Ceratobasidiaceae* sp. 2, *Ceratobasidiaceae* sp. 3 e *Ceratostomataceae* sp.), Agaricales (*Agaricomycetidae* sp. e *Tricholomataceae* sp.) presentes na raiz de *M. ernestii* e Geastrales (*Sphaerobolaceae* sp.) presente na raiz e espinho de *M. ernestii*. E a classe Tremellomycetes foi representada pela espécie *Cryptococcus flavescens*, encontrada no cladódio de *O. humifusa*.

A maioria das espécies da família *Ceratobasidiaceae* (complexo taxonômico comumente encontrado em solos) é sapróbia ou fitopatogênica, mas algumas são descritas como endofíticas (ANDERSEN, 1996; CURRAH; SHERBURNE, 1992). Gonzáles e Tello (2011), por exemplo, detectaram em *Vitis vinifera* duas espécies endofíticas de *Ceratobasidium*. Espécies da família *Agaricomycetidae* e *Tricholomataceae* são sapróbias, fitopatogênicas, micorrízicas e/ou endofíticas

(SCHULZ et al., 2006). Lana et al. (2011) isolaram o fungo endofítico *Moniliophthora perniciosa* (*Tricholomataceae*) do *Theobroma cacao* e Toju et al. (2013) fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Cortinarius* (*Agaricomycetidae*) da planta *Quercus serrata*. Espécies da família *Sphaerobolaceae* (humícola, sendo poucos táxons lignícolas e termitícolas) e espécies do gênero *Cryptococcus* (algumas espécies são capazes de causar doenças em humanos e animais) também têm sido descritas como fungos endofíticos. Além disso, foram isolados fungos endofíticos de *Sphaerobolaceae* associados à planta *Bouteloua gracilis* e *Cryptococcus flavescens* associado à *Citrus sinensis* (GAI et al. 2009; HERRERA et al., 2010).

Grande parte dos fungos encontrada em *O. humifusa* e *M. ernestii* correspondeu a gêneros já reportados como endofíticos (VIEIRA et al., 2012; CARVALHO et al. 2012; ROSA et al., 2012a; VAZ et al., 2014). Os fungos Ascomycota estudados neste trabalho: *Alternaria*, *Aspergillus/Neosartorya*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cochliobolus/Curvularia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* e *Xylaria* já foram citados na literatura como fungos endofíticos de cactos.

Dentre os isolados do filo Ascomycota identificados de *M. ernestii*, 18 gêneros e 24 espécies foram reportadas pela primeira vez como fungos endofíticos associados a cactos; os gêneros: *Astrocystis*, *Bartalnia*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Gelasinospora*, *Lecythophora*, *Microsphaeropsis*, *Mycoleptodiscus*, *Neoscytalidium*, *Peyronellaea*, *Phaeosphaeriopsis*, *Preussia*, *Rhizopycnis*, *Sclerostagonospora*, *Setophoma*, *Setosphaeria* e *Thozetella*, e as espécies: *Astrocystis sublimbata*, *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus* cf. *felis*, *Aspergillus malodoratus*, *Candida parapsilosis*, *Chaetomium gracile*, *Chaetomium subglobosum*, *Chaetomium succineum*, *Cochliobolus eragrostidis*, *Diaporthe raonikayaporum*, *Fusarium solani*, *Gelasinospora udagawae*, *Microsphaeropsis arundinis*, *Mycoleptodiscus indicus*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neosartorya fischeri*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii*, *Peyronellaea prosopidis*, *Phoma gardeniae*, *Preussia minimoides*, *Rhizopycnis vagum*, *Setophoma terrestres* e *Setosphaeria rostrata*.

Dentre os isolados do filo Ascomycota identificados de *O. humifusa*, quatro gêneros (*Biscogniauxia*, *Cryptococcus*, *Diaporthe* e *Paraconiothyrium*) e três espécies (*Biscogniauxia mediterranea*, *Cladosporium* cf. *asperulatum* e *Curvularia protuberata*) foram reportados pela primeira vez como fungos endofíticos associados à cactos.

Dos novos registros de fungos endofíticos encontrados neste trabalho para a família *Cactaceae*, somente o gênero *Diaporthe* foi compartilhado entre *M. ernestii* e *O. humifusa*. Os isolados do grupo *Diaporthe* sp. formaram um clado monofilético com alto nível de suporte (probabilidade posterior e bootstrap $\geq 99\%$) nas árvores com análises de Máxima Parcimônia e Bayesiana. De acordo com Gomes et al. (2013), os isolados *Diaporthe* sp. CBS 119639 e LGMF 947 (micélios estéreis) parecem representar uma nova espécie, portanto, nosso estudo claramente sugere que os isolados *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 e *Diaporthe* sp. Ohu 8A também podem ser representantes desta nova espécie.

Diaporthe sp. CBS 119639 foi isolado de um abscesso de um homem na Alemanha e *Diaporthe* sp. LGMF 947 foi isolado da semente de *Glycine max* (soja) no Brasil. Espécies do gênero *Diaporthe* que são comumente isoladas de soja também são reportadas como patógenos oportunistas em humanos (IRIART et al., 2011; GARCIA-REYNE et al., 2011). Em 1999, uma espécie de *Phomopsis* foi reportada como agente etiológico de uma infecção subcutânea no dedo de uma agricultora imunossuprimida e este gênero foi adicionado à lista de fungos capazes de causar doenças em humanos (SUTTON et al., 1999).

O total de 79 táxons endofíticos (10 de *O. humifusa* e 69 de *M. ernestii*) mostraram baixa similaridade com sequências depositadas no GenBank nos níveis de gênero (*Alternaria*, *Bartalinia*, *Ceratobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Lecythophora*, *Neurospora*, *Nigrospora*, *Paraconiothyrium*, *Pestalotiopsis*, *Phaeosphaeriopsis*, *Phoma*, *Preussia*, *Sclerostagonospora*, *Thozetella* e *Xylaria*), família (*Agaricomycetidae*, *Chaetomiaceae*, *Chaetothyriaceae*, *Ceratobasidiaceae*, *Ceratostomataceae*, *Coniochaetaceae*, *Halosphaeriaceae*, *Hypocreaceae*, *Herpotrichiellaceae*, *Sphaerobolaceae*, *Sporormiaceae*, *Magnaporthaceae*, *Montagnulaceae*, *Mycosphaerellaceae*, *Pyronemataceae*, *Tricholomataceae*, *Verrucariaceae* e *Xylariaceae*), ordem (*Pleosporales* e *Sordariales*), classe (*Sordariomycetes* e *Dothideomycetes*), sub-filo (*Pezizomycotina*) e filo (*Ascomycota*), que podem representar espécies novas. No entanto, a utilização da taxonomia polifásica (estudos filogenéticos de várias regiões, bem como técnicas morfológicas) deve ser realizada para identificar e/ou descrever estes fungos endofíticos em nível de espécie.

O elevado número de novos registros de ocorrências para gêneros e espécies encontrados neste trabalho pode ser explicada por 72% dos gêneros terem sido

encontrados nas raízes e 70,83 e 16,6% das espécies terem sido encontradas nas raízes e espinhos, respectivamente, já que este é o primeiro trabalho que aborda a associação de fungos endofíticos a espinhos e raízes de cactos. Além disso, os trabalhos que tratam sobre fungos endofíticos associados a cactos identificaram os isolados somente por taxonomia morfológica, sendo que 1,78% dos fungos endofíticos isolados por Fisher et al. (1994), 6,44% dos fungos endofíticos isolados por Suryanarayanan et al. (2005), e 22,72% e 30,3% dos endofíticos isolados por Bezerra et al. (2012 e 2013), respectivamente, apresentaram micélios estéreis e não puderam ser identificados. Guo et al. (2000), Wang et al. (2005) e Suryanarayanan et al. (2011) mencionaram a importância da utilização de técnicas moleculares para a identificação de fungos com micélios estéreis.

A diferença encontrada no número de isolados das comunidades cladódio, espinho e raiz pode ser devido às características de cada tecido vegetal amostrado. Sabe-se que a cutícula espessa e cerosa e a baixa frequência de estômatos no cladódio, que representam adaptações para reduzir a transpiração e perda de água dos cactos, podem representar barreiras adicionais que inibem a infecção por fungos parasitas, bem como a colonização de espécies de endofíticos resultando em menor diversidade quando comparado a outras espécies de planta (ZIMMERMANN; GRANATA, 2002; SURYANARAYANAN; WITTLINGER; FAETH, 2005, LUZ et al., 2006; SILVA et al., 2006). Além disso, existem outras características do tecido vegetal como, biomassa e substâncias secundárias, que podem justificar a baixa colonização no cladódio e espinhos (MAUSETH, 2004) em relação às raízes.

Os fungos *Aureobasidium pullulans* e *Mycoleptodiscus indicus* associados aos cladódios de *M. ernestii* e *Alternaria* cf. *arborescens*, *Alternaria* sp. 4 *Aureobasidium pullulans* e *Diaporthe* sp. associados aos cladódios de *O. humifusa* foram isolados como espécies dominantes. Estes resultados foram similares aos encontrados por Suryanarayanan; Wittlinger; Faeth (2005) que isolaram os fungos endofíticos *Alternaria* sp. e *Aureobasidium pullulans* como espécies dominantes no deserto do Arizona (EUA). No entanto, o gênero *Cladosporium* foi os mais comumente encontrado nos cladódios dos cactos *Opuntia stricta* e *O. ficus-indica* (FISHER et al., 1994; BEZERRA et al., 2012); e *Cladosporium* e *Fusarium* foram os gêneros mais comumente encontrados nos cladódios de *C. jamacaru* (BEZERRA et al., 2013).

Os isolados *Preussia* sp. 1 e *Sphaerobolaceae* sp. foram as espécies dominantes nos espinhos, enquanto *Cochliobolus eragrostidis*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani*

foram as espécies dominantes nas raízes de *M. ernestii*. Os outros gêneros e espécies que mostram baixa abundância (um ou dois isolados) foram considerados como isolados raros.

Estudos com cactos na África do Sul, Brasil e nos Estados Unidos apontam o gênero *Alternaria* como causador de necrose em cladódios de *O. ficus-indica* (FARR et al., 1989; SWART; KRIEL, 2002; SOUZA et al., 2010). Além dos cactos, o gênero *Alternaria* pode causar alternariose em sementes de sorgo, milho, soja, trigo e no tomateiro (LEMOS et al., 2001; BALBI-PEÑA et al., 2006).

Mycoleptodiscus indicus, espécie tropical e subtropical, é descrito como sapróbio, decompositores do folheto de *Caesalpinia echinata*, endofítico do hospedeiro *Echinacea purpurea* e *Borreria verticillata*, patogênicos em humanos e em animais causando feohifomicose subcutânea e fitopatogênicos, causador da crosta negra em folhas de baunilha (*Vanilla fragans*) (BEZERRA; RAM, 1986; GRANDI; SILVA, 2006; DEWAR; SIGLER, 2010; ROSA et al., 2012a; ANDRIOLI et al., 2014).

Espécies do gênero *Cochliobolus/Curvularia* são comumente descritas como endofíticas, inclusive em cactos (BEZERRA et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Bezerra et al. (2013) relataram espécies de *Cochliobolus* como endofítico no cacto *C. jamacaru*, enquanto Freire (2009) reportou o isolamento de espécies deste gênero causando doença no mesmo cacto (*C. jamacaru*). Além de cactos, espécies do gênero *Cochliobolus* causam doenças em inhame (*Alocasia* spp., *Colocasia* spp., *Dioscorea* spp.), bananeira (*Musa* sp.) e em goiabeira (*Psidium guajava*) (MORAES et al., 2006; PEREIRA, 2010; FURTADO, 2011; JUNQUEIRA et al., 2001).

Alterações no metabolismo da planta, causados por situações de estresse, pode gerar um desequilíbrio na comunidade endofítica e potencializando-os como fitopatógenos ou favorecendo a ação de fitopatógenos propriamente ditos. O fungo *Biscogniauxia mediterranea*, por exemplo, é bem conhecido como agente causal da doença "carvão do entrecasco" em várias espécies florestais, principalmente em espécies do gênero *Quercus*, mas também é documentado como endofítico (SANTOS, 2003). De acordo com Nugent et al. (2005) há evidências de que esta espécie ocorre em tecidos saudáveis de árvores como endofítico e torna-se fitopatogênica sob estresse hídrico.

Membros do gênero *Fusarium* foram isolados de plantas e solos como patógenos, sapróbios e endofíticos, inclusive como endofítico do cacto *C. jamacaru* e

patógeno do gênero *Opuntia* causando a murcha dos cladódios (SOUZA et al., 2010; VIEIRA et al., 2012; ROSA et al., 2012b; BEZERRA et al. 2013; BOMFIM et al., 2013). Normalmente, *F. oxysporum* infecta os hospedeiros pela raiz obstruindo o sistema vascular e reduzindo o fluxo de água a partir das raízes para a parte superior da planta e conseqüentemente produzindo a murcha (LESLIE; SUMMERELL, 2011). No entanto, esse fungo foi assintomático em três tecidos de saudáveis de *Equinacea purpurea* e foram capazes de produzir extratos com atividade antifúngica, sugerindo um efeito protetor na planta.

Nós também isolamos fungos pigmentados; *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Nigrospora* e *Phoma*. Estudos sobre endofíticos sugerem que fungos pigmentados podem conferir ao hospedeiro tolerância a seca, aridez e/ou altas temperaturas (REDMAN et al., 2002; MANDYAM; JUMPPONEN, 2005; KHIDIR et al., 2010), e esses fungos associados com raízes estariam envolvidos na absorção de água (BARROW, 2003; MANDYAM; JUMPPONEN 2005; BARROW et al., 2008). Morsy et al. (2010) sugeriram que as relações endofítico-hospedeiro podem ser influenciada pelo envolvimento do pigmento da melanina e por proteínas termófilas, tal como observado em culturas de *Curvularia protuberata*.

Os valores do índice de riqueza de Margalef encontrados para os fungos endofíticos de *O. humifusa* (cladódios = 3,4) e *M. ernestii* (cladódios = 5,7 e espinhos = 5,17) mostraram diversidade moderada e elevada, respectivamente. Esses valores foram inferiores aos encontrados para a comunidade endofítica do cladódio de *C. jamacaru* (9,72), enquanto o índice de Margalef para as raízes de *M. ernestii* (12,1) foi superior ao encontrado para os endofíticos associados às raízes de arroz (*Oryza granulate*), isso indica que a diversidade de fungos endofíticos em cactos do bioma Caatinga é alta (YUAN et al. 2010; BEZERRA et al., 2013).

Os índices de diversidade β foram descritos com o objetivo de medir o quanto há de mudança na composição de espécies nos cladódios, espinhos e raízes de *M. ernestii*. A diversidade β foi menor entre cladódio e espinho (0,65) quando comparada com os outros pares: raiz e cladódio (0,85) e raiz e espinho (0,84), desse modo, a comunidade de fungos endofíticos na raiz foi a mais diferenciada, isso pode ser explicado pelo alto número de espécies exclusivas, associadas aos mais altos percentuais de *singletos* e *doubletons*. As espécies que ocorreram em todas as partes da planta (*Nigrospora* sp. e *Preussia* sp. 1) indicaram ser generalistas.

A baixa diversidade β indica uma elevada similaridade entre as áreas (FELFILI; FELFILI, 2001). Com isso, conclui-se que a comunidade de fungos endofíticos de *M. ernestii* pode ser dividida em dois grupos de acordo com a análise de agrupamento realizada: um grupo composto por raiz e outro grupo composto por cladódio e espinho. De acordo com Petrini et al. (1995), diferentes órgãos e tecidos das plantas podem representar um distinto microhabitat. Vieira et al. (2012), por exemplo, demonstraram que a composição da comunidade endofítica associada com *Solanum cernuum* pode variar entre folhas e caules. E Rosa et al. (2012a) observaram que fungos endofíticos se distribuíram de forma irregular entre folhas, caules, raízes e tubérculos de *E. purpurea*.

6.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E METABÓLITOS BIOATIVOS DE FUNGOS ASSOCIADOS À *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa*

Os ácidos graxos são caracterizados pela presença de um grupo carboxila (-COOH) em uma extremidade e um grupo metil (-CH₃) na outra, eles podem variar em tamanho (cadeia de quatro até vinte e oito carbonos) e grau de saturação podendo ser saturados (cadeia de carbono com ligações simples) ou insaturados (cadeia de carbono com duplas ligações) (LIU et al., 2008; SYLVAIN et al., 2009). Esses ácidos graxos têm sido reportados na literatura como compostos antifúngicos (KABARA et al., 1972; CARBALLEIRA, 2008; LIU et al., 2008; THIBANE et al., 2010; ROSA et al., 2013).

Avis e Bélanger (2001) determinaram que o mecanismo geral dos ácidos graxos antifúngicos é na membrana celular, de modo que os ácidos graxos são capazes de se inserir na bicamada lipídica das membranas de fungos e perturbar fisicamente a membrana, o que resulta num aumento da fluidez da membrana e consequente desorganização generalizada da membrana celular que leva a alterações de conformação das proteínas de membrana, a libertação de componentes intracelulares, desordem citoplasmática e, eventualmente, a célula de desintegração. Além disso, os ácidos graxos também podem agir na inibição de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos, como a inibição da síntese triacilglicerol e esfingolipídeos, N- miristoil transferase, da β -oxidação e inibição da atividade da topoisomerase I em mamíferos (MCLAIN et al., 2000; SUZUKI et al., 2000; CARBALLEIRA; O'NEILL; PARANG, 2005, 2007; CARBALLEIRA, 2008).

Em geral, a eficiência da atividade antifúngica dos ácidos graxos é maior com o aumento do comprimento da cadeia, no entanto, o aumento de hidrofobicidade com o

maior comprimento de cadeia pode reduzir a solubilidade em sistemas aquosos e os grupos hidrofóbicos podem ser impedidos de alcançar concentrações suficientes para interagir com os fosfolípidos da membrana (BRANEN; DAVIDSON; KATZ, 1980; WANG; JOHNSON, 1992; OUATTARA et al., 1997; SADO-KAMDEM; VANNINI; GUERZONI, 2009). O ácido láurico (ácido graxo saturado), identificado neste trabalho como um dos ácidos graxos majoritários para o extrato *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1, tem o melhor equilíbrio entre os grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (BRANEN; DAVIDSON; KATZ, 1980); e tem atividade antifúngica descrita na literatura contra os fungos *Aspergillus niger*, *Blumeria graminis*, *Candida albicans*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cucumerinum lagenarium*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Myrothecium verrucaria*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Saccharomyces cerevisiae* (KABARA et al., 1972; GERSHON; SHANKS, 1978; ŘIHÁKOVÁ; PLOCKOVÁ; FILIP, 2001; BERGSSON et al., 2001; MCDONOUGH; STUKEY; CAVANAGH, 2002; WALTERS; WALKER; WALKER, 2003; LIU et al., 2008; ALTIERI et al., 2007, 2009; MURZYN et al., 2010).

O ácido palmítico (ácido graxo saturado), identificado neste trabalho como um dos ácidos graxos majoritários para os extratos *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347, *Fusarium solanii* UFMGCB 5865, *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1 e *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A, e para as frações 8 e 9 do extrato *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1, tem atividade antifúngica descrita na literatura contra os fungos *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Cucumerinum lagenarium*, *Emericella nidulans* e *Fusarium oxysporum* (LIU et al., 2008; ALTIERI et al., 2007).

O ácido linoleico (ácido graxo poli-insaturado) majoritário nas frações 7 e 9 de *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B, nas frações 7 e 8 de *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1, bem como no extrato bruto de *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, já é conhecido por apresentar atividade antifúngica contra vários fungos fitopatogênicos, como *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium oxysporum* (LIU et al., 2008). O ácido oléico, também de cadeia insaturada, encontrado nos extratos *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347, *Fusarium solanii* UFMGCB 5865, *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 30A, e *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A, e nas frações de *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1 é reportado na literatura como antifúngico para os fitopatôgenos *Moniliophthora perniciosa* e *Pythium ultimum* (WALTERS et al., 2004). De acordo com Liu et al. (2008), os ácidos graxos saturados, como por exemplo o ácido

palmitico, mostraram forte atividade antifúngica quando comparado com ácidos graxos insaturados, como por exemplo o ácido oleico, frente aos alvos *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium oxysporum*.

Rosa et al. (2013) obtiveram resultados similares aos encontrados neste trabalho, foi observado uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados nas frações dos extratos do fungo endofítico *Coniochaeta ligniaria* e sua planta hospedeira *Smallanthus sonchifolius*, os quais apresentaram atividade antifúngica contra os fitopagênos *Co. acutatum*, *Co. fragariae* e *Co. gloeosporioides*.

De acordo com Pohl et al. (2011), o uso dos ácidos graxos como agentes antifúngicos oferece várias vantagens, (i) os ácidos graxos podem ser utilizados juntamente com compostos antifúngicos que são propensos a resistência dos patógenos e que tenham ação na membrana, já que o sinergismo poderia proporcionar o uso prolongado; o ácido araquidônico, por exemplo, pode aumentar a susceptibilidade de biofilmes formado por *Candida albicans* a antifúngicos, e portanto resultar na diminuição da dose do antimicótico requerida para inibir a formação do biofilme (Ells et al., 2009); e (ii) pode ser usado como ingrediente ativo nas preparações de uso tópico, como o ácido 10-undecenoico que é utilizado com sucesso no tratamento de dermatomicoses causadas por *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton inguinale* e *Microsporum audouini*, onicomioses causadas por *Trichophyton rubrum*, bem como a tinea pedis causada por *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (SHAPIRO; ROTHMAN, 1945; CHRETIEN et al., 1980; RHEDER; NGUYEN, 2008). No entanto, a utilização de ácidos graxos como fungicidas para controlar doenças em plantas pode não ser efetiva, pois são biodegradáveis e os mecanismos de ação ainda não são bem conhecidos (POHL et al., 2011).

No presente trabalho, o fracionamento bioguiado do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 levou ao isolamento da citocalasina H. A citocalasina H, isolada de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Phomopsis/Diaporthe*, inclusive endofíticos, e também dos fungos *Helminthosporium* sp., *Phoma* sp., *Xylaria* sp., *Hypoxyton* sp., *Chalara* sp. e *Rhinochadiella* sp., pertence ao grupo dos terpenos e estruturalmente são compostas de um anel isoindolona altamente substituído, com um grupo benzil na posição 3 e fundido com um anel macrocíclico de 11 a 14 membros. (WAGENAAR et al., 2000; STROBEL et al., 2004; SILVA et al., 2010; ZHAN et al. 2013).

As citocalasinas exibem um amplo espectro de atividades como atividade antibiótica, antitumoral, inibidor de proteases de HIV e atividade fitotóxica (são capazes de inibir o crescimento das plantas). São utilizadas como sondas em ensaios biológicos, mas a aplicação terapêutica é limitada devido à toxicidade, já que são responsáveis por inibir o movimento do citoplasma em células de mamíferos (efeito atribuído à interação das citocalasinas com a actina), além disso, influenciam na retração de coágulos e agregação de plaquetas, transporte de glucose e alteram a secreção da tireóide (MCMILLAN et al., 1977; IZAWA et al., 1989; COLE et al., 1981; NATORI; YAHARA, 1991; WAGENAAR et al., 2000; JIAO et al., 2004; STROBEL et al., 2004; CIMMINO et al., 2008; CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2012).

No ensaio de microdiluição em caldo a citocalasina H apresentou atividade antifúngica moderada, inibiu em $60 \pm 10,3\%$ o crescimento de *Co. gloeosporioides* e em 40% o crescimento de *Cl. sphaerospermum* na concentração 300 μM em 48 horas, bem como apresentaram as maiores porcentagens de inibição observadas à 300 μM (60-72%) frente a *P. obscurans* e *P. viticola*. Esses resultados indicam que a citocalasina H pode não ser a única responsável pela bio-atividade inicialmente observada no extrato bruto.

Resultados similares foram encontrados por Silva et al. (2010) que avaliaram a atividade antifúngica de seis citocalasinas (uma nova citocalasina, 19, 20-epoxicitocalasina D, C, N, Q e R) purificadas do extrato do fungo endofítico *Xylaria* sp. e observaram fraca inibição da 19, 20-epoxicitocalasina Q frente aos fungos fitopatogênicos *Cl. cladosporioides* e *Cl. sphaerospermum* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, quando comparada com o padrão nistatina (1 $\mu\text{g/mL}$) e nenhuma inibição das demais citocalasinas. Do fungo *Xylaria* sp. isolado de *Palicourea marcgravii* foram isoladas as citocalasinas B e D que apresentaram atividade contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* a uma concentração de 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Fu et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana dos compostos epoxicitocalasina H, citocalasina N, e citocalasina H isolados dos extratos de *Phomopsis* sp. By254, um fungo endofítico residente na raiz do *Gossypium hirsutum*, e observaram à ação antimicrobiana dos três compostos contra fungos patogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Bipolaris maydis*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Bipolaris sorokiniana*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* e *Rhizoctonia cerealis*, com um valor de IC_{50} 0,1 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Além disso, nenhuma inibição foi observada contra

bactérias fitopatogênicas (*Acidovorax aveane*, *Curtobacterium luteum*, *C. flaccumfaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Rhodococcus fascians*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris*). No nosso trabalho, a citocalasina H inibiu em 20% o crescimento de *Botrytis cinerea* na concentração de 300 µM e estimulou o crescimento de *Fusarium oxysporum* sob as concentrações de 75, 150 e 300 µM.

O fracionamento bioguiado do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409 levou ao isolamento da especificerona A que pertence à classe das azafilonas. As azafilonas são policetídeos, pigmentos, produzidos por ascomicetos e foram encontradas em algumas espécies da família *Nectriaceae*, *Pleosporaceae*, *Trichocomaceae* e *Xylariaceae* (NAKAJIMA et al., 1992; EDRADA et al., 2000; OSMANOVA et al., 2010; QUANG et al., 2005a, STIERLE; STIERLE; KELLY, 2006; YANG et al., 2012). Esses metabólitos podem estar relacionados à defesa química contra insetos e outros organismos competidores, já que as azafilonas podem estar localizadas nos corpos frutíferos de espécies da família *Xylariaceae* em grânulos ou contidas em camadas de cera, sendo expostas para o meio somente se o estroma maduro sofrer alguma injúria (QUANG et al., 2006a). Além disso, esses compostos têm afinidade por amônia e reagem com aminas de proteínas, aminiácidos e ácidos nucleicos substituindo o oxigênio pirano por nitrogênio (OSMANOVA et al., 2010; QUANG et al., 2005a) e exibem ampla atividade biológica, incluindo inibição da enzima telomerase (TABATA et al., 1999), da acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) (QUANG et al., 2006b) e atividade antimicrobiana (QUANG et al., 2005b).

A fitotoxina, especificerona A, já foi relatada como metabólito do fungo fitopatogênico *Cochliobolus spicifer*, responsável pelas lesões circulares em folhas de trigo, do endofítico *Fusarium* sp. LN-12, isolado de folhas de *Melia azedarach*, do fungo *Drechslera hawaiiensis* isolado de uma esponja marinha (*Callyspongia aerizusa*), e do extremófilo *Penicillium* sp. (NAKAJIMA et al., 1992; EDRADA et al., 2000; STIERLE; STIERLE; KELLY, 2006; YANG et al., 2012). Porém esta é a primeira vez como substâncias produzidas por um fungo do gênero *Phoma*.

A atividade antifúngica da especificerona A contra fungos fitopatôgenos está sendo reportada pela primeira vez neste trabalho. Esta substância exibiu fraca atividade contra *Fusarium oxysporum* (inibição 23%) e moderada atividade contra as espécies de *Phomopsis viticola* e *P. obscurans* (cerca de 60% de inibição), e *Cladosporium sphaerospermum* (55% de inibição) sob a concentração de 300 µM.

O fracionamento bioguiado do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B levou ao isolamento da substância (-)-5-metilmeléina, uma dihidroisocumarina. A substância (-)-5-metilmeléina tem sido descrita como metabólito de diversos fungos como *Biscogniauxia mediterranea*, *Hypoxyton agrillaceum*, *H. atropunctatum*, *H. chestersii*, *H. confluens*, *H. grenadense*, *H. illitum*, *H. jecarinum*, *H. mammatum*, *H. mediterraneum*, *H. microplacum*, *H. rubiginosum*, *H. rutilum*, *H. serpens*, *H. stigmatium*, *H. tinctor*, *H. truncatum*, *Nummularia broomiana*, *N. dennisii*, *N. discreta*, *Fusicoccum amygdale* e *Phomopsis* sp. (ANDERSON et al., 1983; HASHIMOTO; ASAKAWA, 1998; EVIDENTE et al., 2005; AHMED et al., 2011).

No ensaio de microdiluição em caldo a (-)-5-metilmeléina apresentou atividade antifúngica moderada frente a *P. viticola* e *P. obscurans* (inibição de 50 e 63%, respectivamente) e fraca atividade antifúngica (inibição até 20%) frente à *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fragariae* e *Fusarium oxysporum*, sob a concentração de 300 µM. Esses resultados indicam que a (-)-5-metilmeléina juntamente com os ácidos graxos majoritários encontrados nas frações 7 e 9 podem atuar em sinergismo e serem os responsáveis pela bio-atividade inicialmente observada no extrato bruto.

Krohn et al. (1997) reportou fraca ou nenhuma bioatividade da (-)-5-metilmeléina frente a uma variedade de micro-organismos alvos (bactérias: *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*; fungos: *Ustilago violacea*, *Mycotypha microspora*, *Eurotium repens* e *Fusarium oxysporum*; e a alga *Chlorella fusca*). Ahmed et al. (2011) também observou a ausência de atividade biológica da (-)-5-metilmeléina para os seguintes alvos: as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*; os fungos *Microbotryum violaceum*, *Septoria tritici*, *Botrytis cinerea*, *Pyricularia oryzae* e *Phytophthora infestans* (fungal-like); e a alga *Chlorella fusca*. No entanto, Kokubun et al. (2003) observaram a atividade antimicrobiana dessa substância contra *Aspergillus niger* e *Cladosporium herbarum* sob a concentração de 100 µg/mL e *Bacillus subtilis* sob a concentração de 200 µg/mL.

7 CONCLUSÕES

- Novos relatos de gêneros e espécies de fungos endofíticos sugerem que *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa* abrigam uma comunidade fúngica altamente diversificada como mensurado pelo índice de diversidade. No entanto, a curva de acumulação de espécies sugere que nosso estudo ainda subestima a diversidade de fungos endofíticos e que um maior esforço amostral poderia fornecer uma amostragem exaustiva.
- Os resultados demonstram elevada diversidade diferencial entre as partes de *Melocactus ernestii* sugerindo estratificação na comunidade fúngica endofítica;
- O estudo químico dos extratos bioativos permitiu a identificação de ácidos graxos e o isolamento de substâncias com atividade antifúngica. As substâncias citocalasina H, especificerona A e (-)-5-metilmeléina apresentaram atividade antifúngica fraca ou moderada contra os micro-organismos alvos testados, sendo as espécies do gênero *Phomopsis* as mais sensíveis; esses resultados indicam que essas substâncias podem não ser as únicas responsáveis pela bio-atividade inicialmente observada no extrato bruto. Para o extrato de *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B sugere-se efeito sinérgico da (-)-5-metilmeléina e do ácido linoléico.
- Os efeitos antifúngicos observado nos extratos e frações estudadas dão indícios de que os fungos endofíticos *Fusarium solanii* UFMGCB 5865, *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347, *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350 e *Phoma* sp. UFMGCB 6409 associados à *Melocactus ernestii* e *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2, *Alternaria* sp. 3 Ohu 30A, *Alternaria* cf. *arborescens* Ohu 13A1, *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B, *Cladosporium funiculosum* Ohu 17C1 e *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A associados à *Opuntia humifusa* se encontram em uma relação de simbiose, produzindo substâncias antifúngicas contra possíveis fungos fitopatogênicos. No entanto, as fitotoxinas citocalasina H e especificerona A sugerem que os fungos endofíticos *Diaporthe* sp. e *Phoma* sp. sob condições de estresse podem atuar como fitopatogênicos e causar doença nos cactos.

- Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo sobre substâncias bioativas como ácidos graxos, citocalasina H, especificerona A e (-)-5-metilmeléina produzidas por fungos endofíticos associados a cactos.
- Ao ampliar o conhecimento sobre a descoberta de novos táxons, distribuição geográfica das espécies e produção de substâncias bioativas por fungos endofíticos associados a cactos, muitas cactáceas que se encontram ameaçadas de extinção poderão ser consideradas em projetos que visem a conservação e manejo das espécies de cactos ameaçadas, bem como a bioprospecção de moléculas bioativas.

8 REFERÊNCIAS

AFTS-EUCAST. European Committee on Antibiotic Susceptibility. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E.Dis 7.1. Taufkirchen, Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002.508, 2008.

AGRA, M.F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos Paraíba. Recife: Associação Plantas do Nordeste-PNE, 1996.

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.D.; NURIT, K.; COELHO V.P.; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, p. 323-330, 2007.

AHMAD, A.; DAVIES, J.; RANDALL, S.; SKINNER, G.R.B. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Research*, v. 30, p. 75-85, 1996.

AHMED, I.; HUSSAIN, H.; SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; PADULA, D.; PESCIPELLI, G.; REE, T.; KROHN, K. Three new antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. *European Journal of Organic Chemistry*, p. 2867-2873, 2011.

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD C.S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 96, p 34-42, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (nordeste do Brasil). *Interciência*, v. 27, p. 336-346, 2002.

ALTIERI, C.; BEVILACQUA, A.; CARDILLO, D.; SINIGAGLIA, M. Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 242-245, 2009.

ALTIERI, C.; CARDILLO, D.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M. Inhibition of *Aspergillus* spp. And *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. *Journal of Food Protection*, v. 70, p. 1206-12, 2007.

ALVES, M.A.; SOUZA, A.C.M.; GAMARRA-ROJAS, G.; GUERRA, N.B. Fruto de palma [*Opuntia ficus-indica* (L) Miller, *Cactaceae*]: morfologia, composição química, fisiologia, índices de colheita e fisiologia pós-colheita *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, v. 9, p. 16-25, 2008.

ALY, A.H.; DEBBAB, D.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 90, p. 1829-1845, 2011.

AMBROSE, B.; BECKER, M.; HESSE, U.; SCHARDL, C.L.; SCOTT, B. Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis. *Plant Physiology*, v. 153, 1780-1794, 2010.

ANDERSEN, T.F. A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia* sensu lato employing morphological, ultra-structural and molecular methods. *Mycological Research.*, v. 100, p. 1117-1128, 1996.

ANDERSON, E. F. *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, Oregon, U.S. 2001.

ANDERSON, J.R.; EDWARDS, R.L.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family Xylariaceae. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, v. 1, p. 2185-2192, 1983.

ANDRADE, C.T.S. Um estudo etnobotânico da conexão Homem/Cactaceae no semi-árido baiano, 2002, 73 p., Metrado em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização de cactáceas por sertanejos baianos: tipos conexivos para definir categorias utilitárias. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v. 6, p. 3-12, 2006a.

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v. 8, p. 36-42, 2006b.

ANDRIOLI, W.J.; CONTI, R.; ARAÚJO, M. J.; ZANASI, R.; CAVALCANTI, B.C.; MANFRIM, V.; TOLEDO, J.S.; TEDESCO, D., MORAES, M.O.; PESSOA, C.; CRUZ, A.K.; BERTUCCI, C.; SABINO, J.; NANAYAKKARA, D.N.P.; PUPO, M.T.; BASTOS, J.K. Mycoleptones A–C and Polyketides from the Endophyte *Mycoleptodiscus indicus*. *Journal of Natural Products*, v. 77, p. 70-78, 2014.

ARAÚJO, W. L. de; MARCON, J.; MACCHERONI, W. Jr; VAN ELSAS, J. D.; VAN; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.4906-4914, 2002.

ARNOLD A. E., MAYNARD Z., GILBERT G. S., COLEY P. D., KURSAR T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, v. 3, p. 267–274, 2000.

ARNOLD AE, HENK DA, EELLS RL, LUTZONI F, VILGALYS R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, v. 99, p. 185–206, 2007a.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 100, p. 15649–15654, 2003.

ARNOLD, A.E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In *Current Trends in Mycological Research*, D. Deshmukh, ed. (New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.), 2005, p. 49–68.

ARNOLD, A.E. Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In *Tropical Forest Community Ecology*, W.P. Carson and S.A. Schnitzer, eds. (West Sussex, UK: Wiley-Blackwell), 2008, p. 254–271.

ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, v. 21, p. 51-66, 2007b.

AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid *cis*-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, 956-960, 2001.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L., (Org.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA – Meio Ambiente, 1998.

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

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; ROBINS, J. D.; LUTTRELL, E. S. *Epichloe typhi* from toxic tall fescue grasses. *Applied Environmental Microbiology*, v. 34, p.576-581, 1977.

BAE, H.; SICHER, R.C.; KIM, M.S.; KIM, S.H.; STREM, M.D.; MELNICK, R.L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 3279-3295, 2009.

BALBI-PEÑA, M.I.; BECKER, A.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; LOPES, M.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina - II. Avaliação in vivo. *Fitopatopatologia Brasileira*, v. 31, p. 401-404, 2006.

BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactins among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences*, v. 31, p. 645-650, 2006.

BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. Agroecología, cultivos y usos del nopal. Estudio FAO producción y protección vegetal. Roma: FAO, 1999.

BARROW, J.R. Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza*, v. 13, p. 239-247, 2003.

BARROW, J.R.; LUCERO, M.E.; REYES-VERA, I.; HAVSTAD, K.M. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? *Communicative & Integrative Biology*, v. 1, p. 69-73, 2008.

BARTHOLOTT, W. *Cacti*. Stanley Thornes, Cheltenham. 1979.

BASHYAL B.; Li, J.Y.; STROBEL, G.A.; HESS, W.M. Seimatoantlerium nepalense, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew (*Taxus wallachiana*). *Mycotaxon*, v. 72, p. 33-42, 1999.

BENSON, L. *The cacti of the United States and Canada*. Stanford University Press, Stanford, CA, 1982.

BERGAOUI, A.; BOUGHALLEB, N.; JANNET, H. B.; HARZALLAH-SHIRIC, F.; MAHJOUR, M. E.; MIGHRI, Z. Chemical Composition and Antifungal activity of volatiles from three *Opuntia* species growing in Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 10, p. 2485-2489, 2007.

BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H. Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, v. 109, p. 670-678, 2001.

BERNSTEIN, M. E.; CARROL, C. G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. *Canadian Journal of Botany*, v. 55, p. 644-653, 1977.

BEZERRA, J. D. P.; SANTOS, M. G. S.; BARBOSA, R. N.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; GOMES, B. S.; PAIVA, L. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis*, v. 60, p. 53-63, 2013.

BEZERRA, J. D. P.; SANTOS, M. G. S.; SVEDESE, V. M.; LIMA, D. M. M.; FERNANDES, M. J. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M.. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (*Cactaceae*) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 28, p. 1989-1995, 2012.

BEZERRA, J.L.; RAM, A.A. Crosta negra da baunilha (*Vanilla fragans*) causada por *Mycoleptodiscus indicus* (Moniliales, Hiphomycetes). *Fitopatologia Brasileira*, v.11, p.717-724, 1986.

BILLS, G. F. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: Redlin, S. C.; Carris, L. M. (Org.) *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: systematics, ecology, and evolution*. American Phytopathological Society Press, 1996, p. 31-65.

BOMFIM, A.G.J; ALBUQUERQUE, G.M.R.; BEZERRA, J.D.P.; DA SILVA, D.C.V.; SVEDESE, V. M.; PAIVA, L.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Fungos fitopatogênicos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cultivada em área de floresta tropical seca no Brasil. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*, p. 27-33, 2013.

BOYLE, T. H.; ANDERSON, E. Biodiversity and conservation. In: NOBEL, P. S. (Org.). *Cacti: biology and uses*. Los Angeles: University of California, 2002, p.125-141.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M.; KATZ, B. Antibacterial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technoogy*, v. 63, p. 34-42, 1980.

CARBALLEIRA, N.M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents - a review. *Progress in Lipid Research*, v. 47, p. 50-61, 2008.

CARBALLEIRA, N.M.; O'NEILL, R.; PARANG, K. Racemic and optically active 2-methoxy-4-oxatetradecanoic acids: novel synthetic fatty acids with selective antifungal properties. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 136, p. 47-54, 2005.

CARBALLEIRA, N.M.; O'NEILL, R.; PARANG, K. Synthesis and antifungal properties of α -methoxy and α -hydroxy substituted 4-thiatetradecanoic acids. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 150, p. 82-88, 2007.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, v. 91, p. 553-556, 1999.

CARPENTER, R.C.; SOTHEESWARAN, S.; SULTANBAWA, M.U.S. (-)-5-Methylmellein and Catechol derivatives from four *Semecarpus* species. *Phytochemistry*, v. 19, p. 445-447, 1980.

CARROLL G. C., CARROLL F.E., Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany*, v. 56, p. 3032-3043, 1978.

CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEAVEL, J. Van Der (Org.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 205-222.

CARVALHO, C.R.; GONÇALVES, V.N.; PEREIRA, C.B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I.V.; ALVES, T.M.A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M.E.G.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A., ROSA, L.H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, v. 57, p. 95-107, 2012.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 42, p.181-184, 1967.

CHA, M. N.; JUN, H. I.; LEE, W. J.; KIM, M. J.; KIM, M. K.; KIM, Y. S. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Korean Cactus (*Opuntia humifusa*). *Fruit Food Science Biotechnology*, v. 22, p. 523-529, 2013.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Revista Virtual de Química*, v. 5, p. 421-437, 2013.

CHLEBICKI A.: Some endophytes of *Juncus trifidus* from Tatra Mts. in Poland. *Acta Mycology*, v. 44, p. 11–17, 2009.

CHLEBICKI, A. Some endophytes of *Juncus trifidus* from Tatra Mts. in Poland. *Acta Mycology*, v. 44, p. 11–17, 2009.

CHO, J. Y.; PARK, S. C.; KIM, T. W.; KIM, K. S.; SONG, J. C.; KIM, S. K.; LEE H. M.; SUNG, H. J.; PARK, H. J.; SONG, Y. B. Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 58, p. 113–119, 2006.

CHRETIEN, J.H.; ESSWEIN, J.G.; SHARPE, L.M.; KIELY, J.J.; LYDDON, F.E. Efficacy of undecylenic acid-zinc undecylanate powder in culture positive tinea pedis. *International Journal of Dermatology*, v. 19, p. 51-54, 1980.

CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; BERESTETSKIY, A.; EVIDENTE, A. Production of Phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a Potential Mycoherbicide against Perennial Thistles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 6304-6309, 2008.

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

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. *Ecology*, v. 74, p. 1767-1777, 1993.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, v. 160, p. 99, 2002.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). Wayne, Pennsylvania-USA, 2002.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA, 2003.

COLE, R.J.; COX, R.H. *Handbook of toxic fungal metabolites*, Academic Press: New York, 1981.

COLWELL, R.K.; CODDINGTON, J.A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 345, p. 101-118, 1994.

CORREA, M.P. 1969. Dicionário das plantas úteis do Brasil, v.4. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.

COSTA-NETO, E.; MORAES, V. The use of medicinal plants in the Country of Tanquinho, State of Bahia, Northeastern, Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.2, n.2, p.1-8, 2000.

CRONQUIST, A. R. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York Botanical Garden. Bronx. 1988.

CURRAH, R.S.; SHERBURNE, R. Septal ultrastructure of some fungal endophytes from boreal orchid mycorrhizas. *Mycological Research*, v. 96, p. 583-587, 1992.

DE BARY A. *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten*. Hofmeister's handbook of physiological botany, vol. II, Leipzig, Germany, 1866.

DeFelice, M.S. Prickly pear cactus, *Opuntia* spp.: a spine tingling tale. *Weed Technology*, v. 18, p. 869-877, 2004.

DEWAR, C.L.; SIGLER, L. Fungal Arthritis of the Knee Caused by *Mycocleptodiscus indicus*. *Clinical Rheumatology*, v. 29, p. 1061-1065, 2010.

DOBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. F. (Org.) *New horizons in nitrogen fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 671-676, 1993.

EATON, C.J.; COX, M.P.; SCOTT, B. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science*, v. 180, p. 190-195, 2011.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EDRADA, R.A.; WRAY, V.; BERG, A.; GRÄFE, U.; SUDARSONO, S.; BRAUERS, G.; PROKSCH, P. Novel spiciferone derivatives from the fungus *Drechslera hawaiiensis* isolated from the marine sponge *Callyspongia aerizusa*. *Z. Naturforsch.*, v. 55, p. 218-221, 2000.

ENNOURI, M.; BOURRET, E.; MONDOLOT, L.; ATTIA, H. Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chemistry*, v. 93, p. 431-437, 2005.

ESPINEL-INGROFF, A.; KERKERING, T.M.; GOLDSOON, P.R.; SHADOMY, S. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 1089–1094, 1991.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; MADDAU, L.; FRANCESCHINI, A.; MARRAS, F. Biscopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 568-571, 2005.

EYBERGER, A.L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J.R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 1121–1124, 2006.

FAETH, S. H.; HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and association with leafminers. *Ecology*, v. 78, p. 810-819, 1997.

FARR, D.F.; BILLS, G.F.; CHAMURIS, G.P.; ROSSMAN, A.Y. Fungi on plants and plant products in the United States. 1989, 1252 pp.

FELFILI, M.C.; FELFILI, J.M. Diversidade alfa e beta no cerrado sensu stricto da Chapada Pratinha, Brasil. *Acta botanica brasiliica*, v. 15, p. 243-254, 2001.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative Method. *The American Naturalist*, v. 125, p. 1-15, 1985.

FERRARA, M. A. Fungos endofiticos. Potencial para produção de substâncias bioativas. *Fitos*, v.2, n.1, p.73-79, 2006.

FISHER, P. J. Survival and spread of the endophyte *Stagonospora pteridiicola* in *pteridium aquilinum*, other ferns and some flowering plants. *New Phytologist*, Cambridge, v. 132, p. 119-122, 1996.

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

FOSTER, S.; DUKE, J.A. Field Guide to medicinal plants and herbs of eastern and Central North America, 2000.

FREDLUND, E.; GIDLUND, A.; OLSEN, M.; BORJESSON, T.; HYTTE SPLIID, N.; SIMONSSON, M. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *Journal of Microbiological Methods*, v. 73, p. 33-40, 2008.

FREIRE, F.C.O. Patógenos Associados ao Mandacaru (*Cereus jamacaru*) no Estado do Ceará. Comunicado Técnico EMBRAPA, p. 148. ISSN 1679-65352009.

FROHLICH, J.; HYDE, K. D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? *Biodiversity and Conservation*, v. 8, p. 977-1004, 1999.

FU, J.; ZHOU, Y.; LI, H.; YE, Y; GUO, J. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, p. 1231-1236, 2011.

FURTADO, M.V. Micobiota associada a folhas de bananeira em Cabo Verde. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa-PT, 2011.

GAI, C.S.; LACAVA, P.T.; MACCHERONI JR., W.; GLIENKE, C.; ARAÚJO, W.L.; MILLER, T.A.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, v. 49, p. 441-451, 2009.

GALATI, E. M., MONDELLO, M. R., MONFORTE, M. T., GALLUZO, GEBHARDT, R. Variable influence of kaempferol and myricetin on in vitro hepatocellular cholesterol biosynthesis. *Planta Medica*, v. 69, p. 1071-1074, 2003.

GALATI, E.M.; MONFORTE, M.T.; TRIPODO, M.M.; D'AQUINO, A.; MONDELLO, M.R. Antiulcer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 1-9, 2001.

GARCIA-EFFRON, G.; PARK, S.; PERLIN, D.S. Correlating echinocandin MIC and kinetic inhibition of fks1 mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 112–122, 2009.

GARCIA-REYNE, A.; LÓPEZ-MEDRANO, F.; MORALES, J.M.; ESTEBAN, C.G.; MARTÍN, I. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease*, v. 13, p. 204-207, 2011.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*, v. 3, p. 240–254, 2010.

GERSHON, H.; SHANKS, L. Antifungal activity of fatty acids and derivatives: structure-activity relationships. In: Kabara JJ ed. *The Pharmacological Effect of Lipids*. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society; 1978:51-62.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1323-1330. 1995.

GODINHO, V.M.; FURBINO, L.E.; SANTIAGO, I.F.; PELLIZZARI, F.M.; YOKOYA, N.S.; PUPO, D.; ALVES, T.M.A.; JUNIOR, P.A.S; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; CANTRELL, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME Journal*, v. 7, p. 1434-1451, 2013.

GOLDSTEIN, G.; NOBEL, P. S. Water relations and low-temperature acclimation for cactus species varying in freezing tolerance. *Plant Physiology*, v. 104, p. 675-681, 1994.

GOMES, R.P. *Fruticultura brasileira*. São Paulo: Nobel. 1972.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, v. 31, p. 1-41, 2013.

GOND, S. K.; VERMA, V. C.; KUMAR, A. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (*Rutaceae*) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1371-1375, 2007.

GONZÁLEZ, V.; TELLO, M.L. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, v. 47, p. 29-42, 2011.

GRANDI, R.A.P.; SILVA, T.V. Fungos Anamorfos decompositores do folheto de *Caesalpinia echinata* Lam. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 29, p. 275-287, 2006.

GUERREIRO, W.; ANDRADE, C.T.; MARQUES, J.G. Um estudo de caso da conexão Homem/vegetal (*Cactaceae/Bromeliaceae*), no Semi-árido Alagoano. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA, 3., 2000, Piracicaba - SP Resumos... Piracicaba - SP, 2000. p.68.

GUO, L.D.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*, v. 147, p. 617-630, 2000.

GUREVITCH, J.; SCHEINER, S.M.; FOX, G.A. *Ecologia Vegetal*. 2º ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 592 p.

GUREVITCH, J.; SCHEINER, S.M.; FOX, G.A. *Ecologia Vegetal*. Estrutura, crescimento e declínios populacionais, ed. Artmed, São Paulo, 2009, p 101-127.

HAHM, S. W.; PARK, J.; SON, Y. S. *Opuntia humifusa* partitioned extracts inhibits the growth of U87MG human glioblastoma cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 65, p. 247-252, 2010.

HAHM, S. W.; PARK, J.; SON, Y. S. *Opuntia humifusa* stems lower blood glucose and cholesterol levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research*, v. 31, p. 479-487, 2011.

HAHM, S. W.; PARK, J.; SON, Y.S. *Opuntia humifusa* partitioned extracts inhibit the growth of U87MG human glioblastoma cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 65, p. 247-252, 2010.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4, p. 9, 2001.

HARRISON, S; ROSS, S.J.; LAWTON, J.H. Beta diversity on geographic gradients in Britain. *Journal of Animal Ecology*, v. 61, p. 151-158, 1992.

HARTLEY, S.E.; GANGE, A.C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology*, v. 54, p. 323–342, 2009.

HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Biologically active substances of japanese inedible mushrooms. *Heterocycles*, v. 47, p. 1067-1109, 1998.

HAWKSWORTH, D. L. The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, London, v. 96, p. 3-20, 1988.

HERNANDEZ, H. M.; GODINEZ, H. Contribucion al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botanica Mexicana*, v. 26, p. 33-52. 1994.

HERRERA, J.; KHIDIR, H.H.; EUDY, D.M.; PORRAS-ALFARO, A.; NATVIG, D.O.; SINSABAUGH, R.L. Shifting fungal endophyte communities colonize *Bouteloua gracilis*: effect of host tissue and geographical distribution. *Mycologia*, v. 102, p. 1012–1026, 2010.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. El interesante mundo de las cactáceas. México: Fondo de Cultura Económica, 1995, 235p.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, v. 33, p. 61-75, 2009.

HUELSENBECK, J. P. Testing a covariotide model of DNA sub-stitution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, p. 698-707, 2002.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754-755, 2001.

HUGHES, F. M.; DE LA CRUZ, M.; ROMÃO, R. L.; CASTRO, M. S. Dinâmica espaço-temporal de *Melocactus ernestii* subsp. *ernestii* (Cactaceae) no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 34, p. 389-402, 2011.

HUNT, D. *CITES Cactaceae Checklist*, 2. ed. Royal Botanic Gardens, Kew and Int. Org. Succulent Pl. Study, Zürich. 1999.

INGLESE, P.; BASILE, F.; SCHIRRA, M. Cactus Pear Fruit Production. In: Nobel, P.S.(Ed.) *Cacti. Biology and Uses*. University of California Press, Berkeley, 2002.

IRIART, X.; BINOIS, R.; FIOR, A.; BLANCHET, D.; BERRY, A. Eumycetoma caused by *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*): a case report and a mini-review of *Diaporthe/Phomopsis* spp. invasive infections in humans. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, p. 1492-1494, 2011.

IUCN – Red list of threatened Species. (on line) Available on the internet via the URL: <http://www.bdt.org.br/redflora/>; consulted on June 10. 2012.

IZAWA, Y.; HIROSE, T.; SHIMIZU, T.; KOYAMA, K.; NATORI, S. Six new 10-phenyl-[11]cytochalasans, cytochalasins N-S from *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*, v. 45, p. 2323-2335, 1989.

JIAO, W.; FENG, Y.J.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.; MUNRO, M.H.J. Chaetoglobosins Q, R, and T, three further new metabolites from *Chaetomium globosum*. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1722-1725, 2004.

JORDAN, P. W.; NOBEL, P. S. Height distributions of the two species of cacti in relation to rainfall, seedling establishment, and growth. *Botanical Gazette*, v. 143, n. 4, p. 511-517, 1982.

JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M.; PEREIRA, M.; LIMA, M.M.; CHAVES, R.C. Doenças da goiabeira no cerrado. Comunicadotécnico EMBRAPA Cerrados, v. 15, p. 1-32. 2001.

KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D.M.; CONLEY, A.J.; TUANT, J.P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 2, p. 23-28, 1972.

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

KIM, J. H.; LEE, H. J.; LEE, H. S.; LIM, E. J.; IMM, J. Y.; SUH, H. J. Physical and sensory characteristics of fibre-enriched sponge cakes made with *Opuntia humifusa*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 47, p. 478-484, 2012.

KIM, J.; JHO, K. H.; CHOI, Y. H.; NAM, S. Y. Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. *Food & Function*, v. 4, p. 681-688, 2013.

KROHN, K.; BAHRAMSARI, R.; FLISKE, U.; LUDEWIG, K.; KLICHESPORY, C.; MICHEL, A.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry*, v. 45, p. 313-320, 1997.

KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 358–363, 2006.

KOKUBUN, T.; VEITCH, N.C.; BRIDGE, P.D.; SIMMONDS, M.S.J. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. *Phytochemistry*, v. 62, p. 779-782, 2003.

KOLEFF, P.; GASTON, K.J.; LENNON, J.J. Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology*, v. 72, p. 367-382, 2003.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemistry Reviews*, v. 11, p. 507-522, 2012.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, v. 19, p. 792-798, 2012.

KUSARI, S.; KO_SUTH, J.; _CELLAROVA, E.; SPITELLER, M. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecology*, v. 4, p. 219–223, 2011.

KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 159-162, 2008.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Camptothecin: recent advances in plantendophyte research. In *Natural Resources Conservation and Management*, L.R. Patro, ed. (New Delhi, India: Manglam Publications), 2012b, pp. 1–32.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In: ROESSNER, U. (Org.) *Metabolomics*, Croatia: InTech, p. 241-266, 2012a.

LACHANCE, M.-A., BOWLES, J. M., STARMER, W. T. & BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 45, p. 172-177, 1999.

LANA, T.G.; AZEVEDO, J.L.; POMELLA, A.W.; MONTEIRO, R.T. Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (*Tricholomataceae*) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genetics and Molecular Research*, v. 10, p. 326-334, 2011.

LARGAY, E.; L. SNEDDON. *Addendum to the Guide to the Ecological Systems and Vegetation Communities of the Delaware Estuary*. NatureServe. Arlington, Virginia. Partnership for the Delaware Estuary, 2009, 112 p.

LEE, J. L.; KIM, A.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Differential expression of E prostanoid receptors in murine and human non-melanoma skin cancer. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 125, p. 818-825, 2005.

LEE, J.; JUNG, B. G.; KIM, T. H.; LEE, S. G.; PARK, Y. S.; LEE, B. J. Dietary feeding of *Opuntia humifusa* inhibits UVB radiation-induced carcinogenesis by reducing inflammation and proliferation in hairless mouse model. *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, p. 1208-1215, 2013.

LEE, K. S.; KIM, M. G.; LEE, K. Y. Antimicrobial effects of the extracts of cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *Journal of Korean Society Food Science Nutrition*, v. 33, p. 1268-1272, 2004.

LEGAULT, D.; DESSUREAULT, M.; LAFLAMME, G. Mycoflore dès aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* I. Champignons endophytes. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 67, p. 2053-2060, 1989.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. Numerical ecology, 2nd English edn. Elsevier, Amsterdam. 1998.

LE MOS, J.A.; COSTA, M.; LEMOS, A.A.; SILVA, M.R.R. Isolamento e identificação de fungos em farinha de mandioca em Goiânia (Goiás). *Revista de Patologia Tropical*, v. 30, p. 31-36, 2001.

LESLIE, J.; SUMMERELL, B.A. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Iowa, 2006.

LEWIS, W. *Plants affecting man's health*. In: Medical botany, New York: Willey, 1977.

LI, L.Y.; SCATTLER, I.; DENG, Z.W.; GROTH, I.; WALTHER, G.; MENZEL, K.D.; PESCHEL, G.; GRABLEY, S.; LIN, W.H. A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 511–517, 2008.

LIECKFELDT, E., MEYER, W.; BORNER, T., Rapid identification and differentiation of yeast by DNA and PCR fingerprinting. *Journal. Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.

LIMA, J. L. S. DE. 1996. *Plantas forrageiras das caatingas – usos e potencialidades*. Petrolina, EMBRAPA-CPATSA, PNE, RBGKEW, 37p.

LIU, K.; DING, X.; DENG, B.; CHEN, W. Isolation and characterization of endophytic taxol producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36, p. 1171–1177, 2009.

LIU, S.; WEIBIN, R.; JING, L.; HUA, X.; JINGAN, W.; YUBAO, G.; JINGGUO, W. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia*, v. 66, p. 93-102, 2008.

LUZ, J.S.; SILVA, R.L.O.; SILVEIRA, E.B. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Caatinga*, v.19, p.128-134, 2006.

MAGALHÃES, A. Perfil etnobotânico e conservacionista das comunidades do entorno da reserva natural Serra das almas, Ceará-Piauí, Brasil, 2006, 68p. Dissertação de Mestrado, Programa Regional de Pós-graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MAGURRAN, A.E. *Measuring Biological Diversity*. Oxford, Blackwell Science Ltd., 2004, 256 p.

MAJURE, L.C. Towards an Evolutionary Understanding of the *Opuntia humifusa* Complex of North America. *Cactus and Succulent Journal*, v. 82, p. 156-163, 2010.

MAJURE, L.C.; ERVIN, G.N. The Opuntias of Mississippi, *Haseltonia*, v. 14, p. 111-126, 2008.

MAJURE, L.C.; FITZPATRICK, P.; ERVIN, G.N. Storm-driven maritime dispersal of prickly pear cacti (*Opuntia* species). USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, International *Cactoblastis cactorum* Conference, Phoenix, AZ, May 7–10, 2007.

MANDYAM, K., JUNPPONEM, A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophyte. *Studies in Micology*, v. 53, 173-189, 2005.

MARQUEZ, S.S.; BILLS, G.F.; ZABALGOGEAZCOA, I. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*, v. 27, p. 171-195, 2007.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; DELLA-TOGNA, G.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A.; GERWICK, W.H.; CUBILLA-RIOS, L. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *Journal of Natural Products*, v.71, p. 2011–2014, 2008.

MAUSETH, J. D. The structure of photosynthetic, succulent stems in plants other than cacti. *The International Journal of Plant Sciences*, v. 165, p. 1-9, 2004.

MAUSETH, J.D. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, v. 98, p. 901-926, 2006.

MAXWELL, P. The rhipsalis riddle – or the day the cacti came down from the trees: part 1. 1998. Disponível em: <<http://www.rhipsalis.com/maxwell.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

MAXWELL, P. The rhipsalis riddle – or the day the cacti came down from the trees: part 2. 1999. Disponível em: <<http://www.rhipsalis.com/maxwell.htm>>. Acesso em: 15 abr. 2012.

MCDONOUGH, V.; STUKEY, J.; CAVANAGH, T. Mutations in *erg4* affect the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to medium-chain fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 15, p. 109-118, 2002.

MCLAIN, N.; ASCANIO, R.; BAKER, C.; STROHAVER, R.A.; DOLAN, J.W. Undecylenic acid inhibits morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 2873-2875, 2000.

MCMILLAN, J. A.; CHIANG, C. C.; GREENSLEY, M. K.; PAUL, I. C.; PATWARDHAN, S. A.; DEV, S.; BENO, M. A.; CHRISTOPH, G. G. X-Ray crystal and molecular structure of kodo-cytochalasin-1. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, v. 4, p. 105, 1977.

MOMESSO, L. S. Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* e *Chaetomium globosum*. 2008. 126p. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008.

MORAES, W.S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J.D. Incidence of mushrooms in post harvest of banana (*Musa* spp.) Prata Anã (AAB). *Summa Phytopathology*, v. 32, p. 67-70. 2006.

MORALES-RONDÓN, V.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, M. Hongos endofitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v.23, p. 273-283, 2006.

MORICCA, S; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*, v. 98, p. 380–386, 2008.

MORSY, M.R.; OSWALD, J.; HE J.; TANG, Y.; ROOSSINCK, M.J. Teasing apart a three-way symbiosis: transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 401, p. 225-230, 2010.

MOTA, C.N. *Jurema's Children in the forest of spirits: healing and ritual among two Brazilian indigenous groups*. London: Intermediate Technology Publications, 1997. 133p.

MOTYL, M.R.; TAN, C.; LIBERATOR, P.; GIACOBBE, R.; RACINE, F.; HSU, M.; NIELSEN-KAHN, J.; DOUGLAN, C.; BOWMAN, J.; HAMMOND, M.; BALKOVEC, J.; GREENLEE, M.; MENG, D.; PARKER, D. ; PEEL, M.; FAN, W.; MAMAI, A.; HONG, J.; ORR, M.; OUVRAY, G.; PERREY, D. ; LIUA, H.; JONES, M.; NELSON, K.; OGBU, C.; LEE, S.; LI, K. ; KIRWAN, R.; NOTE, A.; SLIGAR, J.; MARTENSEN, P. MK-3118, an oral enfumafungin with potent in vitro activity against *Candida* and *Aspergillus* spp. 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy F1–847, 2010.

MURZYN, A.; KRASOWSKA, A.; STEFANOWICZ, P.; DZIADKOWIEC, D.; ŁUKASZEWICZ, M. Capric Acid Secreted by *S. boulardii* Inhibits *C. albicans*

Filamentous Growth, Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE*, v. 8, p. 12050, 2010.

NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T.; KIMURA, Y. Structure of Spiciferone A, a novel y-pyrone plant growth inhibitor produced by the fungus *Cochliobolus spicifer* Nelson. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, p. 2297-2299, 1989.

NAKAJIMA, H.; KIMURA, Y.; HAMASAKI, T. Spiciferone, an azaphilone phytotoxin produced by the fungus *Cochliobolus spicifer*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 105-107, 1992.

NALINI M S, MAHESH B, TEJESVI M V, PRAKASH H S, SUBBAIAH V, KINI K R AND SHETTY H. *Mycopathologia*, v. 159, p. 245–249, 2005.

NATORI, S.; YAHARA, I. In: *Mycotoxins and phytoalexins*; SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D. K., eds.; CRC Press: Boca Raton, 1991.

NEFZAOU, A.; NAZARENO, M.; MOURID, E. M. Review of medicinal uses of cactus. *Cactusnet*, 2008.

NEFZAOU, A; SALEM, H.B. Forage, fodder, and animal nutrition. In: Nobel, P.S.(Ed.) *Cacti. Biology and Uses*. University of California Press, Berkeley, 2002.

NOBEL, P. S. *Environmental biology of agaves and cacti*. Oxford University Press, New York, NY. 1988.

NOBEL, P. S. Responses of some North American CAM plants to freezing temperatures and doubled CO₂ concentrations: implications of global climate change for extending cultivation. *Journal of Arid Environments*, v. 34, p. 187-196, 1996.

NOBEL, P.S. Surface temperatures of cacti influences of environmental and morphological factors. *Ecology*, v. 59, p. 986–996, 1978.

NUGENT, L.K.; SIHANONTH, P.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A.J.S. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. *Mycologist*, v. 19, p. 40-43, 2005.

NYLANDER, J.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P.; NIEVES-ALDREY, J. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*, v. 53, p. 47-67, 2004.

OLIVEIRA, C. M.; REGASINI, L. O.; SILVA, G. H.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; BERLINCK, R. G. S.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. *Phytochemistry Letters*, v. 4 p. 93-96, 2011.

OLIVEIRA, C. M.; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; ZANARDI, L. M.; EVANGELISTA, A. H.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp. 1 and sp.2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (*Rubiaceae*). *Z Naturforsch C*, v. 64, p. 824-830, 2009.

ONISHI, J.; MEINZ, M.; THOMPSON, J.; CUROTTO, J.; DREIKORN, S.; ROSENBAACH, M.; DOUGLAS, C.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; KONG, L.; CABELLO, A.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; DIEZ, M.T.; MARTIN, I.; BILLS, G.; GIACOBBE, R.; DOMBROWSKI, A.; SCHWARTZ, R.; MORRIS, S.; HARRIS, G.; TSIPOURAS, A.; WILSON, K.; KURTZ, M.B. Discovery of novel antifungal (1,3)- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, p. 368–377, 2000.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, p. 315-342, 2010.

OSONO, T. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. *Mycoscience*, v. 48, p. 47-52, 2007.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.P.; BEGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 37, p.155-162, 1997.

PANACCIONE, D. G.; JOHNSON, R. D.; WANG, J.; YOUNG, C. A.; DAMRONGKOOL, P.; SCOTT, B.; SCHARDT, C. L. Elimination of ergovaline from grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, p. 12820-12825, 2001.

PARK, E. H.; KAHNG, J.H.; PAEK, E.A. Studies on the pharmacological actions of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Archives of Pharmacal Research*, v. 21, p. 30-34, 1998.

PARK, E.H.; KAHNG, J.H.; LEE, S.H.; SHIN, K.H. An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia*, v. 72, p. 288-290, 2001.

PARK, J.; HAHM, S. W.; SON, Y. S. Effects of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) Seeds Treatment on the Mass, Quality, and the Turnover of Bone in Ovariectomized Rats. *Food Science and Biotechnology*, v. 20, p. 1517-1524, 2011.

PELÁEZ, F.; CABELLO, A.; PLATAS, G.; DÍEZ, M.T.; GONZÁLEZ, A.; BASILIO, A.; MARTÍN, I.; VINCENTE, F.; BILLS, G.F.; GIACOBBE, R.A.; SCHWARTZ, R.E.; ONISHI, J.C.; MEINZ, M.S.; ARBRUZZO, G.K.; FLATTERY, A.M.; KONG, L.; KURTZ, M.B. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by endophytic *Hormonema* species, biological activity, and taxonomy of the producing organisms. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 23, p. 333–343, 2000.

PEREIRA, V.M.O. Incidência e frequência de fungos em bananas comercializadas na feira livre de pombal - PB. *Revista Verde*, v. 5, p. 218-223, 2010.

PETRINE, O.; STONE, J.; CARROL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 60, p. 789-796, 1982.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Org.) *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag, 1991, p. 179-197.

PETRINI, O.; PETRINI, L. E.; RODRIGUES, K. Xylariaceae endophytes: an exercise in biodiversity. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 531-539, 1995.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 48, p. 367-372, 2006.

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

PIERSON, E. A.; TURNER, R. M. An 85-year study of saguaro (*Carnegiea gigantea*) demography. *Ecology*, v. 79, p. 2676-2693. 1998.

PIMENTEL, L. C.; KUCKKOWSKY, F. R.; CHIME, A. M.; AVER, C. G.; GRIGOLETTI Jr., A. Fungos endofíticos em folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta Curitiba*, v. 36, p. 123-128, 2006.

PINRUAN, U.; RUNGJINDAMAI, N.; CHOYKLIN, R.; LUMYONG, S.; HYDE, K.; JONES, E. Occurrence and diversity of basidiomycetous endophytes from the oil palm, *Elaeis guineensis* in Thailand. *Fungal Diversity*, v. 41, p. 71-88, 2010.

POHL, C.H.; KOCK, J.L.F.; THIBANE, V.S. Antifungal free fatty acids: A Review. *Formatex Research Center*, p.61-67, 2011.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 789-802, 2006.

POWELL, A.M.; WEEDIN, J.F. *Cacti of the Trans-Pecos and adjacent areas*. Texas Tech University Press, Lubbock, TX, 2004.

PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of *podophyllotoxin* and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology*, v. 122, p. 495-510, 2005b.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 1717-1719, 2005a.

QUANG, D. N.; HAHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. *The Chemical Record*, v. 6, p. 79-99, 2006a.

QUANG, D.N.; HARINANTENAINA, L.; NISHIZAWA, T., HASHIMOTO, T., KOHCHI, C., SOMA, G-I; ASAKAWA, Y. Inhibition of nitric oxide production in raw 264.7 cells by azaphilones from xylariaceous fungi. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 34-37, 2006b.

QUANG, D.N.; HASHIMOTO, T.; FOURNIER, J.; STADLER, M.; RADULOVIC, N.; ASAKAWA, Y. Sassafrins A-D, new antimicrobial azaphilones from the fungus *Creosphaeria sassafras*. *Tetrahedron*, v. 61, p. 1743-1748, 2005b.

QUANG, D.N.; HASHIMOTO, T.; NORUMA, Y.; WOLLWEBER, H.; HELLWIG, V.; FOURNIER, J.; STADLER, M.; ASAKAWA, Y. Cohaerins A and B, azaphilones from the fungus *Hypoxylon cohaerens*, and comparison of HPLC-based metabolite profiles in *Hypoxylon* sect. *Annulata*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 797-809, 2005a.

REBMAN, J.P.; PINKAVA, D.J. *Opuntia* cacti of North America: an overview. *Florida Entomologist*, v. 84, p. 474-483, 2001.

REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, T.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, v. 298, p. 1581, 2002.

RHEDER, P.; NGUYEN, T.T. A new concept in the treatment of onychomycosis with cyanoacrylate, undecylenic acid and hydroquinone. *Foot and Ankle Specialist*, v. 1, p. 93-96, 2008.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*, v. 42, p. 265-270, 1950.

ŘIHÁKOVÁ Z., FILIP V., PLOCKOVÁ M., ŠMIDRKAL J., ČERVENKOVÁ R. Inhibition of *Aspergillus niger* DMF 0801 by monoacylglycerols prepared from coconut oil. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 20, p. 48-52, 2002.

RIZZINI, C. T. *Melocactus no Brasil*. Ed. IBDF, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 1982, 142 pp.

ROCHA, A.C.S.; GARCIA, D.; UETANABARO, A.P.T.; CARNEIRO, R.T.O.; ARAÚJO, I.S.; MATTOS, C.R.R.; GÓES-NETO, A. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity*, v. 47, p. 75–84, 2011.

ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do Pico do Jabre, Paraíba, Brasil: Cactaceae Juss. *Acta Botanica Brasilica*, v. 16, p. 15-21, 2002.

ROCHA, R.; LUZ, D. E.; ENGELS, C.; PILIGGI, S. A. V.; JACCOUD FILHO, D. S.; MATIELLO, R. R.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale*) for in vitro Biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 73-78, 2009.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, v. 86, p. 376–385, 1994.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. *Diversity of Tropical Microfungi*. Hong Kong, University of Hong Kong Press, 1997, p. 57-69.

RODRIGUEZ, K. F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, New York, v. 86, 1994, p. 376-385.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, v. 182, p. 314–330, 2009.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 1109–1114, 2008.

ROSA, L. H. ; VAZ, A. B. M. ; CALIGIORNE, R. B. ; CAMPOLINA, S. ; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology*, v. 32, p. 161-167, 2009.

ROSA, L. H.; GONÇALVES, V.N.; CALIGIORNE, R.B.; ALMEIDA ALVES, T.M.; RABELO, A.L.T.; SALES, P.A.; ROMANHA, A.J.; SOBRAL, M.E.G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1-11, 2010.

ROSA, L.H.; QUEIROZ, S.C.N.; MORAES, R.R.; WANG, X.; TECHEN, N.; PAN, Z.; CANTRELL, C.L.; WEDGE, D.E. *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smilax sonchifolius* (Asteraceae). *Symbiosis*, v. 60, p.133-142, 2013.

ROSA, L.H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; PAN, Z.; WEDGE, D. E.; MORAES, R.M. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smilax sonchifolius* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 58, p. 1202-1211, 2012b.

ROSA, L.H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; WEDGE, D.E.; PAN, Z.; BERNIER, U.R.; BECNEL, J.J.; AGRAMONTE, N.M.; WALKER, L.A.; MORAES, R.M. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with

Micropropagated Medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences*, v. 3, p. 1105-1114, 2012a.

SABZALIAN, M.R.; MIRLOHI, A. Neotyphodium endophytes trigger salt resistance in tall and meadow fescues. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v. 173, p. 952–957, 2010.

SADO-KAMDEM, S.L.; VANNINI, L.; GUERZONI, M.E. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129, p. 288-294, 2009.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H; HELANDER, M.L.; SULLIVAN, T.J.. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, v. 50, p. 1–8, 2005.

SANTOS, M.N.S. Contribuição para o Conhecimento das Relações *Quercus suber* - *Biscogniauxia mediterranea* (syn. *Hypoxilon mediterraneum*). *Silva Lusitana*, v.11, p. 21-29, 2003.

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

SCHULZ, B.; ROMMERT, A.K.; DAMMANN, U.; AUST, H.J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycological Research*, v.103, p. 1275–1283, 1999.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST., H. J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness on surface sterilization methods. *Mycological Research*, Cambridge, v. 97, p. 1447-1450, 1993.

SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C. What are endophytes? In *Microbial Root Endophytes*, B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, and T.N. Sieber, eds. (Berlin: Springer-Verlag), 2006, pp. 1–13.

SCHWARTZ, R.E.; SMITH, S.K.; ONISHI, J.C.; MEINZ, M.; KURTZ, M.B.; GIACOBBE, R.A.; WILSON, K.E.; LIESCH, J.; ZINK, D.; HORN, W.; MORRIS, S.; CABELLO, A.; VICENTE, F. The isolation and structure determination of enfumafungin, a triterpene glycoside antifungal agent from the fermentation of a *Hormonema* sp. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, p. 4882–4886, 2000.

SHAPIRO, A.L.; ROTHMAN, S. Undecylenic acid in the treatment of dermatomycoses. *Archives of Dermatology and Syphilology*, v. 52, p. 166-171, 1945.

SHAPIRO, K.; GONG, W.C. Use of herbal products for diabetes by Latinos. *Journal of American Pharmacists Association*, v. 42, p.278-279, 2002.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (Piperaceae). *Quimica Nova*, v. 33, p. 2038-2041, 2010.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botânica Brasileira*, v. 20, p. 649-655, 2006.

SILVEIRA, S.M.C; RAMOS, A.F.H.; SOUZA, I.A.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; VIEIRA, V.A. Perfil hematológico de ratas prenhes tratadas com *Cereus jamacaru*. XXI Reunião Anual da FESBE. Águas de Lindóia-SP, Brasil, 2006.

SIRIKANTARAMAS, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. A survival strategy: the coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1894-1898, 2009.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. Principles of numerical taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman, 1973.

SOUZA, A.E.F.; NASCIMENTO, L.C.; ARAÚJO, E.; LOPES, E.B.; SOUTO, F.M. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no semiárido paraibano. *Biotemas*, v. 23, p. 11-20, 2010.

SOUZA, I.A.; LIMA, M.C.A.; MELO, U.B.C.; HIGINO, J.S. Antitumour properties of *Cereus jamacaru* on experimental model of cancer in: fundamental & Clinical Pharmacology. 3rd Meeting of the federation of the European Pharmacological Societies, Lyon, France, v. 15, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2005.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Nocardopsis* sp endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 105-109, 2002.

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

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 58, p. 1315- 1324, 1995.

STIERLE, A.A.; STIERLE, D.B.; KELLY, K. Berkelic acid, a novel spiroketal with selective anticancer activity from an acid mine waste fungal extremophile. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 71, p. 5357-5360, 2006.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 49, p. 175–194, 2005.

STONE JK, POLISHOOK JD, WHITE JRJ. Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills GF, Foster MS, eds. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Burlington, MA, USA: Elsevier, 2004, p 241–270.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE Jr., J. F. An overview of endophytic microbes: endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C. W.; WHITE Jr., J. F. (Org.) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, 2000, p 3-29.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A. Microbial gifts from rain forests. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 24, p. 14-20, 2002.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *American Society for Microbiology News*, v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, v.9, p. 240-244, 2006.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 257-268, 2004.

- SUN, X.; GUO, L.D.; HYDE, K.D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity*, v. 47, p.85–95, 2011.
- SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V. Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. *Mycological Research*, v. 104, p. 1465–1467, 2000.
- SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON, J. A. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 1003–1006, 1998.
- SURYANARAYANAN, T. S.; THENNARASAN, S. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity*, v. 15, p. 195–202, 2004.
- SURYANARAYANAN, T.; WITTLINGER, S. K.; FAETH, S. H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research*, v. 109, p. 635–639, 2005.
- SURYANARAYANAN, T.S; MURALI, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; RAJULU, M.B.G.; VENKATESAN, G.; SUKUMAR, R. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodiversity and Conservation*, v. 20, p. 913-928, 2011.
- SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, p. 88-90, 2002.
- SUTTON, D.A.; TIMM, W.D.; MORGAN-JONES, G.; RINALDI, M.G. Human phaeohyphomycotic osteomyelitis caused by the coelomycete *Phomopsis saccardo* 1905: criteria for identification, case history, and therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 807-811, 1999.
- SUZUKI, K.; SHONO, F.; KAI, H.; UNO, T.; UYEDA, M. Inhibition of topoisomerases by fatty acids. *Journal of Enzyme Inhibition*, v. 15, p. 357-366, 2000.

SWART, W.J.; KRIEL, W.M. Disease Notes Pathogens Associated with Necrosis of Cactus Pear Cladodes in South Africa. *Plant Disease*, v. 86, p. 693. 2002.

SWOFFORD, D.; WADDELL, P.; HUELSENBECK, J. Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic Biology*, v. 50, p. 525-539, 2001.

SYLVAIN, L.S.; LUCIA, V.M.; ELISABETTA, G. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129, p. 288-294, 2009.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, 2731-2739, 2011.

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

TAO, Y.; ZENG, X.; MOU, C.; LI, J.; CAI, X.; SHE, Z.; ZHOU, S.; LIN, Y. ^1H and ^{13}C NMR assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 46, p. 501-505, 2008.

TAYLOR, N. P. Cactaceae. In: Oldfield, Sara (Org.). *Cactus and Succulent Plants: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Cambridge. 1997, p. 17-20.

TAYLOR, N. P. Taxonomy and phytogeography of the Cactaceae of eastern Brazil. 2000. PhD thesis. The Open University and Royal Botanic Gardens, Kew.

TAYLOR, N. P. The genus *Melocactus* (Cactaceae) in Central and South America. *Bradleya*, v. 9, p. 1-80. 1991.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D. C. *Cacti of Eastern Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew. 2004.

TEJESVI, M.V., MAHESH, B., NALINI, M.S., PRAKASH, H.S., KINI, K.R., SUBBIAH, V., SHETTY, H.S. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (*Combretaceae*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1535–1540, 2005.

TEJESVI, M.V.; KAJULA, M.; MATTILA, S.; PIRTTILÄ, A.M. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*, v. 47, p. 97–107, 2011.

THIBANE, V.S.; KOCK, J.L.F.; ELLS, R.; VAN, W.Y.K.; POHL, C.H. Effect of marine polyunsaturated fatty acids on biofilm formation of *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Marine Drugs*, v. 8, p. 2597-2604, 2010.

TOJU, H.; YAMAMOTO, S.; SATO, H.; TANABE, A.S.; GILBERT, G.S.; KADOWAKI, K. Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: “codominance” of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecology and evolution*, v. 3, p. 1281–1293, 2013.

TOURINHO, M.J. Abordagem etnofarmacológica das plantas medicinais diuréticas no povoado de Capim Grosso, município de Canindé de São Francisco, Sergipe. *Curitiba*, v.3, p.34-47, 2000.

UNTERSEHER M.; REIHER, A.; FINSTERMEIER K.; OTTO P., MORAWETZ, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress*, v. 6, p. 201-212, 2007.

UNTERSEHER, M.; SCHNITTLER, M. Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, v. 3, p. 366–378, 2010.

VAZ, A.B.M.; FONTENLA, S.; ROCHA, F.S.; BRANDÃO, L.R.; VIEIRA, M.L.A.; GARCIA, V.; GÓES-NETO, A.; ROSA, C.A. Fungal endophyte β -diversity associated with *Myrtaceae* species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). *Fungal Ecology*, v. 8, p. 28-36, 2014.

VIEIRA, M.L.A.; HUGHES, A.F.S.; GIL, V.B.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 58, p. 54-66, 2012.

VUJANOVIC, V.; BRISSON, J. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. *Mycological Progress*, v. 1, p. 147-154, 2002.

WAGENAAR, M.; CORWIN, J.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochadiella*. *Journal Natural Products*, v. 63, p.1692-1695, 2000.

WALLACE, R. S. Molecular systematic study of the Cactaceae: using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. *Bradleya*, v. 13, p. 1-12. 1995.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K.H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, p.13386–13391, 2005.

WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia*, v. 157, p. 87-90, 2004.

WALTERS, D.R.; WALKER, K.L.; WALKER, K.C. Lauric Acid Exhibits Antifungal Activity Against Plant Pathogenic Fungi, *Journal of Phytopathology*, v. 151, p. 228–230, 2003.

WANG, F.W.; YE, Y.H.; DING, H.; CHEN, Y.X.; TAN, R.X.; SONG, Y.C. Benzophenones from *Guignardia* sp. IFB-E028, an endophyte on *Hopea hainanensis*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, p. 216–220, 2010.

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

WANG, L.L.; JOHNSON, E.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 624-629, 1992.

WANG, X.; RADWAN, M. M.; TARAWNEH, A. M.; GAO, J.; WEDGE, D. E.; ROSA, L. H.; CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 4551-4555, 2013.

WANG, Y.; GUO, L.D.; HYDE, K.D. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (*Pinaceae*) in northeast China based on rDNA sequences. *Fungal Diversity*, v. 20, p. 235-260, 2005.

WEDGE, D. E.; KUHAJEK, J.M. A microbioassay for fungicide discovery. *SAAS Bulletin of Biochemistry and Biotechnology*, v. 11, p. 1-7. 1998.

WEDGE, D.E.; KLUN, J.A.; TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; OZEK, T.; BASER, K.H.C.; LIU, Z.; ZHANG, S.; CANTRELL, C.L.; ZHANG, J. Bioactivity-Guided Fractionation and GC/MS Fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* Root Components for Antifungal and Mosquito Deterrent Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 57, p. 464-470, 2009.

WHITE Jr., J. F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R. F.; BISCHOFF, J. F.; LEWIS, E. A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development of symbiotic interaction with plants. *Symbiosis*, v. 33, p. 201-213, 2002.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *San Diego: Academic Press*, 1990, p. 315-322.

WHITTAKER, R.H. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, v. 21, p. 213-251, 1972.

WIJERATNE, E.M.K.; PARANAGAMA, P.A.; MARRON, M.T.; GUNATILAKA, M.K.; ARNOLD, A.E.; GUNATILAKA, A.A.L. Sesquiterpene quinines and related metabolites from *Phyllosticta spinarum*, a fungal strain endophytic in *Platyclusus orientalis* of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 218–222, 2008.

WILSON, D.; CARROLL, G. C. Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia*, v. 86, p. 635–647, 1994.

YANG, S.; GAO, J.; LAATSCH, H.; TIAN, J.; PESCIPELLI, G. Absolute configuration of Fusarone, a new azaphilone from the endophytic fungus *Fusarium* sp. isolated from *Melia azedarach*, and of related azaphilones. *Chirality*, v. 24, p. 621–627, 2012.

YANG, X. ZHANG, L.; GUO, B, GUO S. Preliminary study of vincristine endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. *Zhongcaoyao*, v. 35, p. 79-81, 2004.

YOON, J. A.; HAHM, S. W.; SON, Y. S. Nutrients contents in different parts of prickly pear (*Opuntia humifusa*) and possible anti-breast cancer effect. *Korean Journal Food Nutrition*, v. 22, p. 485-491, 2009a.

YOON, J. A.; HAHM, S. W.; SON, Y. S. Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human

breast cancer cells. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 1679-1684, 2009b.

YOUNG, L. K.; SEOK, L. K.; HWAN, L. C. Antioxidative and antimicrobial effects of taxifolin isolated from a Cactus Cheonnyeoncho (*Opuntia humifusa*). *The FASEB Journal*, v. 21, p. 844-852, 2007.

YUAN, Z.L.; ZHANG, C.L.; LIN, F.C.; KUBICEK, C.P. Identity, diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, p.1642–1652, 2010.

ZAPPI, D. C. A família Cactaceae nos Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço Minas Gerais, Brasil. 1992. Dissertação de mestrado. USP, São Paulo.

ZHAN, F.; LI, X.; WU, L.; YANG, T.; HAN, Y; LI, G. Cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. CIB-109. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 49, p. 696-698, 2013.

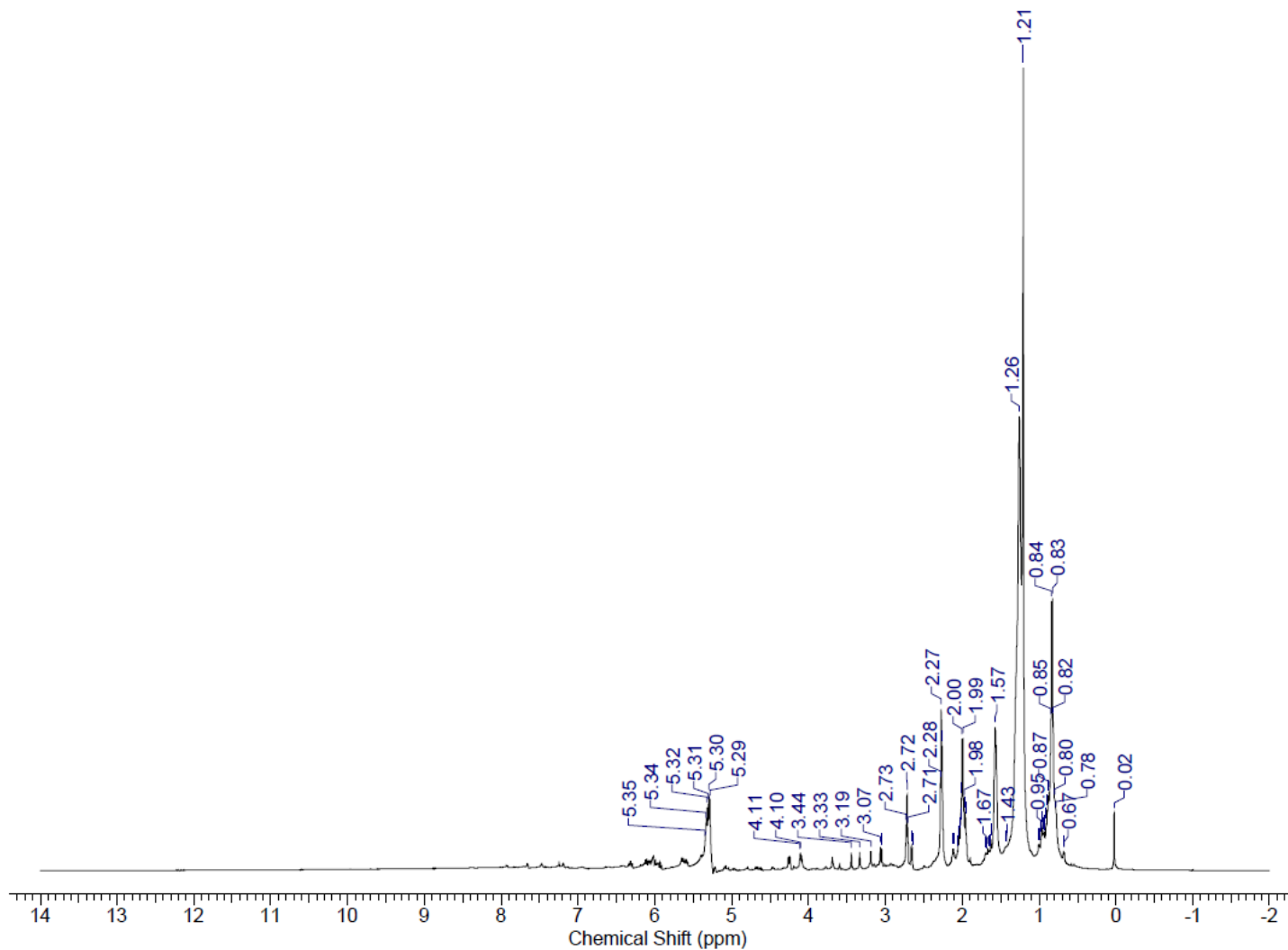
ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, v. 23, p. 753–771, 2006.

ZIMMERMANN, H. G.; GRANATA, G. Insect pests and diseases. In: NOBEL, P. S. (Org.) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, Berkeley. 2002, p. 235-254.

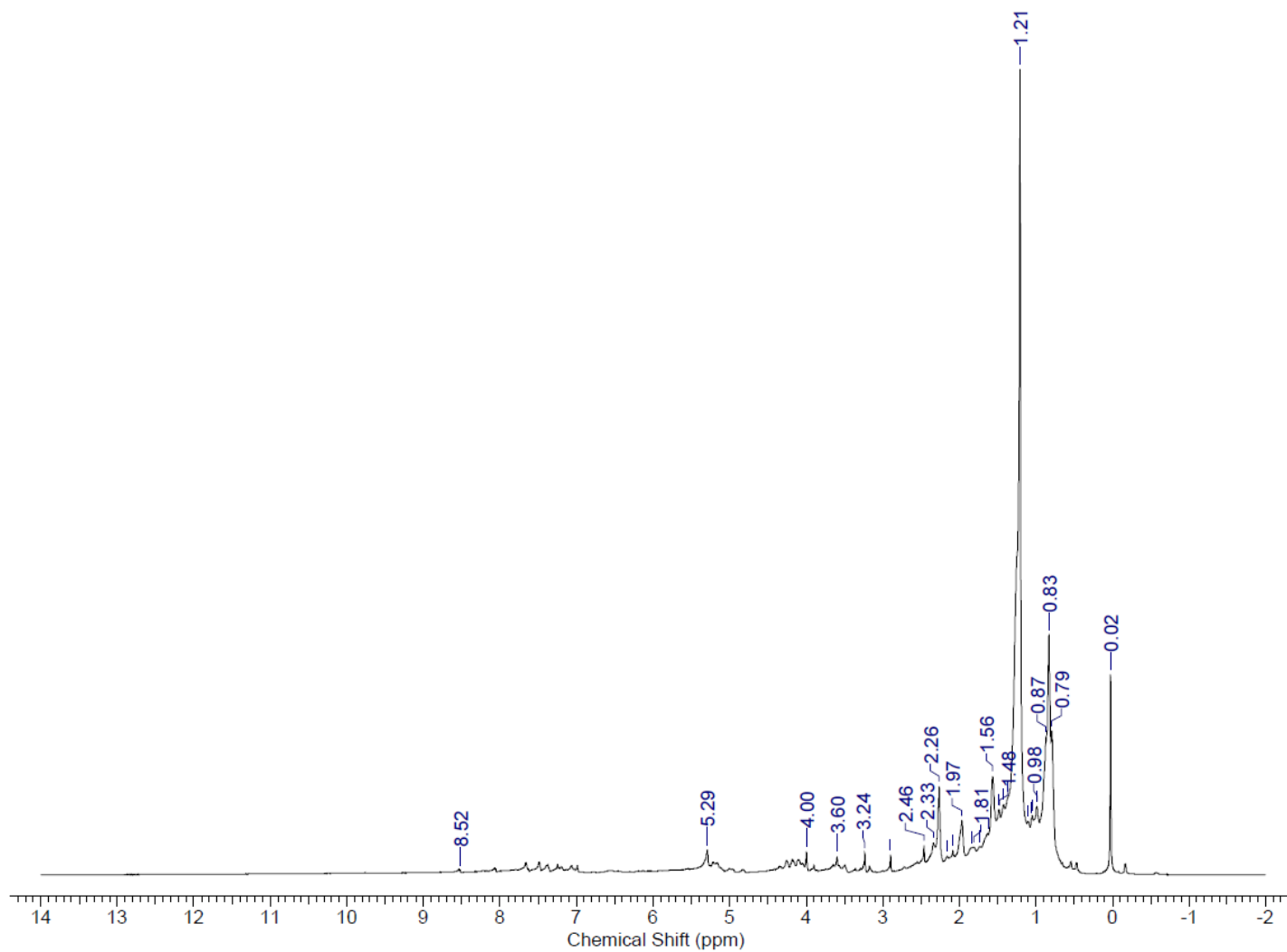
ZOU, D.M.; BREWER, M.; GARCIA, F.; FEUGANG, J.M.; WANG, J.; ZANG, R.; LIU, H.; ZOU, C.P. Cactus Pear - a Natural Product in Cancer Chemoprevention. *Journal of Nutrition*, v. 4, p.25-36, 2005.

9 APÊNDICES

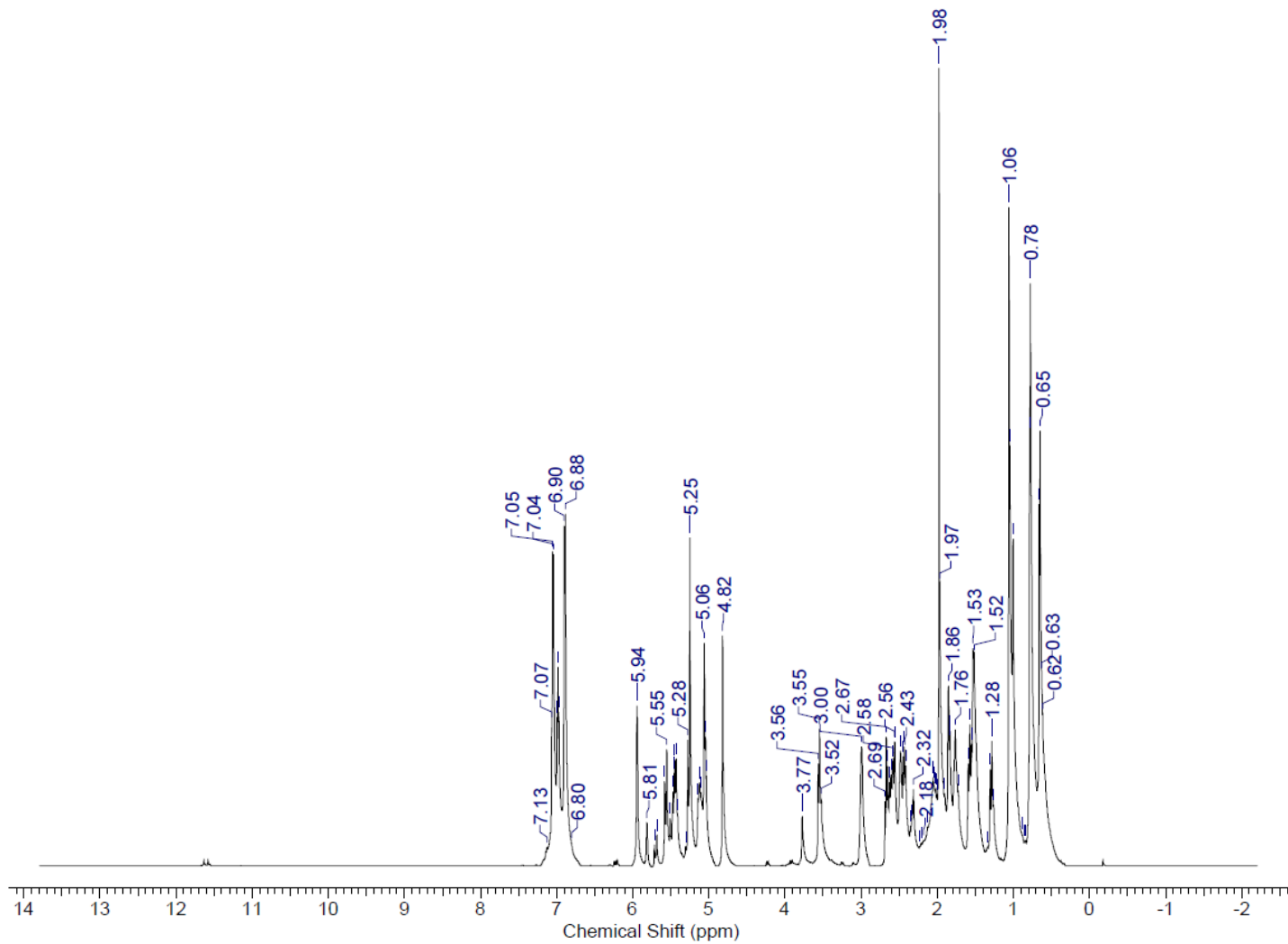
APÊNDICE A



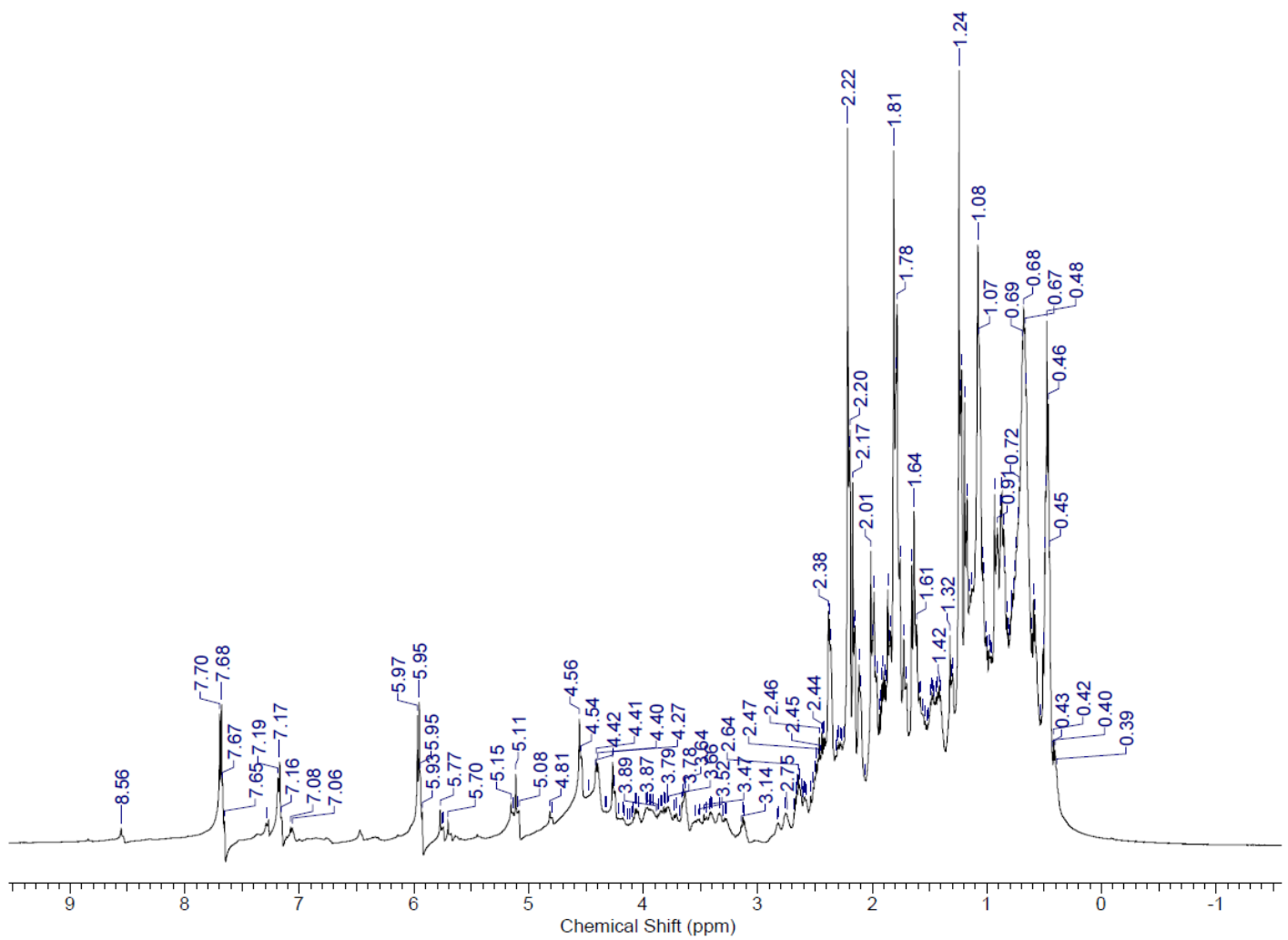
Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Fusarium solani* UFMGCB 5685.



Espectro de RMN de ¹H [600 MHz, CDCl₃] do extrato *Bartalinia* sp. UFMGCB 6347.

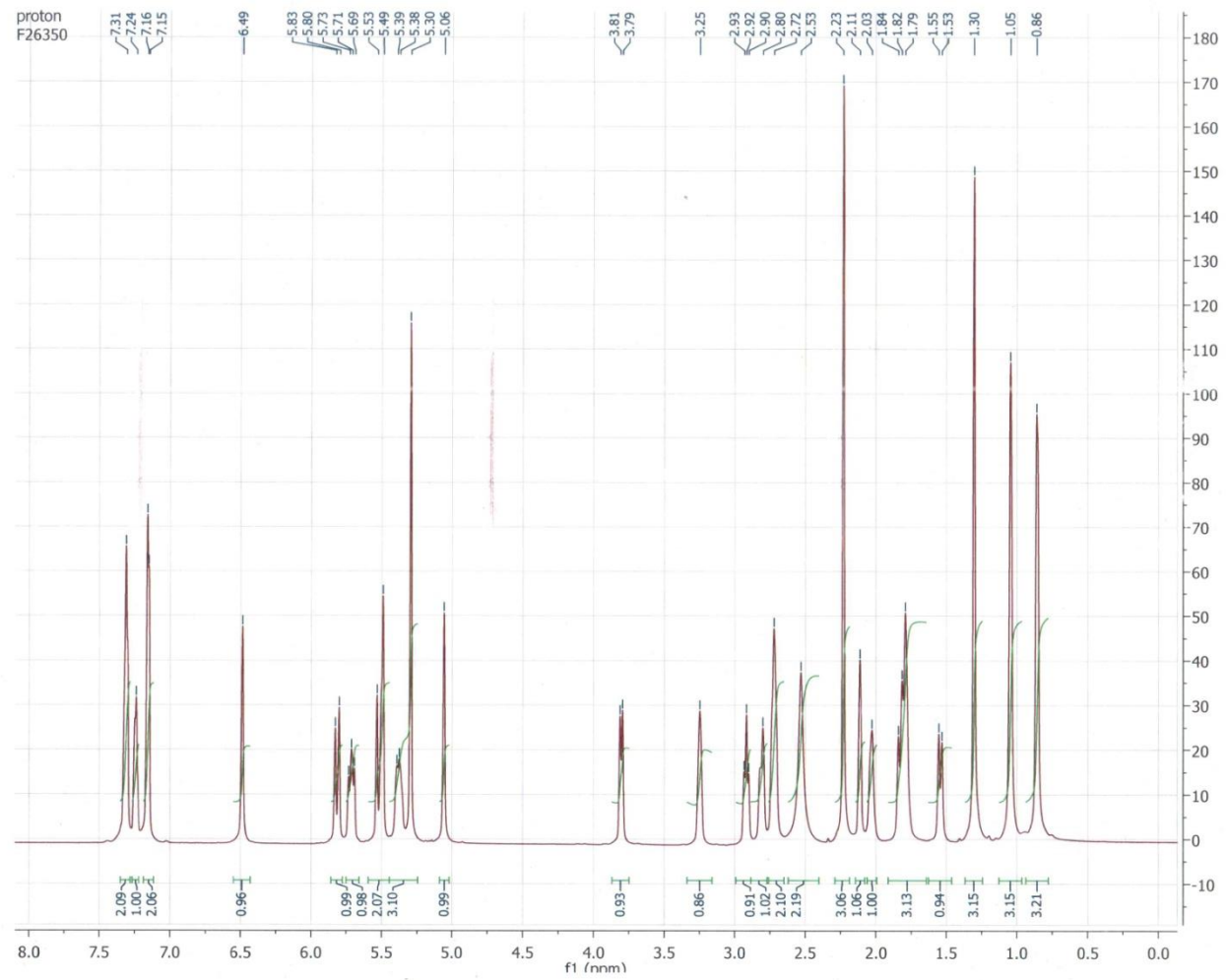


Espectro de RMN de ¹H [600 MHz, CDCl₃] do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350.

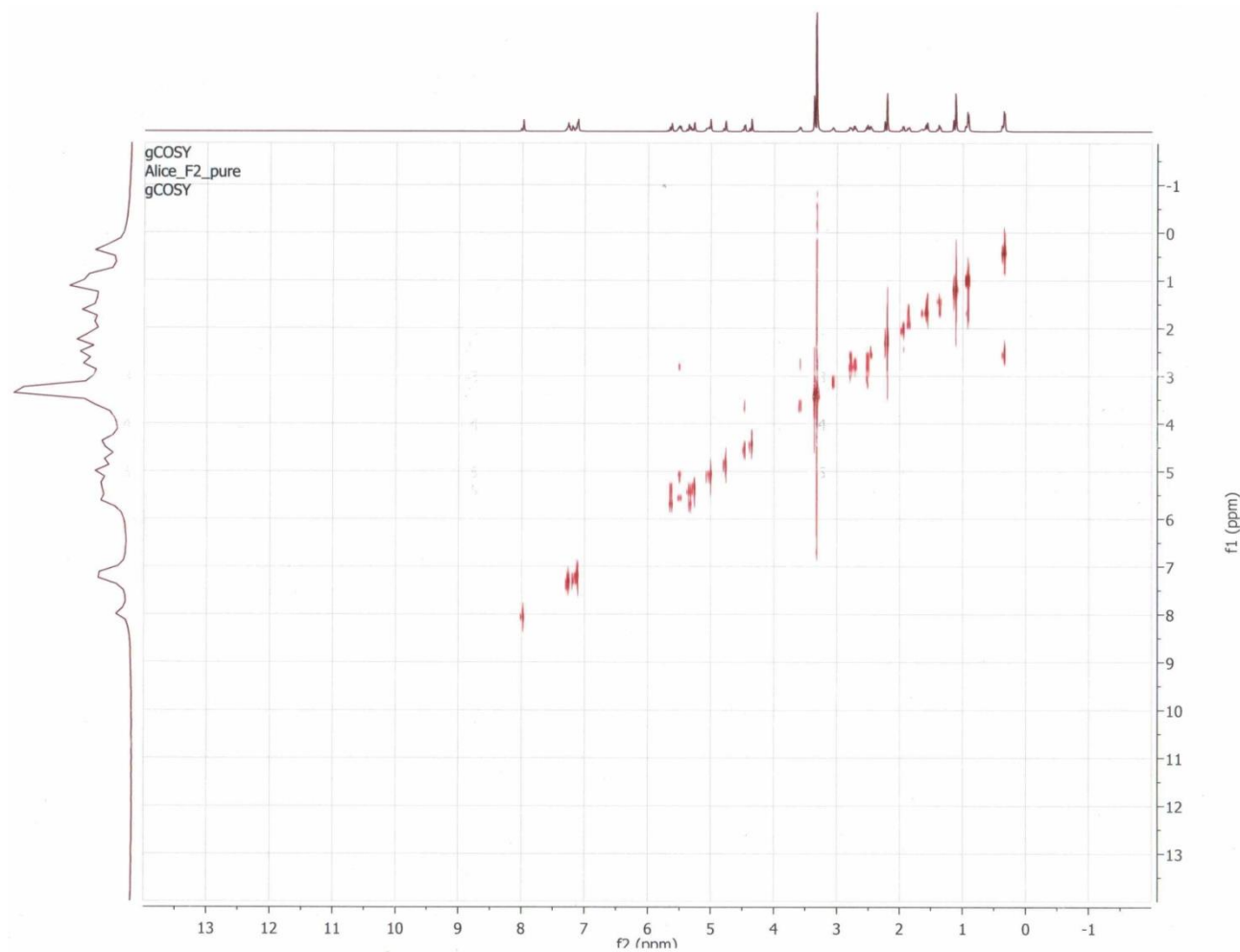


Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.

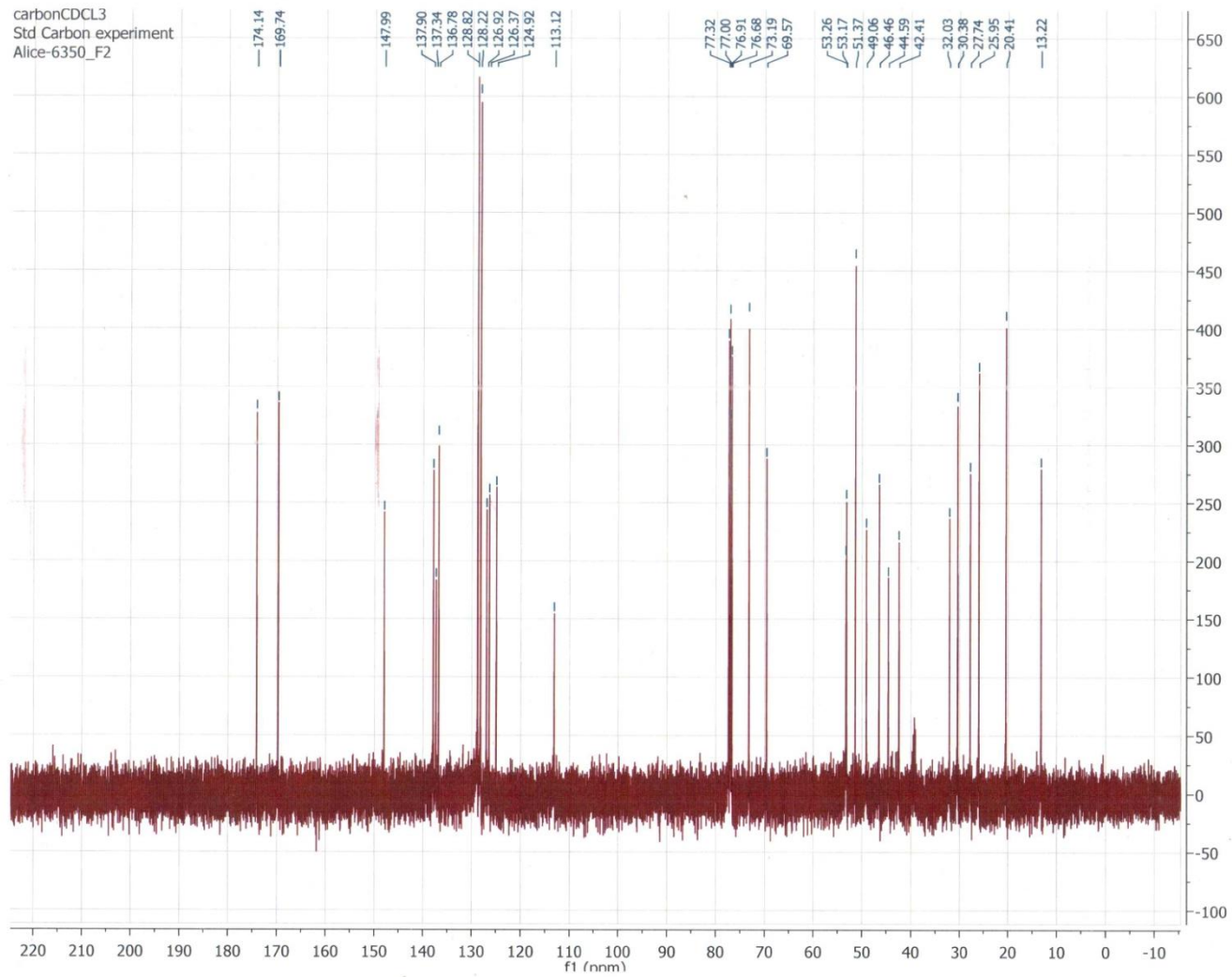
APÊNDICE B



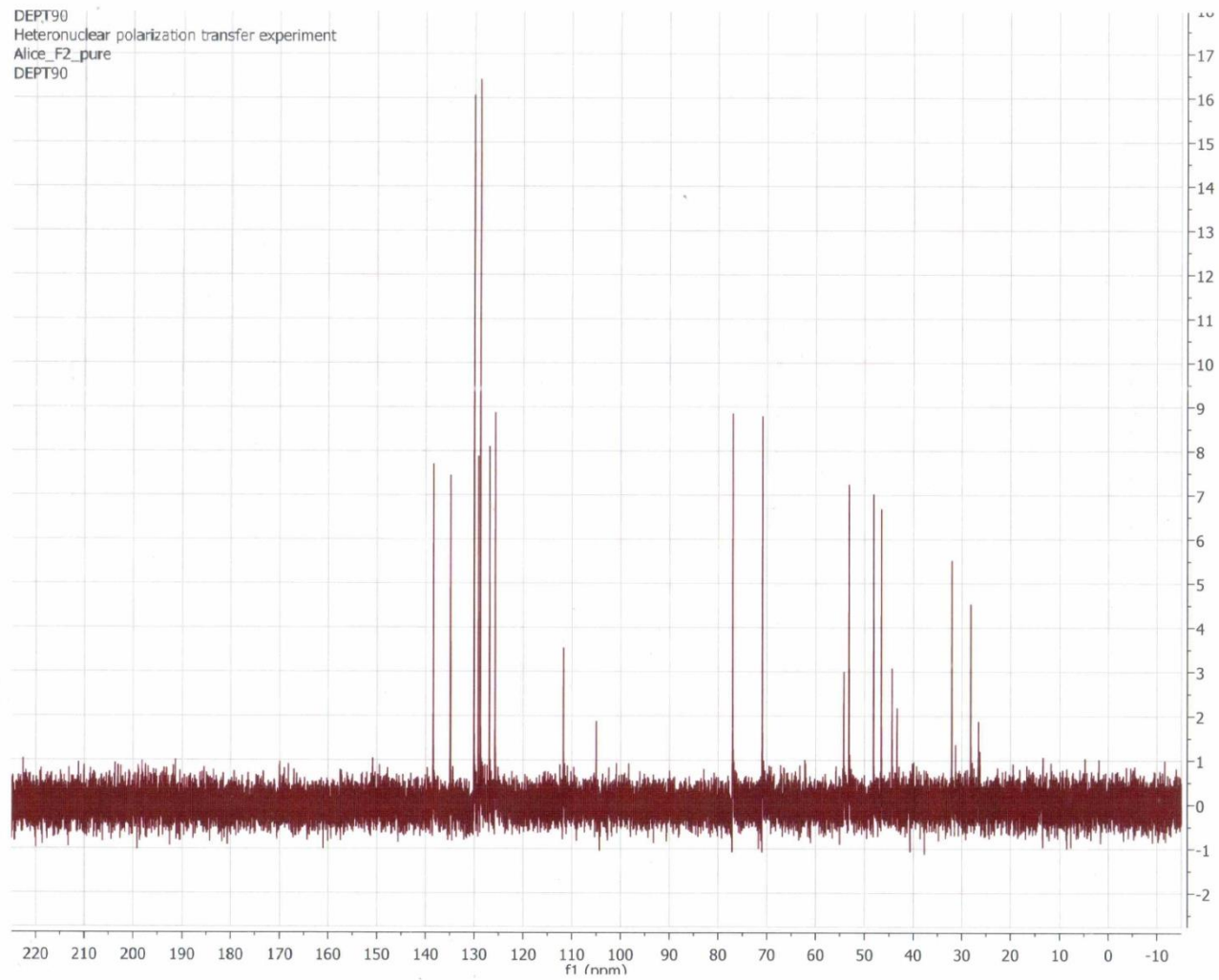
Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] da fração 2 do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350.



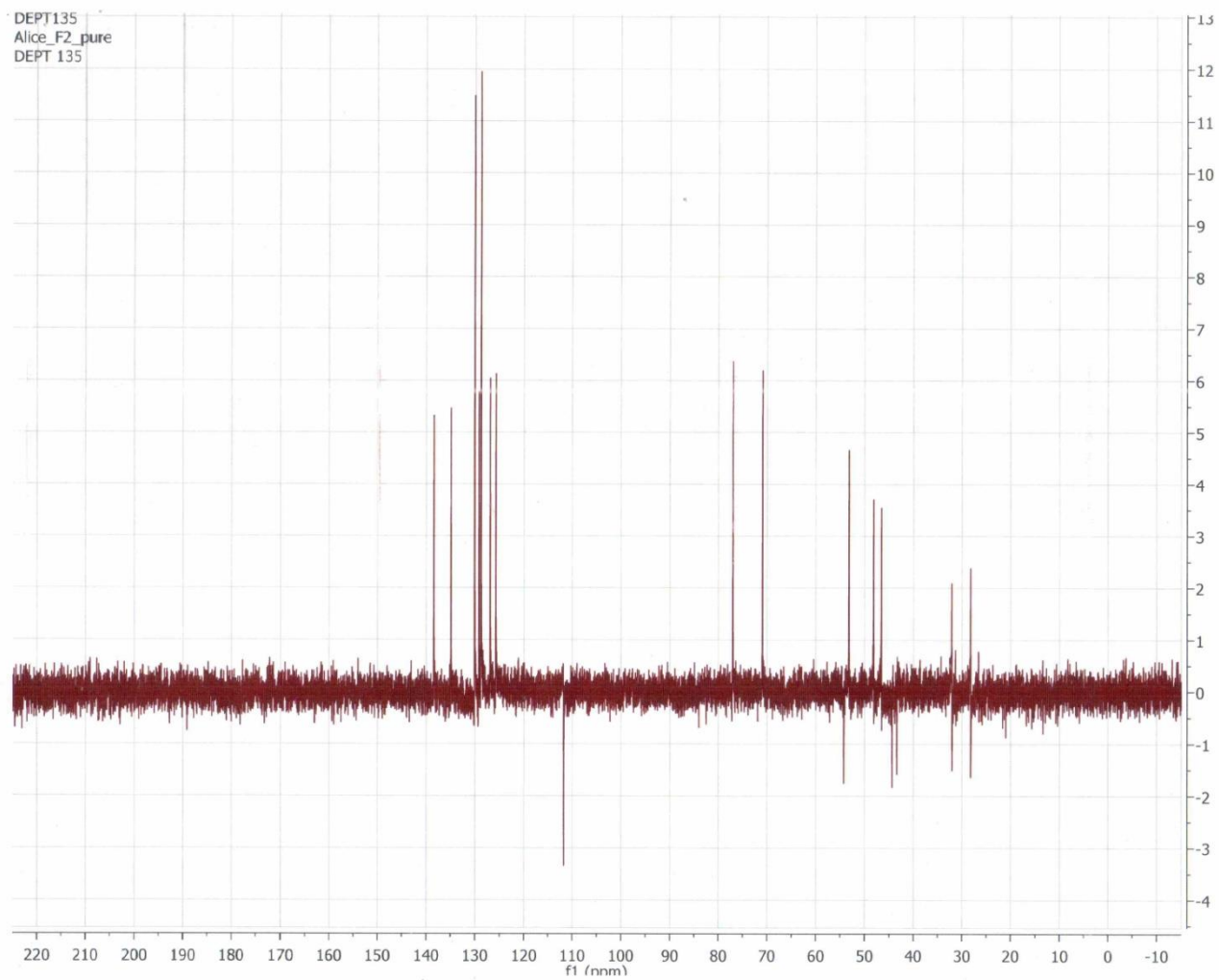
Espectro de COSY da fração 2 do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350, correlação entre ^1H [600 MHz, CDCl_3], utilizando como padrão para os dois campos ^1H -RMN, sendo os pontos em intersecção os núcleos dos sinais correspondentes.



Espectro de RMN de ^{13}C [600 MHz, CDCl_3] da fração 2 do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350.



Espectro de DEP 90° da fração 2 do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350.



Espectro de DEP 135° da fração 2 do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350.

Data: 6350 F2 NEG

Sample Name:

Description:

Ionization Mode: ESI-

History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area], Correct Base []], Correct Base [5.0%], Average (MS[1] 0.35..0.59)

Acquired: 3/5/2013 2:08:48 PM

Operator: AccuTOF

Mass Calibration data: tryp13

Created: 3/5/2013 2:21:08 PM

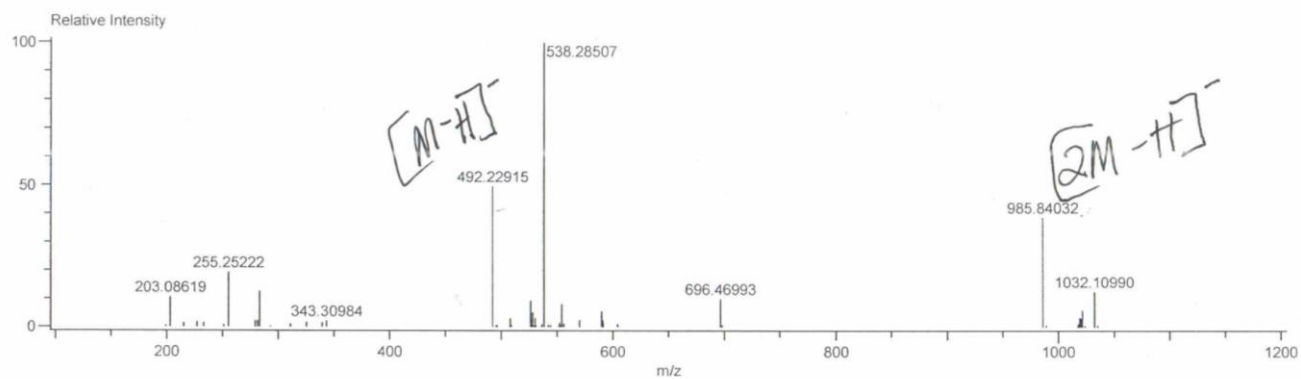
Created by: AccuTOF

Charge number: 1

Tolerance: 30.00 (mmu)

Unsaturation Number: -1.5 .. 20.0 (Fraction: Both)

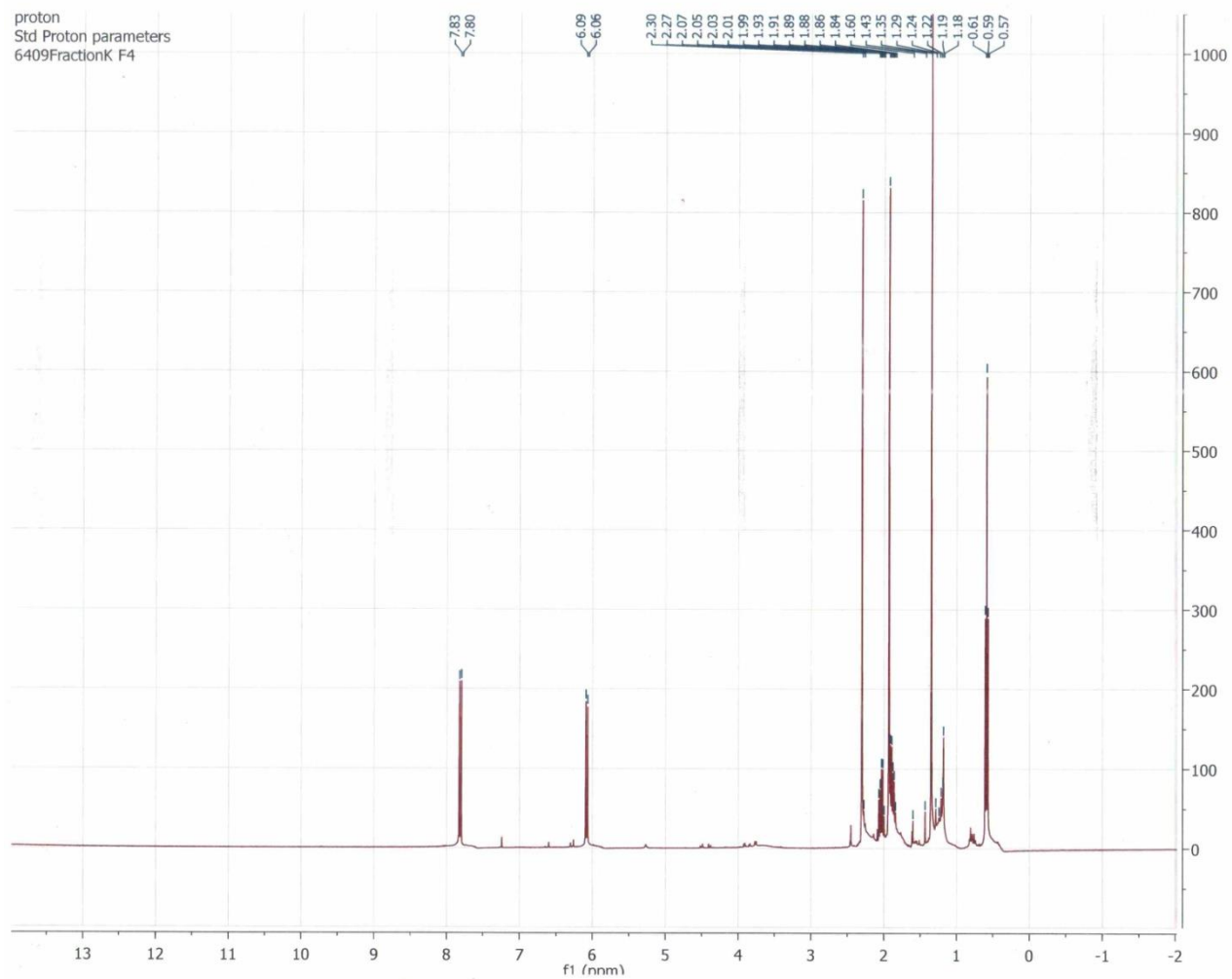
Element: ¹²C: 25 .. 70, ¹H: 25 .. 100, ¹⁴N: 0 .. 2, ²³Na: 0 .. 0, ¹⁶O: 0 .. 20



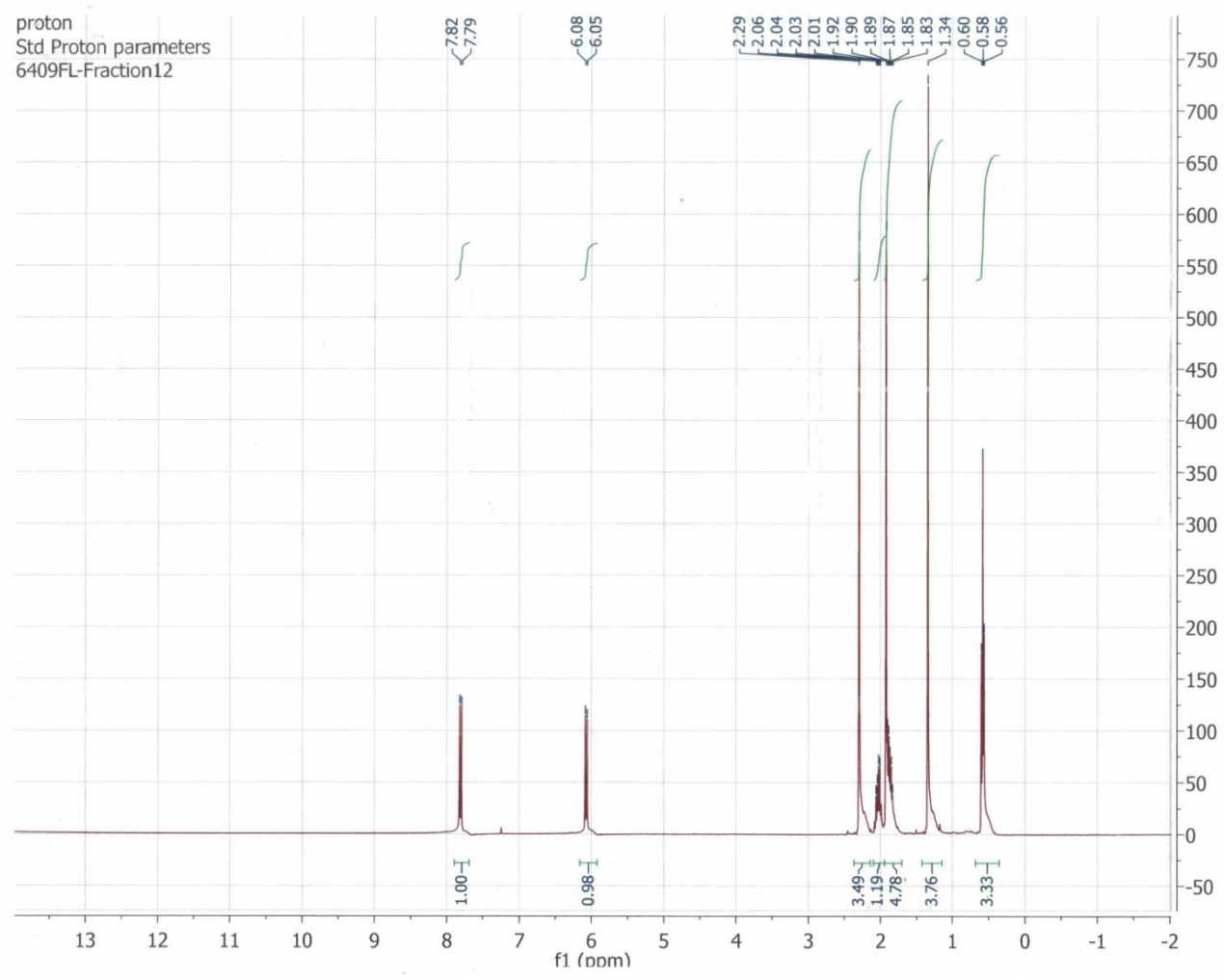
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
492.22915	21928.48	492.23006	-0.91	¹² C ₃₃ ¹ H ₃₂ ¹⁶ O ₄	18.0
		492.22604	3.11	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₆	14.0
		492.22336	5.79	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₉	9.5
		492.23593	-6.79	¹² C ₂₆ ¹ H ₃₆ ¹⁶ O ₉	9.0
		492.23861	-9.47	¹² C ₂₉ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₆	13.5
		492.21748	11.66	¹² C ₃₂ ¹ H ₃₀ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₄	18.5
		492.24129	-12.15	¹² C ₃₂ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₃	18.0
		492.21480	14.34	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₂ ¹⁶ O ₇	14.0
		492.24716	-18.02	¹⁶ O ₂₅ ¹ H ₅₆ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₈	9.0
		492.25119	-22.04	¹² C ₃₀ ¹ H ₃₆ ¹⁶ O ₈	13.0
		492.20491	24.24	¹² C ₃₁ ¹ H ₂₈ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₄	19.0
		492.25387	-24.72	¹² C ₃₃ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₃	17.5
		492.20223	26.92	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₀ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	14.5
		492.19955	29.60	¹² C ₂₅ ¹ H ₃₂ ¹⁶ O ₁₀	10.0
985.84032	17066.80				

Fração 2 do extrato *Diaporthe* sp. UFMGCB 6350. Análise de espectro de massa em LC/MS, com sinais do polo negativo.

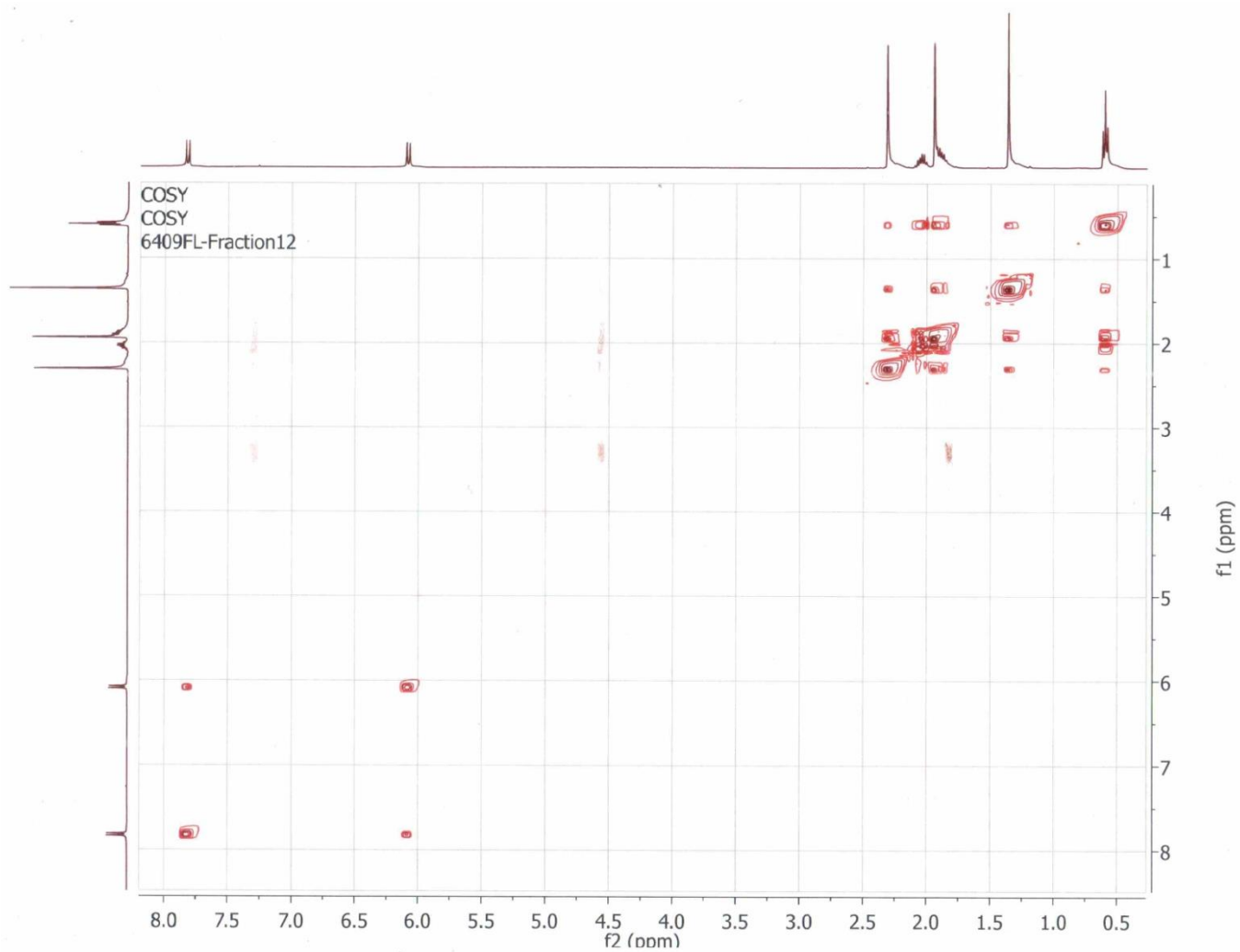
APÊNDICE C



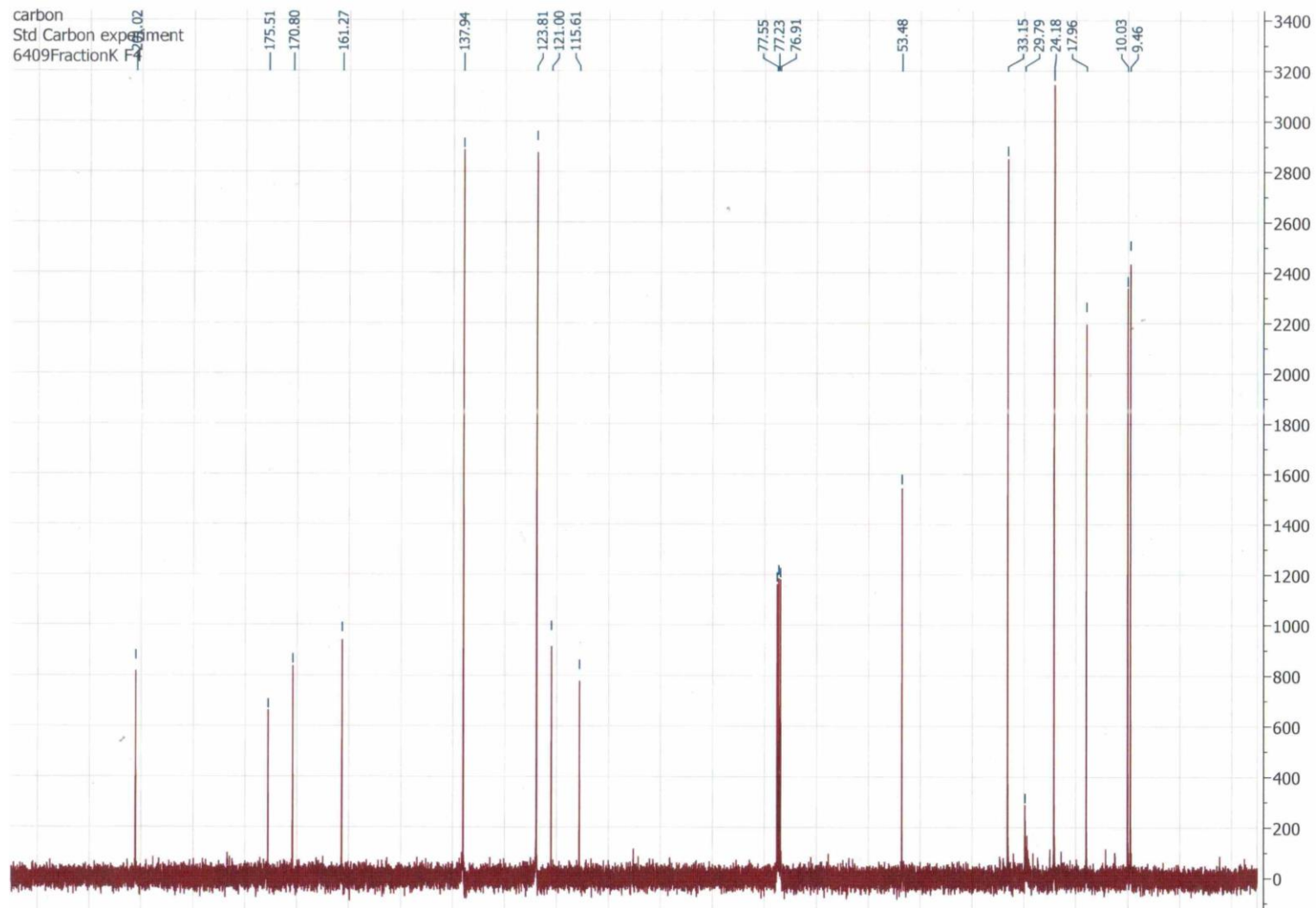
Espectro de RMN de ^1H [400 MHz, CDCl_3] da sub-fração 11.4 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.



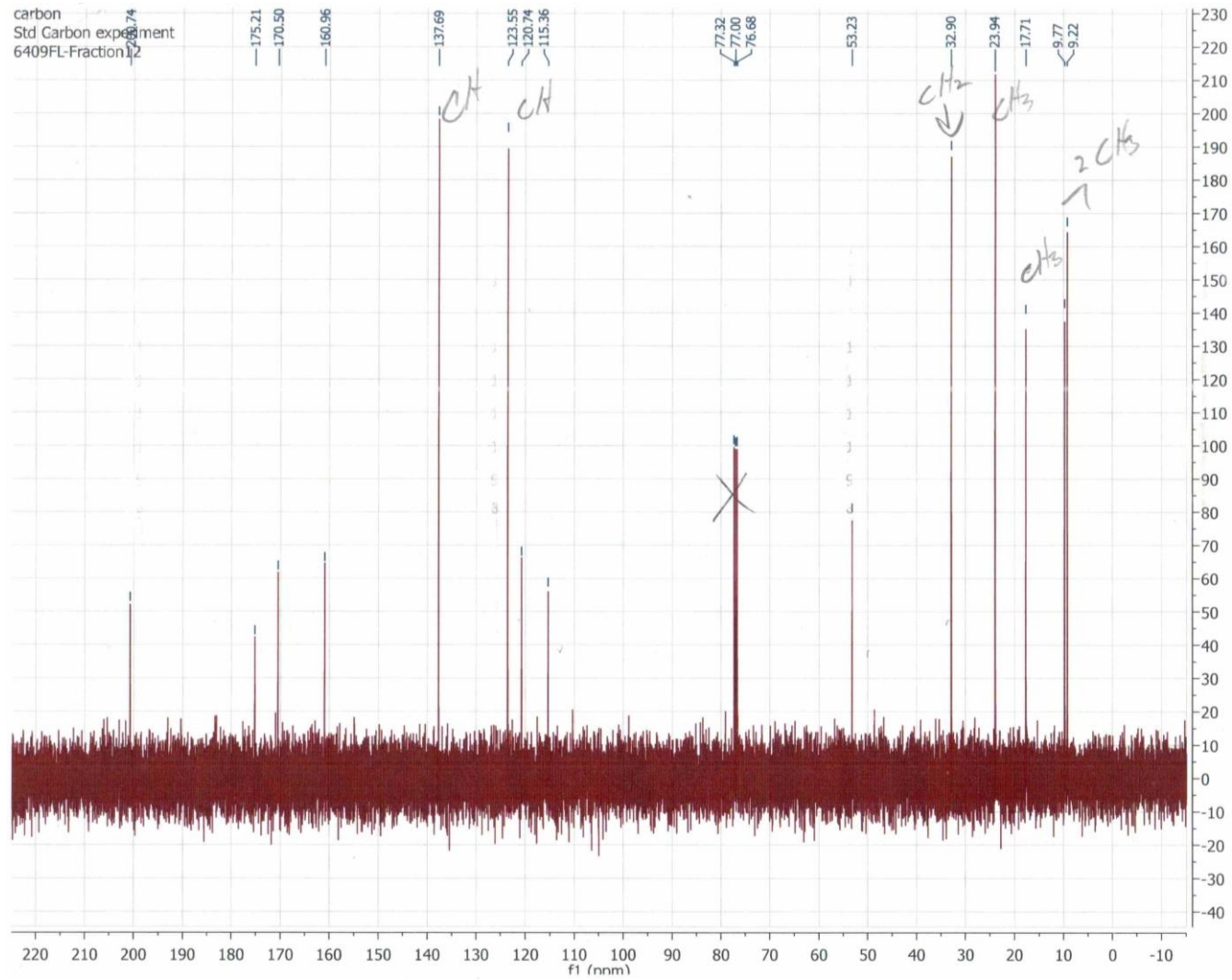
Espectro de RMN de ^1H [400 MHz, CDCl_3] da sub-fração 12.12 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.



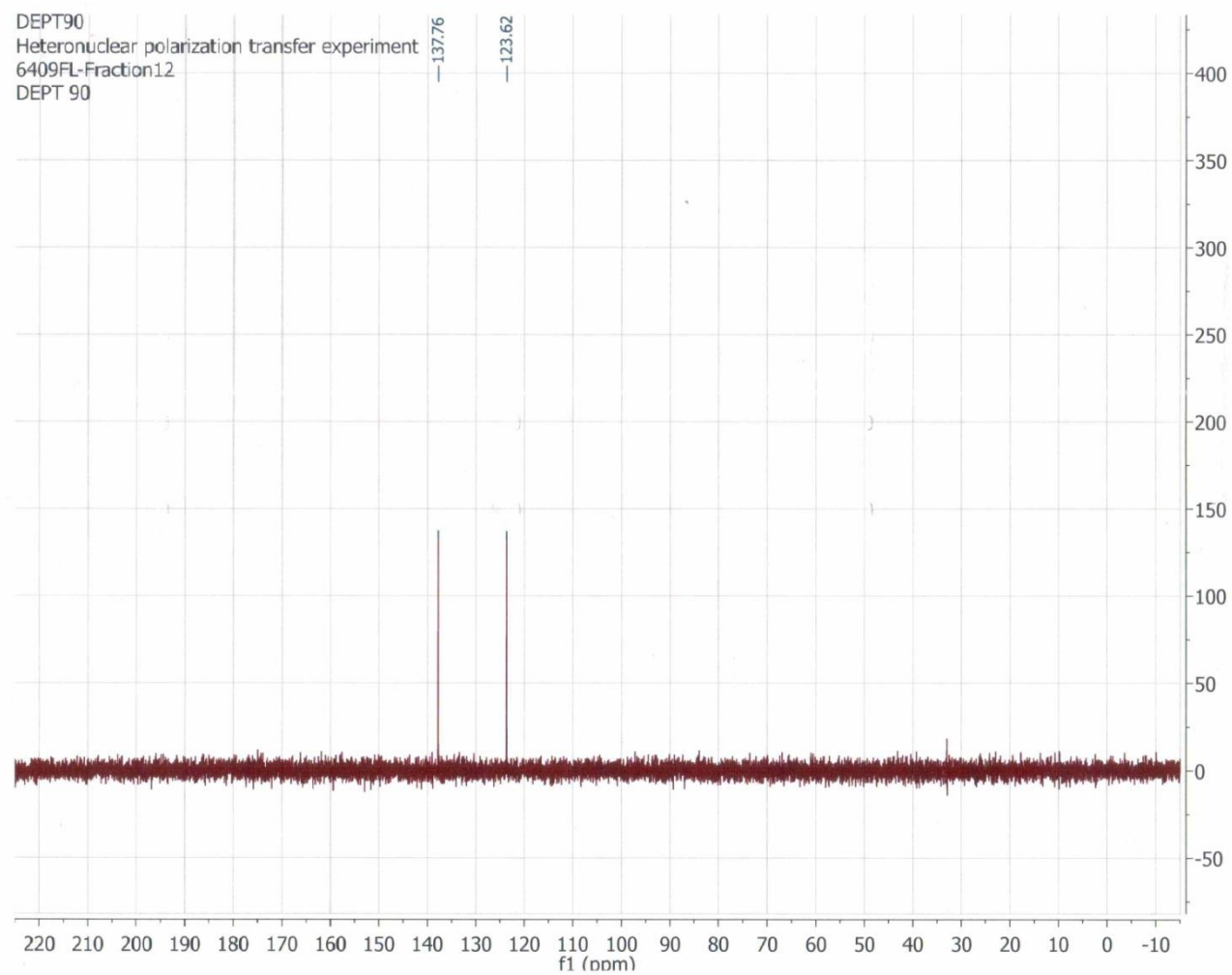
Espectro COSY da sub-fração 12.12 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.



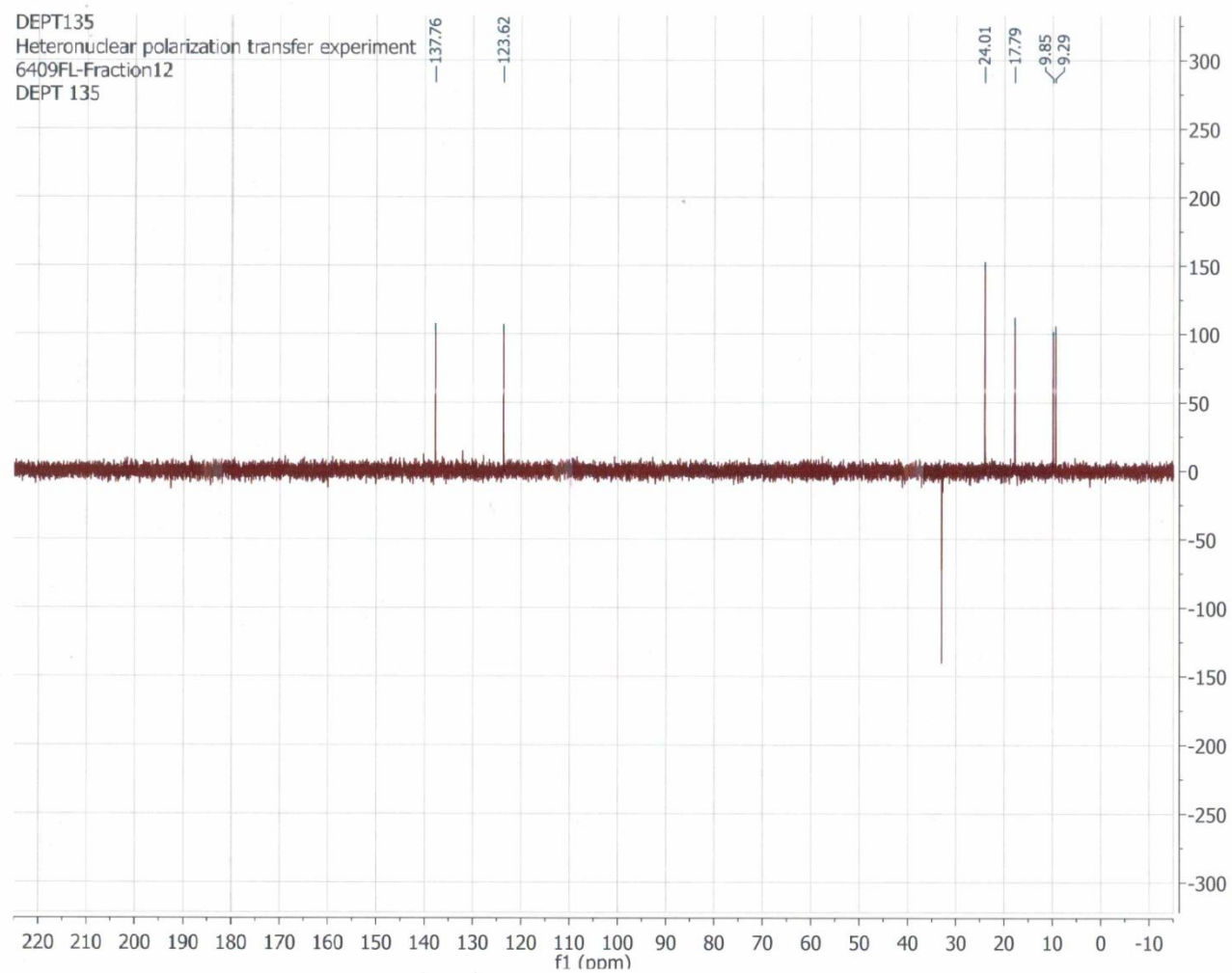
Espectro de RMN de ^{13}C [400 MHz, CDCl_3] da sub-fração 11.4 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.



Espectro de RMN de ^{13}C [400 MHz, CDCl_3] da sub-fração 12.12 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.

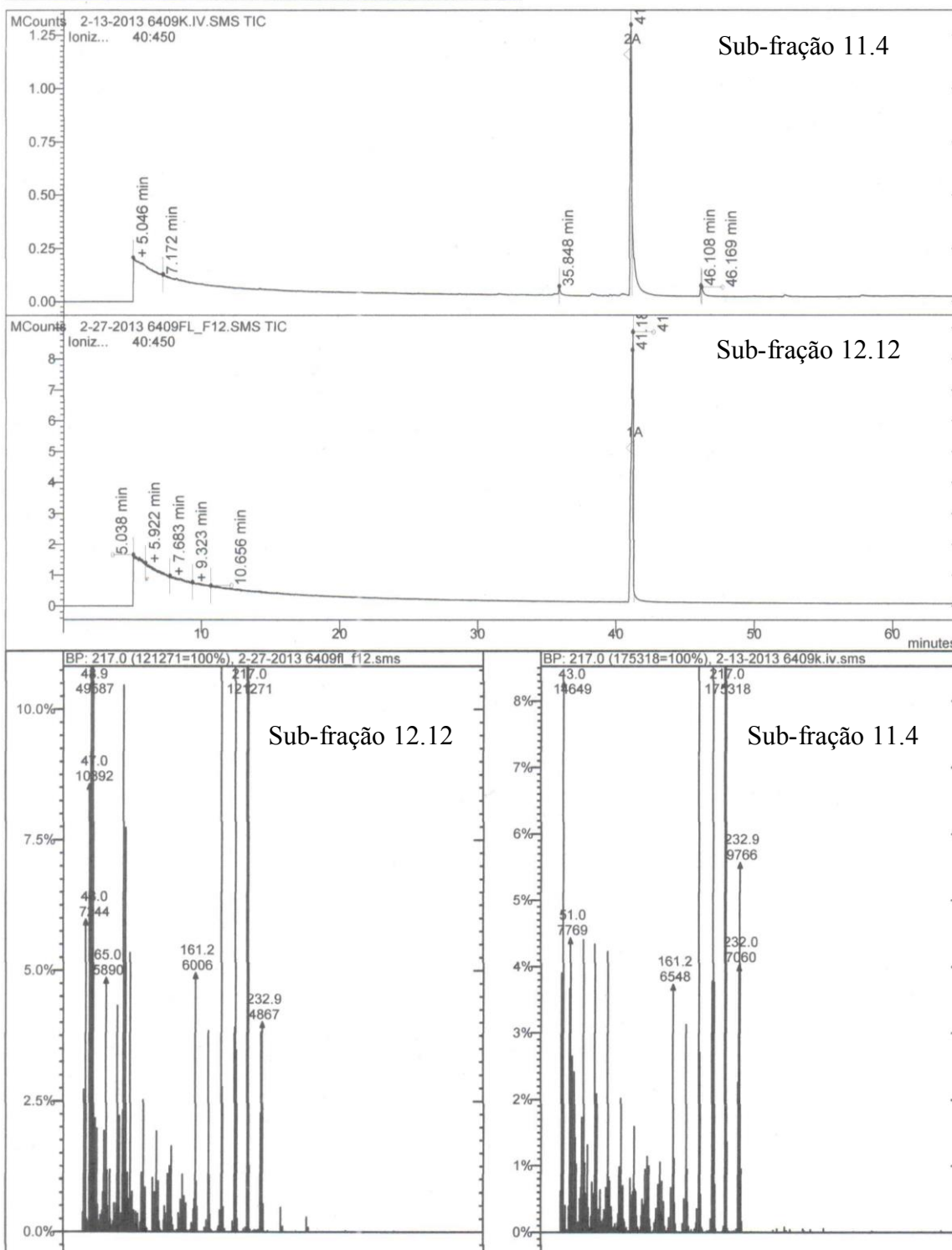


Espectro DEP 90° da sub-fração 12.12 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.



Espectro DEP 135° da sub-fração 12.12 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409.

MS Data Review All Plots - 3/4/2013 3:27 PM



Espectro de CG-MS da sub-fração 11.4 e da sub-fração 12.12.

Data: 6409 F12 POS

Sample Name:

Description:

Ionization Mode: ESI+

History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area], Correct Base [], Correct Base [5.0%], Average (MS [1] 0.39..0.55)]

Acquired: 3/5/2013 1:32:01 PM

Operator: AccuTOF

Mass Calibration data: trypPOS13

Created: 3/5/2013 1:39:45 PM

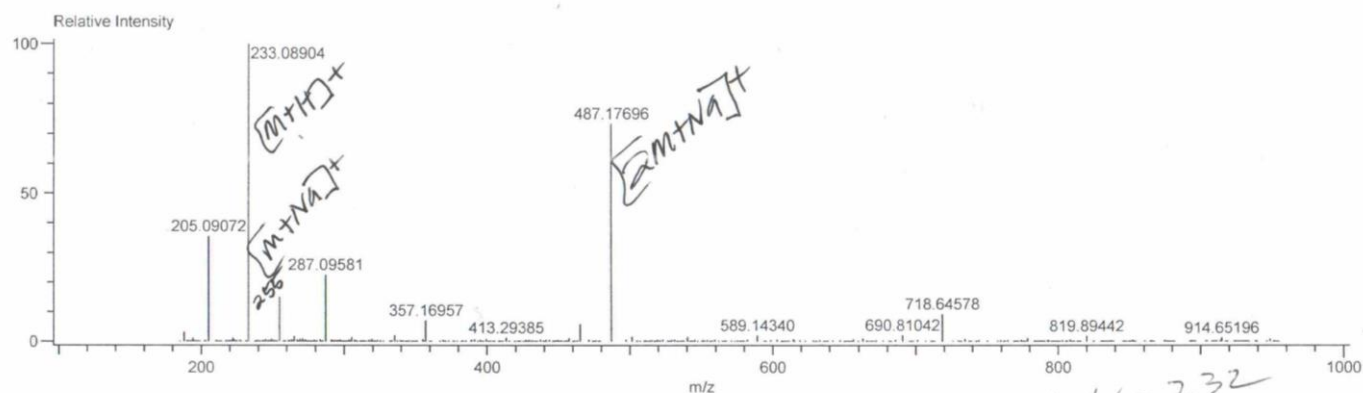
Created by: AccuTOF

Charge number: 1

Tolerance: 30.00 (mmu)

Unsaturation Number: -1.5 .. 20.0 (Fraction: Both)

Element: ¹²C: 10 .. 35, ¹H: 10 .. 50, ¹⁴N: 0 .. 0, ²³Na: 0 .. 1, ¹⁶O: 0 .. 20



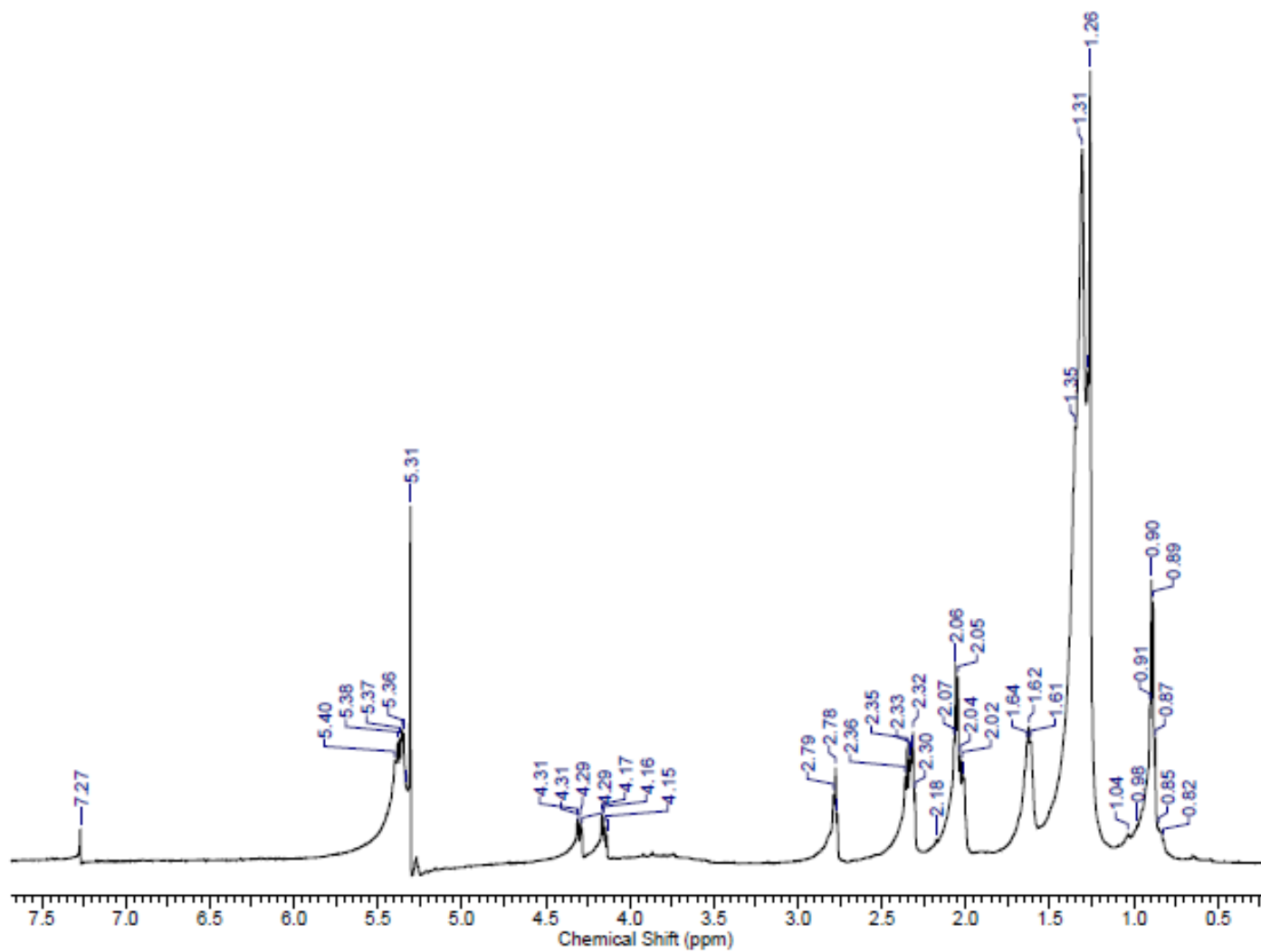
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
233.08904	2874747.61	233.09423	-5.19	¹² C ₁₅ ¹ H ₁₄ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₁	8.5
		233.09664	-7.60	¹² C ₁₇ ¹ H ₁₃ ¹⁶ O ₁	11.5
		233.08138	7.66	¹² C ₁₃ ¹ H ₁₃ ¹⁶ O ₄	7.5
		233.07898	10.06	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₄ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₄	4.5
		233.10251	-13.47	¹² C ₁₀ ¹ H ₁₇ ¹⁶ O ₆	2.5
		233.11536	-26.32	¹² C ₁₂ ¹ H ₁₆ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₃	3.5
		233.11777	-28.73	¹² C ₁₄ ¹ H ₁₇ ¹⁶ O ₃	6.5
255.07431	424671.72	255.07858	-4.27	¹² C ₁₇ ¹ H ₁₂ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₁	11.5
		255.08099	-6.68	¹² C ₁₉ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₁	14.5
		255.08573	-9.09	¹² C ₁₇ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₁	10.5

MW = 232
MF = C₁₄H₁₆O₃

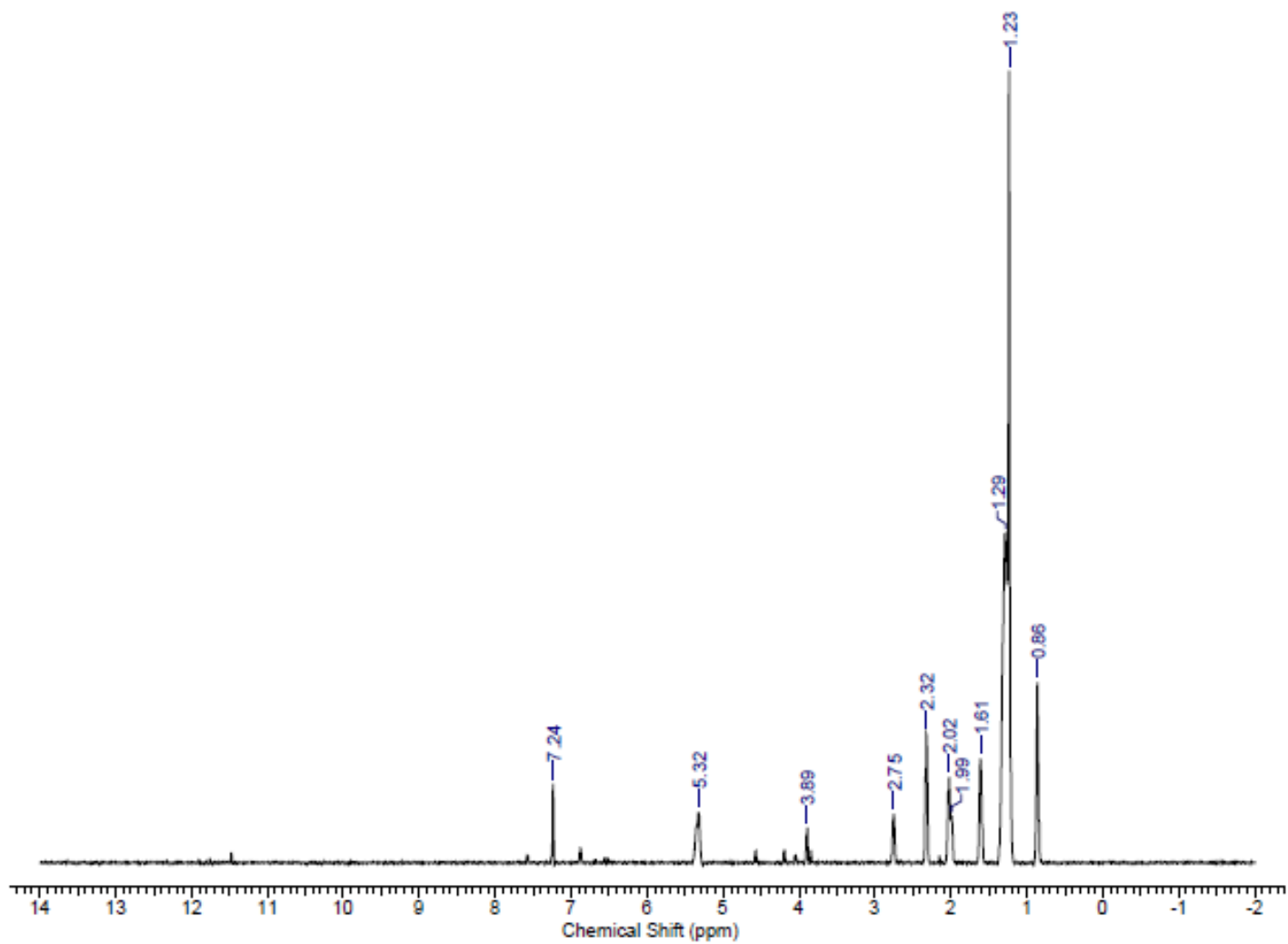
[M+H]⁺

Sub-fração 12.12 do extrato *Phoma* sp. UFMGCB 6409. Análise de espectro de massa em LC/MS, com sinais do polo positivo.

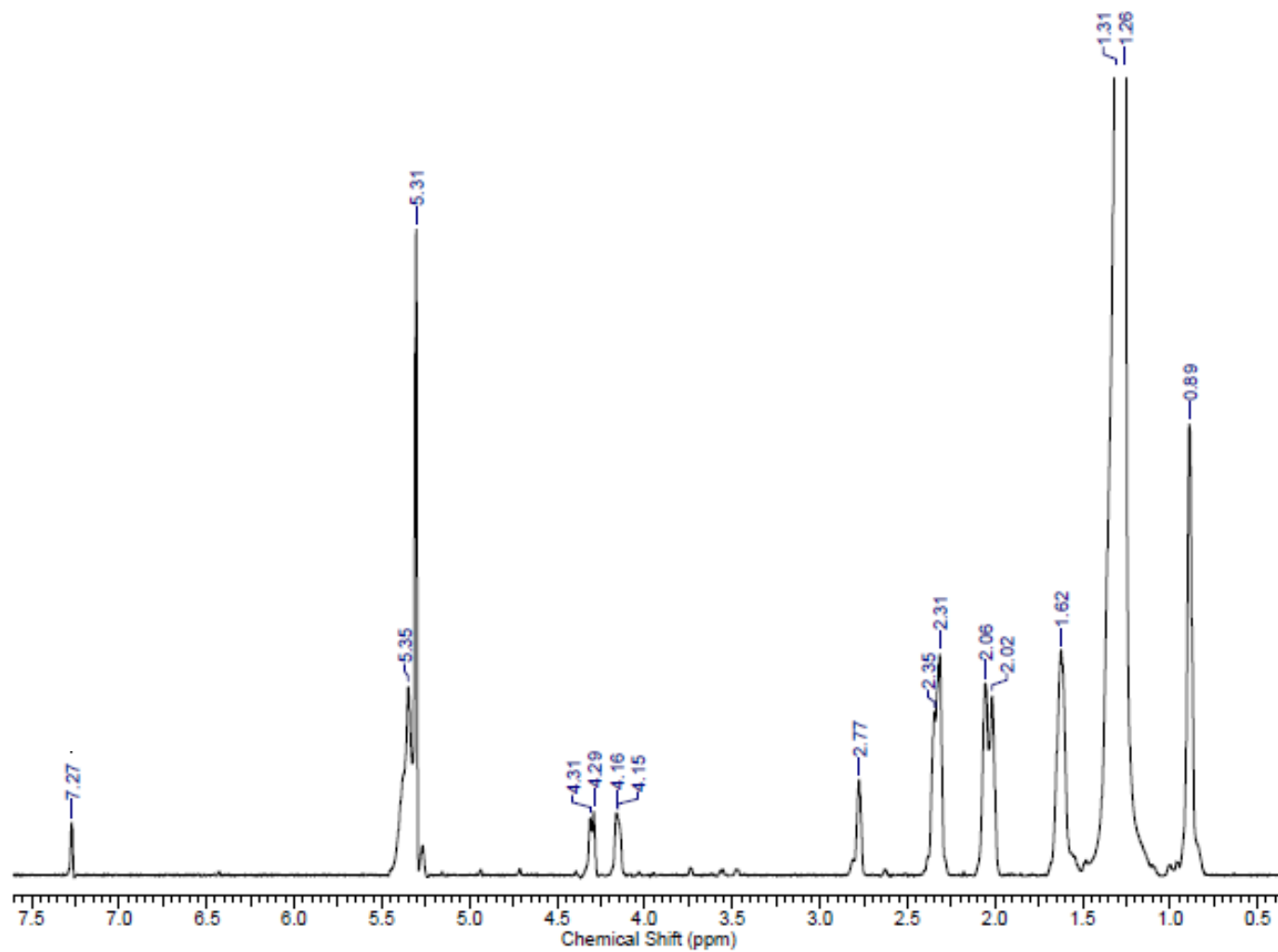
APÊNDICE D



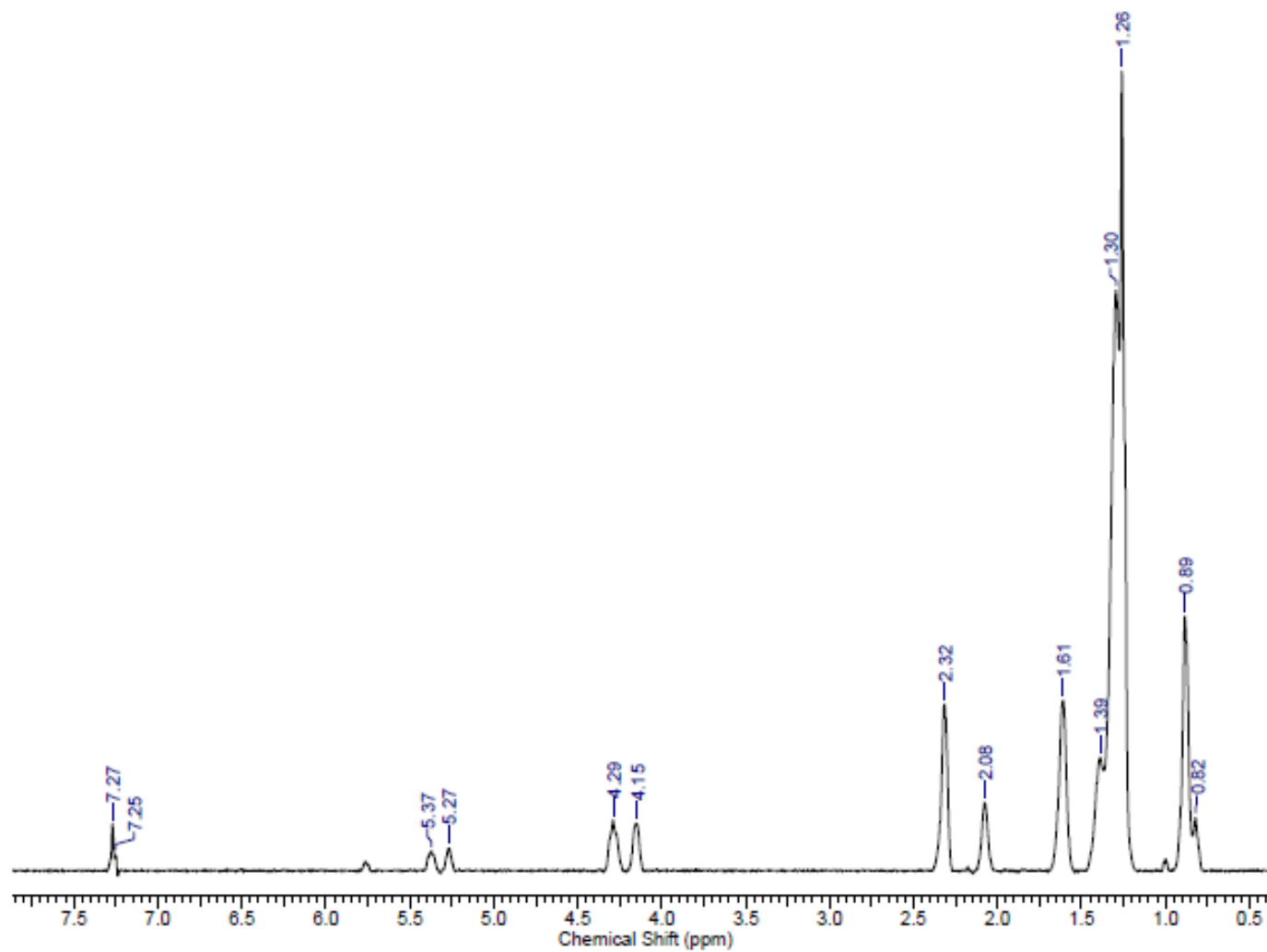
Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Alternaria* sp. 1 Ohu 8B2.



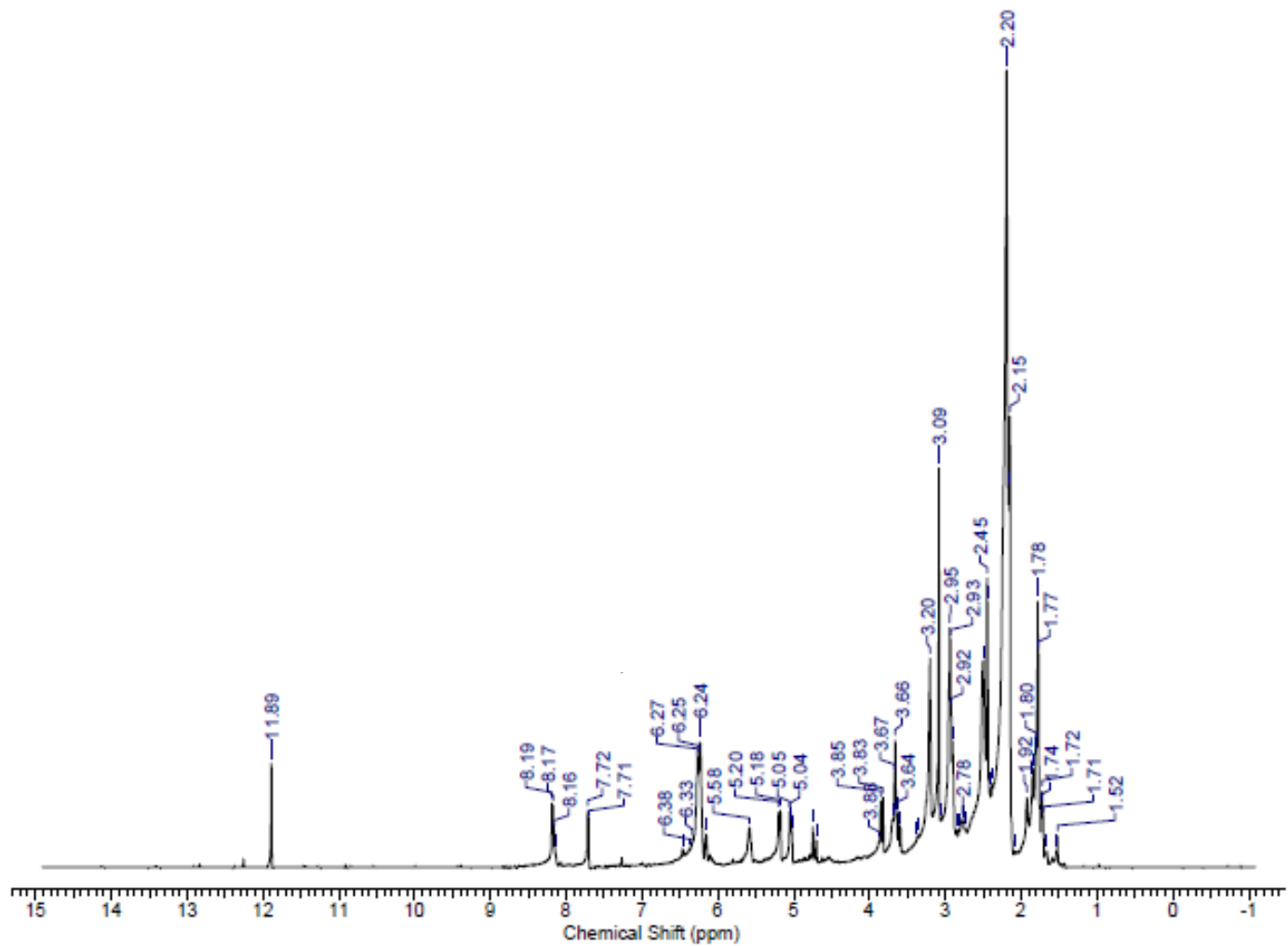
Espectro de RMN de ¹H [600 MHz, CDCl₃] do extrato *Alternaria cf. arborescens* Ohu 13A1.



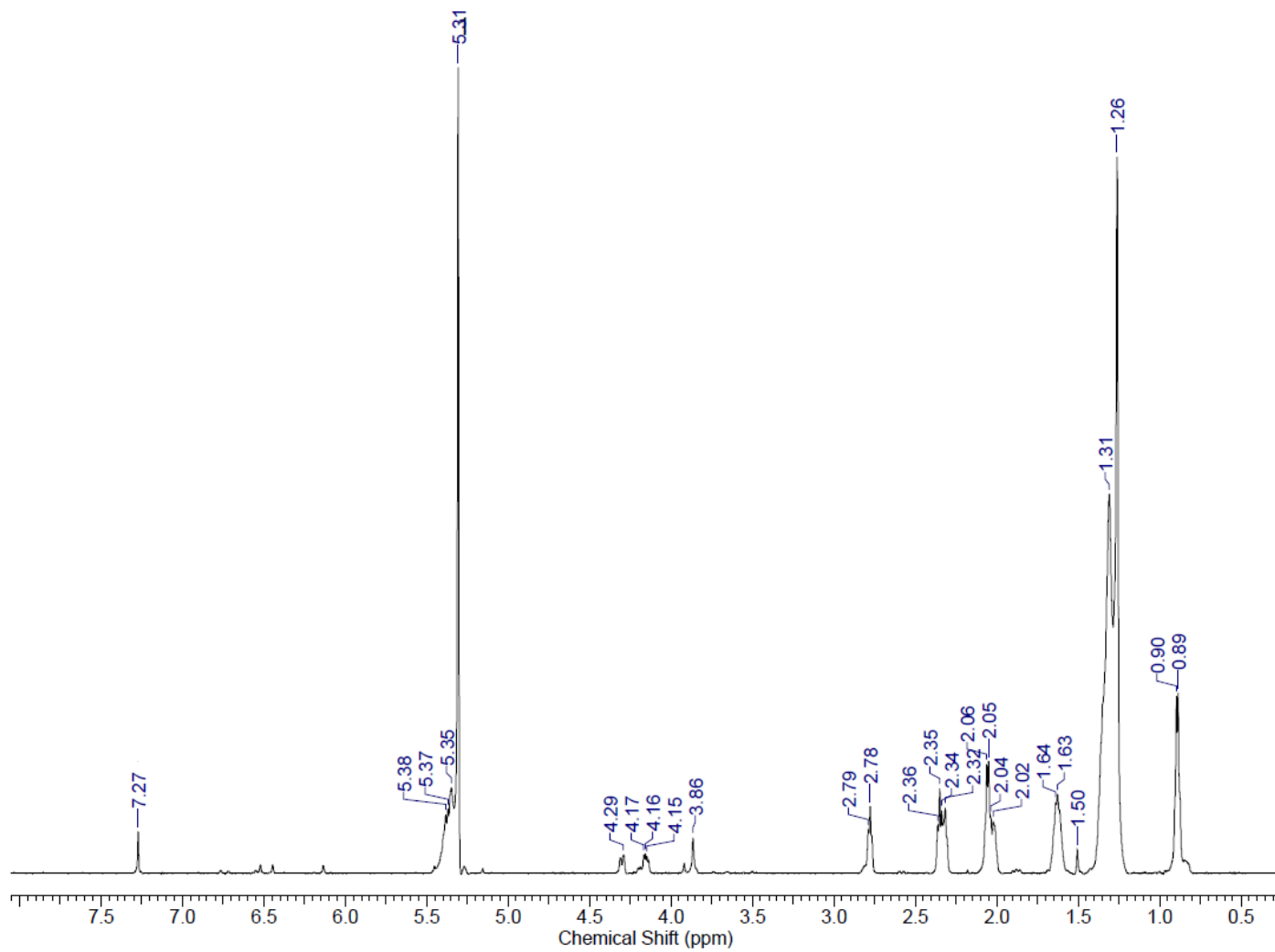
Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17A.



Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Paraconiothyrium* sp. Ohu 17C1.

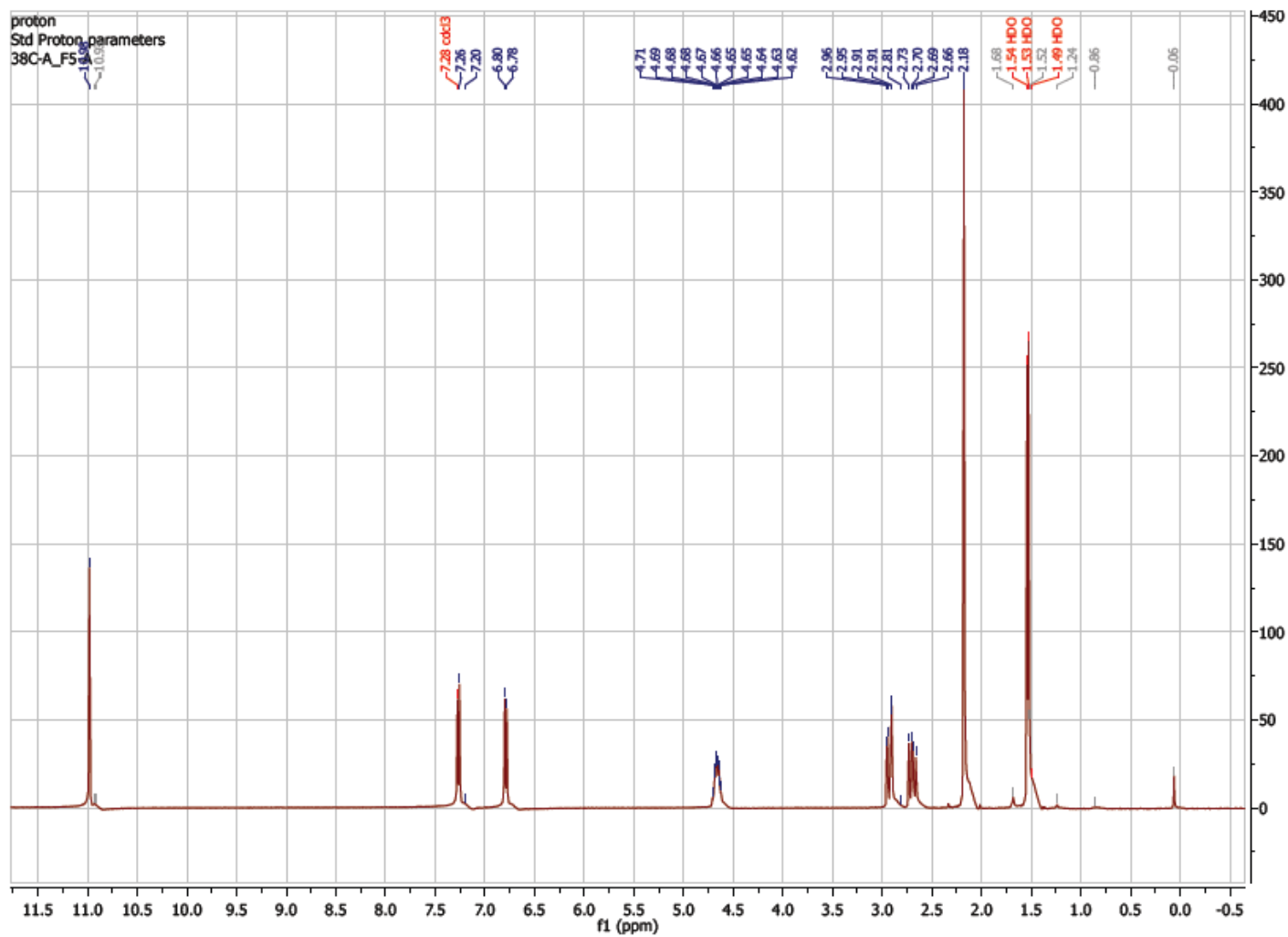


Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B.

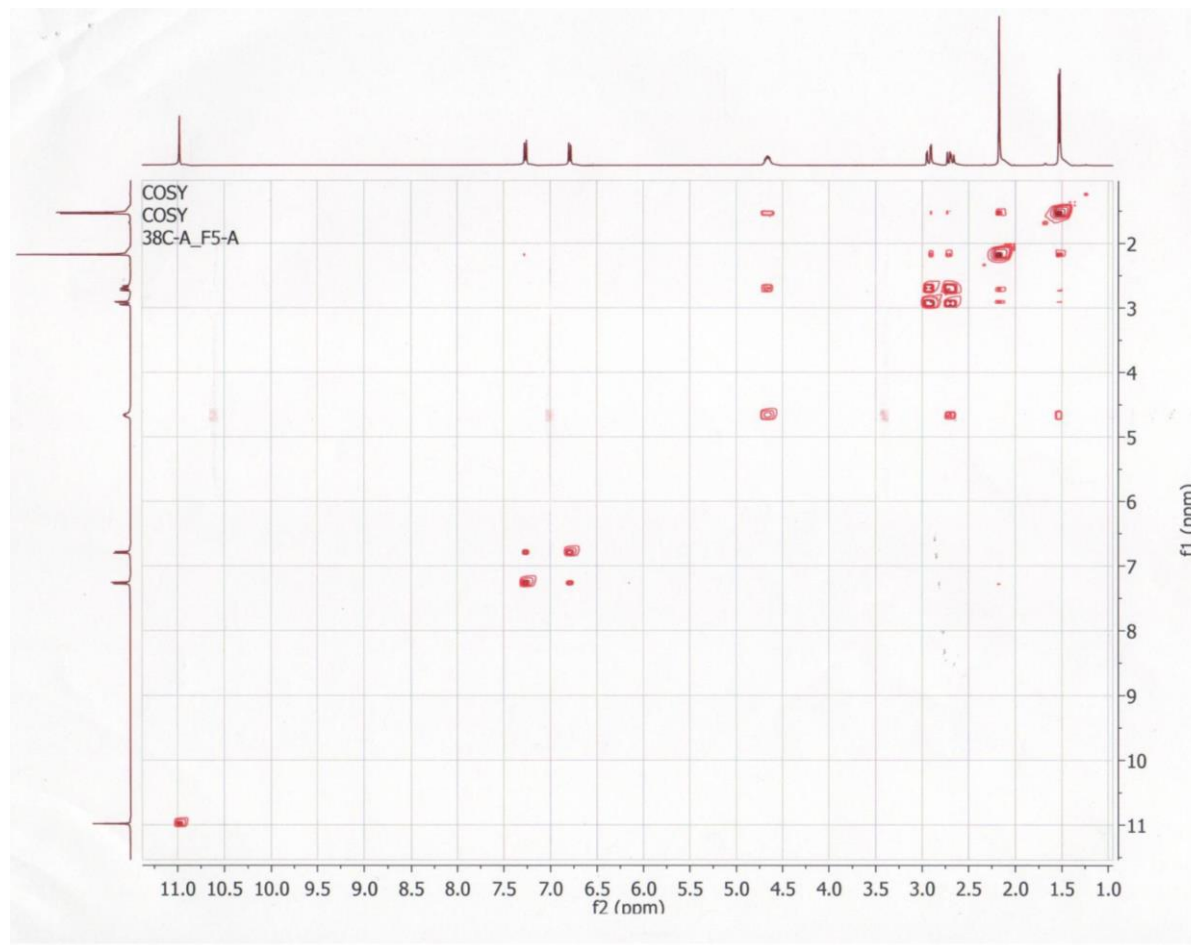


Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Alternaria cf. arborescens* Ohu 30A.

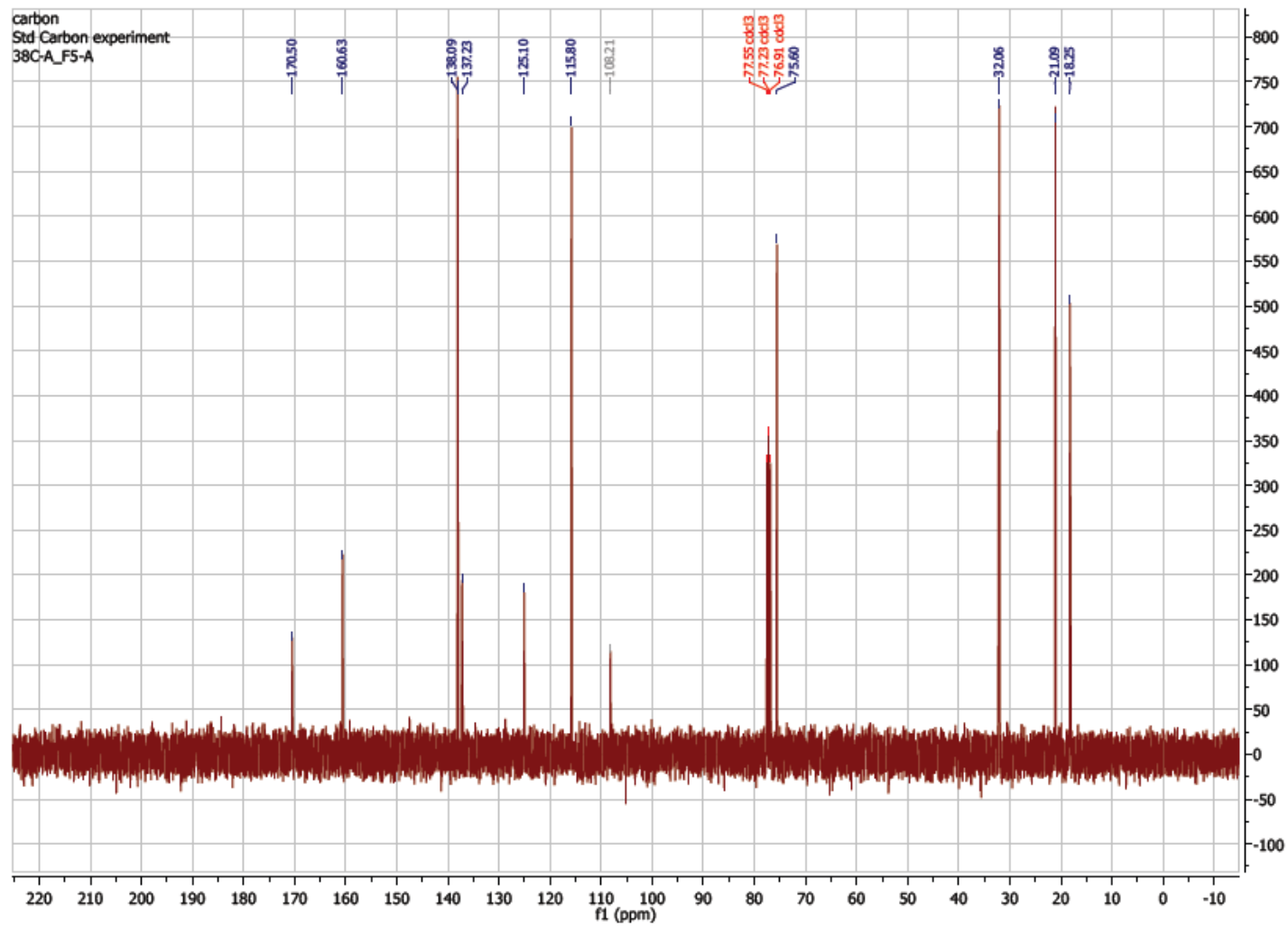
APÊNDICE E



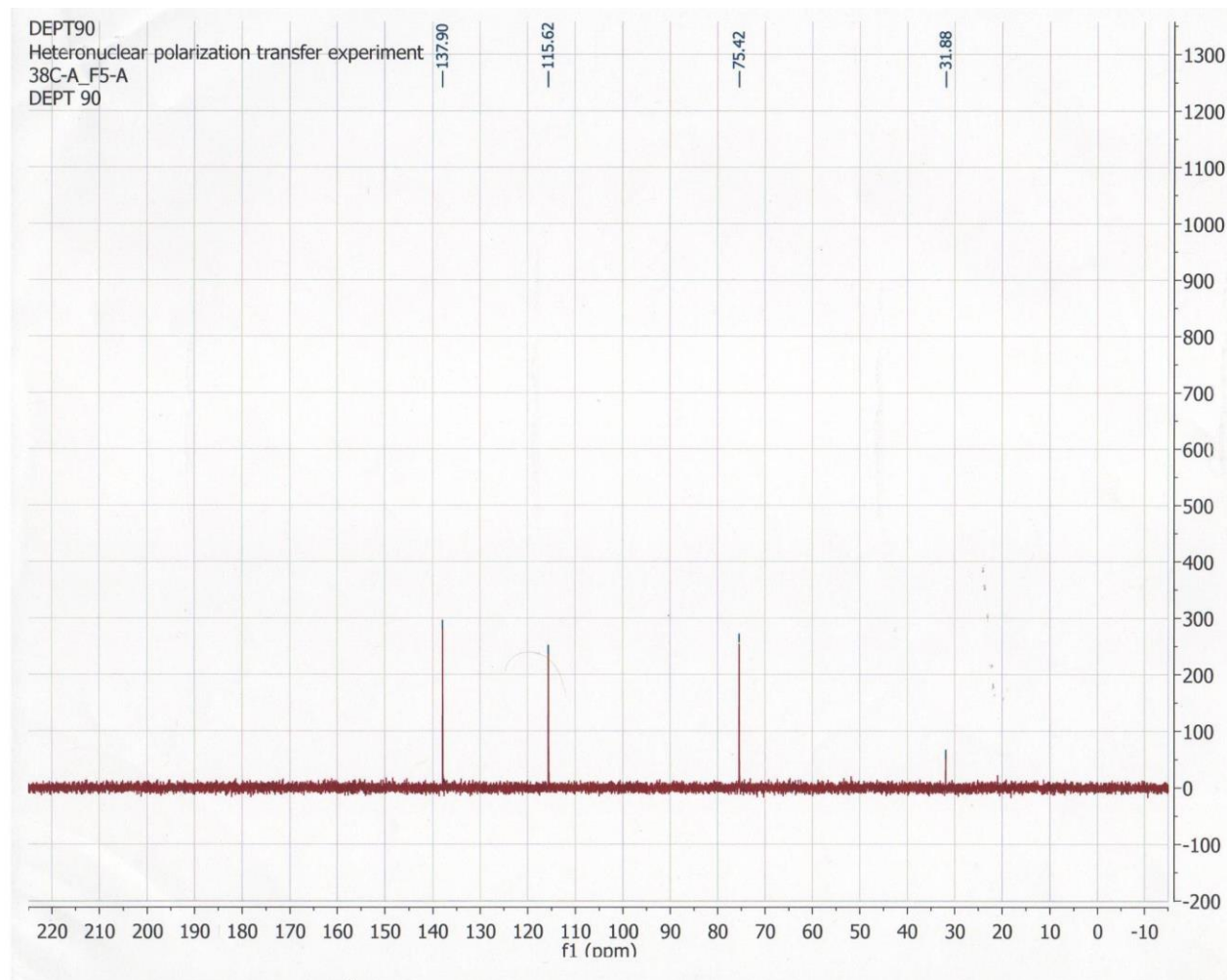
Espectro de RMN de ^1H [400 MHz, CDCl_3] da fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B.



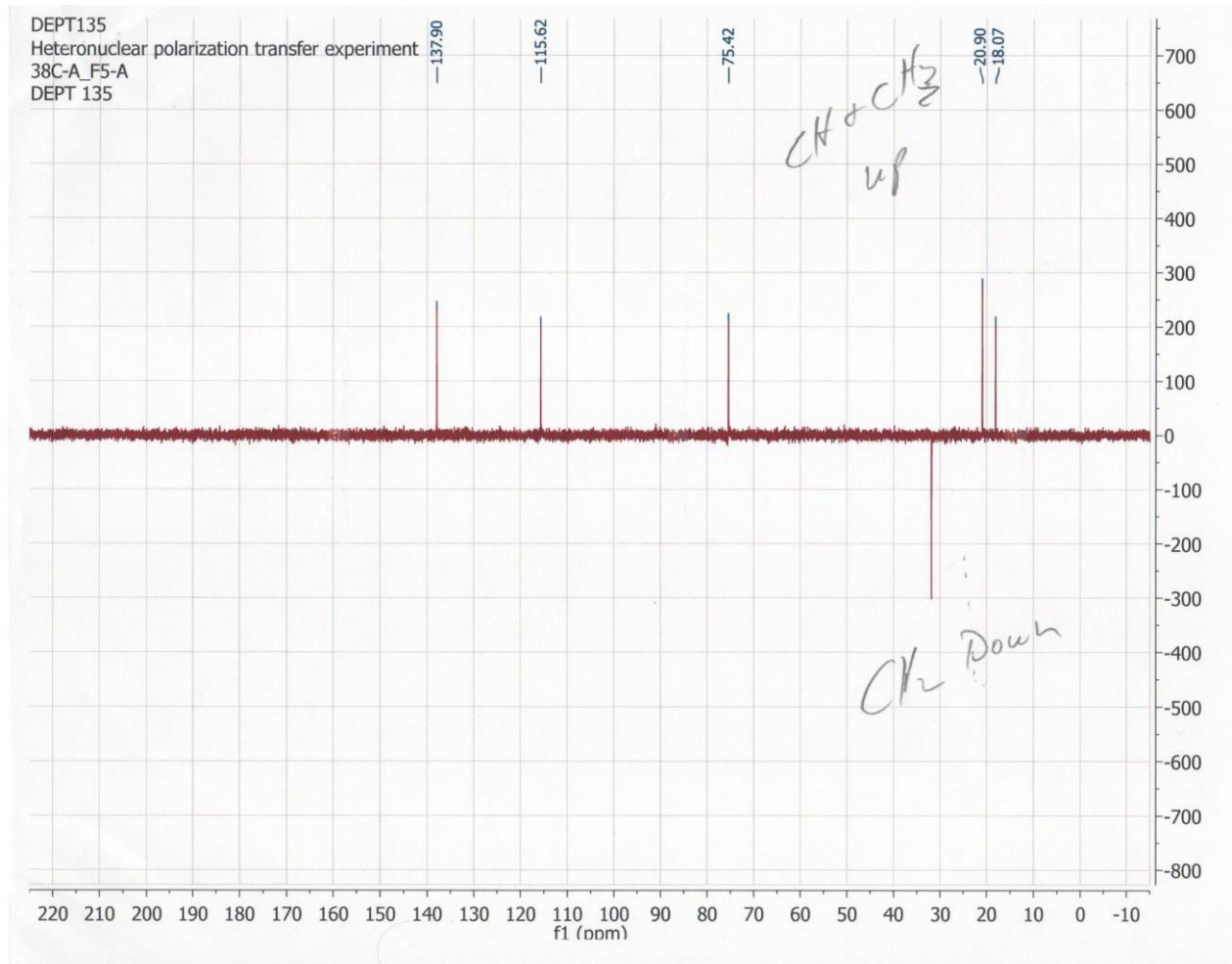
Espectro de COSY da fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B, correlação entre ^1H [400 MHz, CDCl_3], utilizando como padrão para os dois campos ^1H -RMN, sendo os pontos em intersecção os núcleos dos sinais correspondentes.



Espectro de RMN de ^{13}C [400 MHz, CDCl_3] da fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B.



Espectro DEP 90° da fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B.



Espectro DEP 90° da fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B.

Data: F5-A POS
 Sample Name:
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0.45..0.52)

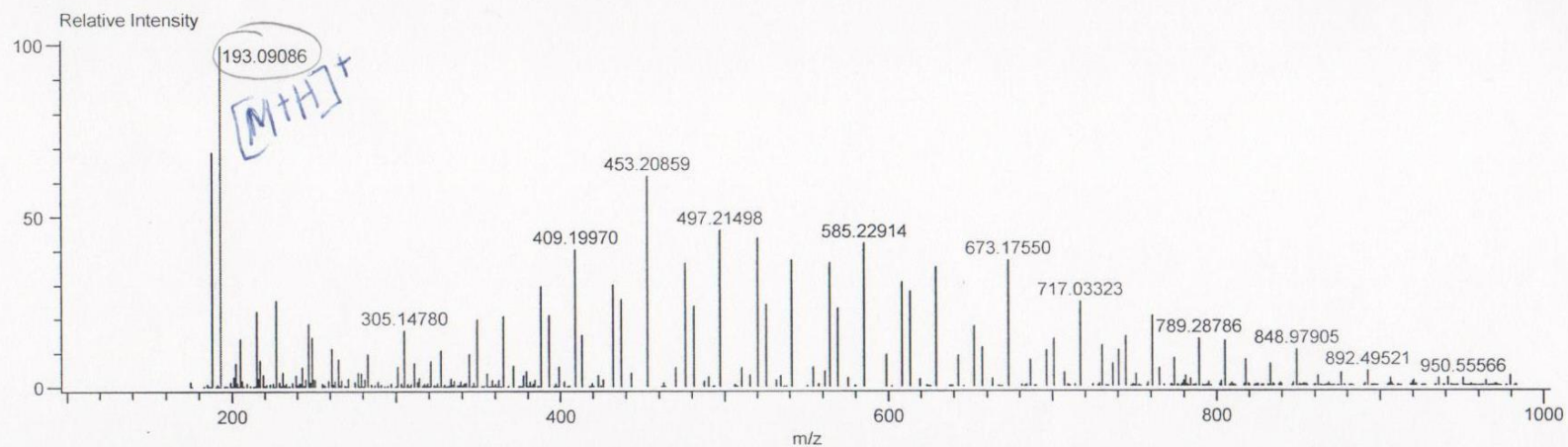
LC-MS

Acquired: 3/4/2013 1:08:59 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: trypPOS13
 Created: 3/4/2013 1:15:00 PM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1
 Element: ¹²C: 0 .. 30, ¹H: 0 .. 40, ²³Na: 0 .. 0, ¹⁶O: 0 .. 6

Tolerance: 10.00(mmu)

Unsaturation Number: -1.5 .. 20.0 (Fraction: Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
193.09086	288207.42	193.08647	4.39	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₃ ¹⁶ O ₃	5.5

Fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B. Análise de espectro de massa em LC/MS, com sinais do polo positivo.

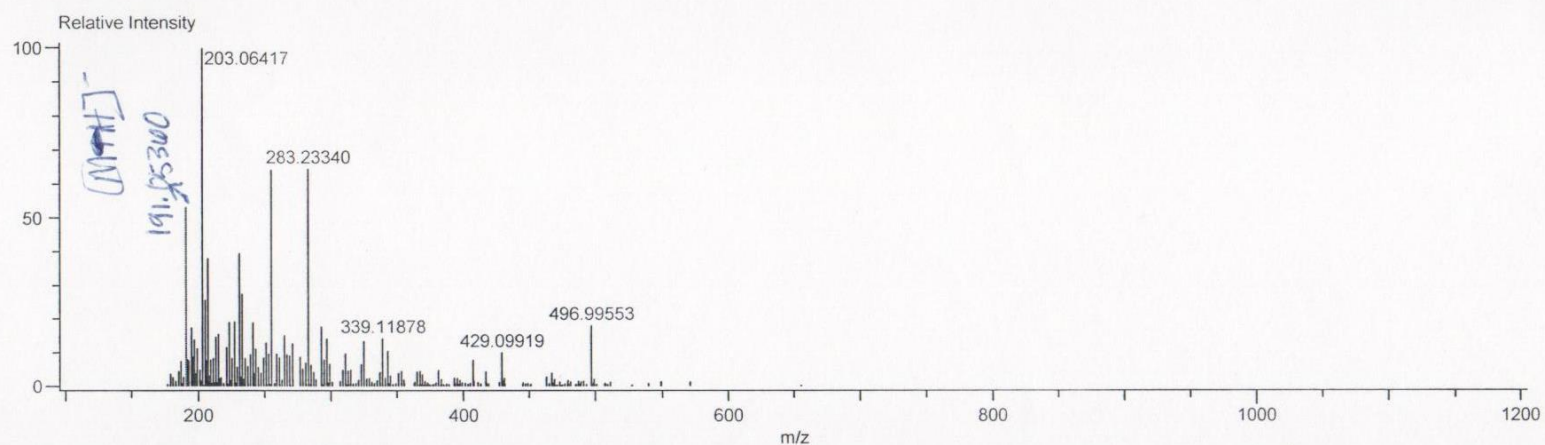
Data:F5-A NEG
 Sample Name:
 Description:
 Ionization Mode:ESI-
 History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0.39..0.50)

Acquired:3/4/2013 1:18:18 PM
 Operator:AccuTOF
 Mass Calibration data:tryp13
 Created:3/4/2013 1:24:04 PM
 Created by:AccuTOF

Charge number:1
 Element:¹²C:0 .. 30, ¹H:0 .. 40, ²³Na:0 .. 0, ¹⁶O:0 .. 6

Tolerance:20.00(mmu)

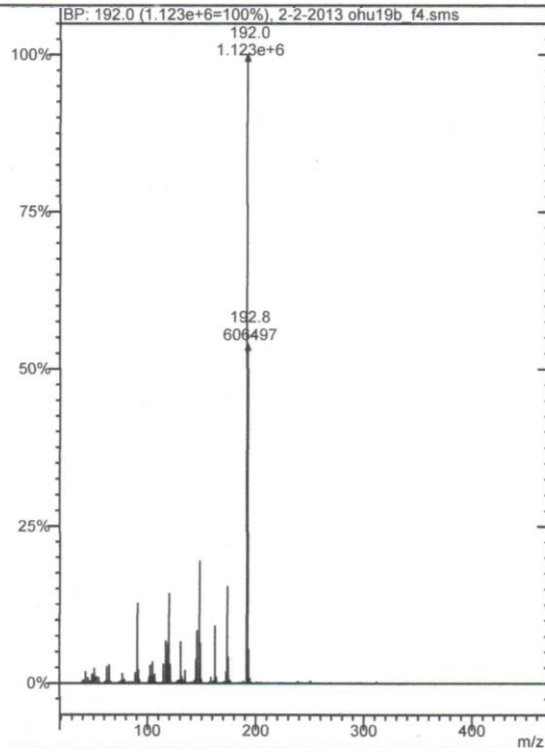
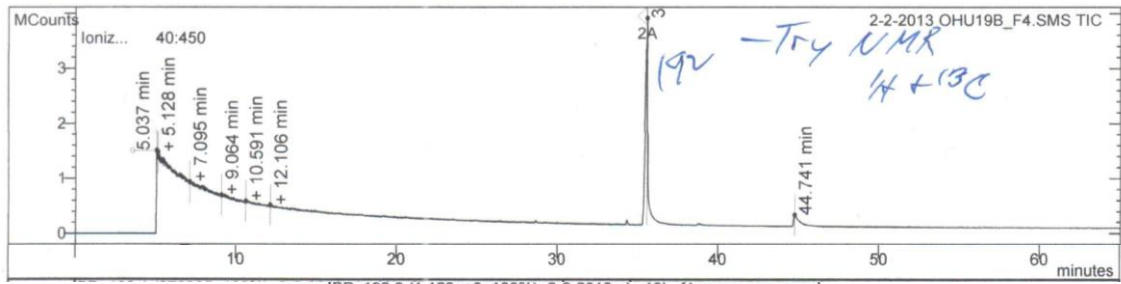
Unsaturation Number:-1.5 .. 20.0 (Fraction:Both)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
191.05360	18472.76	191.05556	-1.96	¹² C ₇ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₆	2.5
		191.04969	3.92	¹² C ₁₄ ¹ H ₇ ¹⁶ O ₁	11.5
		191.07082	-17.21	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₃	6.5
		191.03443	19.17	¹² C ₁₀ ¹ H ₇ ¹⁶ O ₄	7.5

Fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B. Análise de espectro de massa em LC/MS, com sinais do polo negativo.

MS Data Review All Plots - 2/5/2013 3:09 PM



Espectro de CG-MS da fração 4 do extrato *Biscogniauxia mediterranea* Ohu 19B.

10 ANEXOS
PRODUÇÃO CIENTÍFICA



XXI ALAM

Congresso Latinoamericano
de Microbiologia

SANTOS - BRASIL

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS HIDRO-ALCOÓLICOS VEGETAIS E DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À MELOCACTUS ERNESTII DO ESTADO DA BAHIA** com a autoria de: HUGHES, A.F.S., GALLIZA, I.V., MORAIS, C.G., ROSA, C.A., ROSA, L.H. foi apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

De 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 Mendes Convention Center, Santos, SP

Prof. Dr. Carlos P. Tuburda
Presidente da Associação Latinoamericana de Microbiologia

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente do XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia



Organização e realização



XXI ALAM

Congresso Latinoamericano
de Microbiologia

SANTOS - BRASIL

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À MELOCACTUS ERNESTII VAUPEL (CACTACEAE) DO ESTADO DE MINAS GERAIS com a autoria de: HUGHES, A.F.S., MORAIS, C.G., ROSA, C.A., ROSA, L.H. foi apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

De 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 Mendes Convention Center, Santos, SP

Prof. Dr. Carlos P. Taborda

Presidente da Associação Latinoamericana de Microbiologia

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Presidente do XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia



Organização e realização

SBM Sociedade Brasileira de Microbiologia



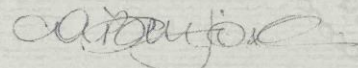
CERTIFICADO

Ministério da Educação
Universidade Federal de Minas Gerais
Pró-Reitoria de Extensão

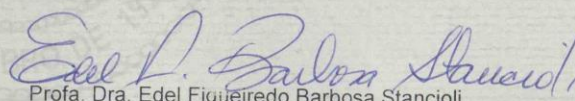
Evento

Certificamos que Alice Ferreira da Silva Hughes - HUGHES, A.F.S., ROSA, C.A., ROSA, L.H. participaram do "VIII Fórum de Microbiologia Professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia", promovido pelo Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 23 e 24 de maio de 2012, com carga horária de 20 horas, apresentaram trabalho intitulado: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS VEGETAIS E DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Melocactus ernestii* DO NORTE DE MINAS GERAIS".

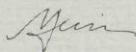
Belo Horizonte, 24 de maio de 2012.



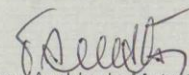
Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia



Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Coordenador do Evento



Profa. Dra. Adlane Vilas Boas Ferreira
Coordenadora do Centro de Extensão-CENEX



Prof. Dr. Tomaz Aroldo da Mota Santos
Diretor da Unidade



Planta Medica

Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research

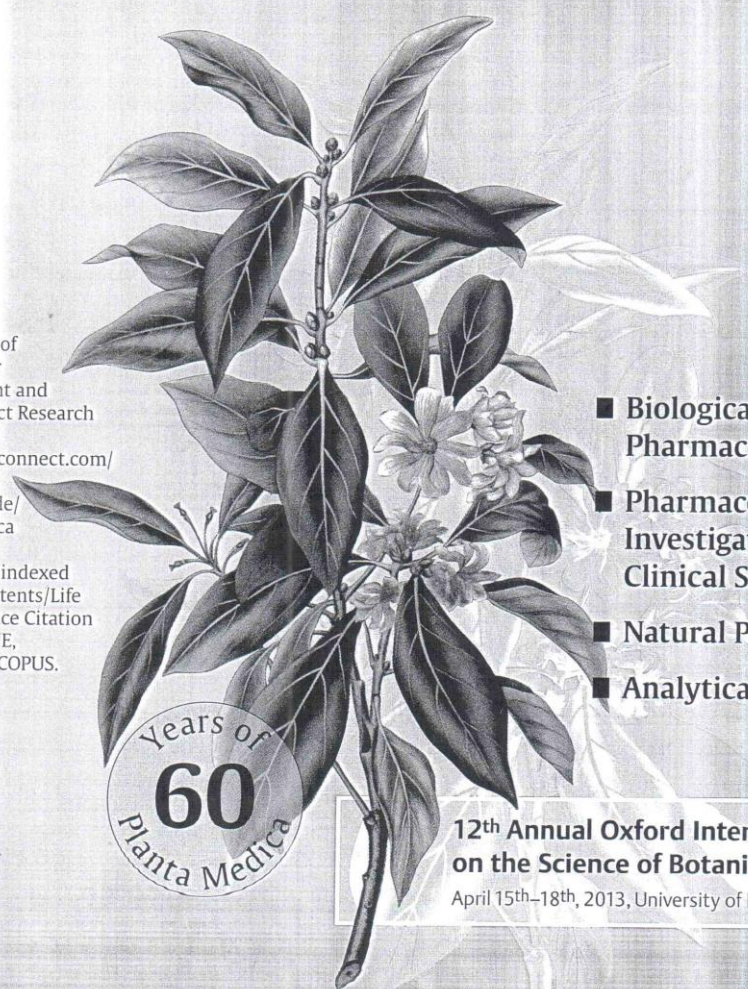
5

Volume 79
March 2013
Page 313-424

Official Organ of
the Society for
Medicinal Plant and
Natural Product Research

[www.thieme-connect.com/
ejournals](http://www.thieme-connect.com/ejournals)
[www.thieme.de/
fz/plantamedica](http://www.thieme.de/fz/plantamedica)

This journal is indexed
in Current Contents/Life
Sciences, Science Citation
Index, MEDLINE,
EMBASE and SCOPUS.



- Biological and Pharmacological Activity
- Pharmacokinetic Investigations and Clinical Studies
- Natural Product Chemistry
- Analytical Studies



**12th Annual Oxford International Conference
on the Science of Botanicals (ICSB)**

April 15th-18th, 2013, University of Mississippi, University, MS, USA

Planta Med. ISSN 0032-0643

Georg Thieme Verlag KG, Postfach 30 11 20, 70451 Stuttgart
E 21804 P/SE, DPMG, «entgelt bezahlte» Planta Med. S.2013



Thieme

P26

Antifungal Activity from Stem Extract and Endophytic Fungi of *Opuntia humifusa* (Raf.) RafHughes AFS¹, Carvalho CR¹, Moraes RM², Maddox VL³, Rosa LH¹, Wedge DE⁴¹Institute of Biological Sciences, Postgraduate in Studies in Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ²Biological Field Station, University of Mississippi, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS 38677, USA; ³Geosystems Research Institute, Mississippi State University, The University of Mississippi, University, MS 38677, USA; ⁴Natural Products Utilization Research Unit of the National Center for Natural Products Research, University, United States Department of Agriculture, University, MS 38677, USA

Endophytic microorganisms are fungi or bacteria that live inside plant tissues or organs, without causing any harmful symptoms. They may protect the plant from insect attacks and diseases, being also able to produce substances of biotechnological interest. Plants in the genus *Opuntia* are members of the Cactaceae family that are widely distributed in semiarid countries throughout the world, especially in the Mediterranean and Central America. *Opuntia humifusa* have been extensively characterized biochemically, and their biological effects, which include therapeutic properties as anticancer, antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory effects and potential hypoglycemic and hypolipidemic activity, have been well documented. The aim of the present work was to investigate antifungal potential of 30 dichloromethane (DCM) crude extracts of stem's *O. humifusa* and 80 DCM crude extracts of fungal endophytes isolated from *O. humifusa* against the phytopathogens *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, and *C. gloeosporioides* at a concentration of 160 µg/mL by bioautography assay. A total of 6 extracts (7.5%) of fungal endophytes showed antifungal properties with zones of inhibition ranging from 5 to 16 mm. No antifungal activity was observed in the crude extracts from plants. The results showed that *O. humifusa* isolates presented biotechnological potential for the control of phytopathogens fungi tested *in vitro*. The characterization of the extract and the substance bioactive will be performed using the technique of de-replication is of paramount importance for the detection of antifungal metabolites prototype for the development of new pesticides selective and less toxic to the environment. **Acknowledgements:** Capes Foundation.

P27

Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Echinacea purpurea*Carvalho CR¹, Hughes AFS¹, Moraes RM², Maddox VL³, Rosa LH¹, Wedge DE⁴¹Institute of Biological Sciences, Department of Microbiology, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Brazil; ²National Center for Natural Products Research, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Mississippi, USA; Center for Water and Wetland Resources, The University of Mississippi Field Station, Abbeville, Mississippi 38601, USA; ³Mississippi State University, Plant and Soil Sciences, Mississippi State 39762 MS ⁴USDA, ARS, Natural Products Utilization Research Unit (NPURU) and The National Center for Natural Products Research, Oxford, Mississippi 38655, USA

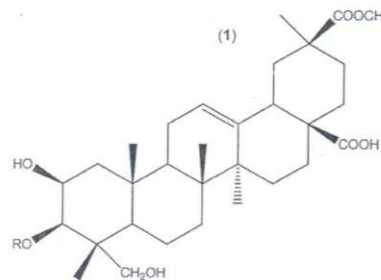
Endophytic fungi are microorganisms that live in intercellular plant tissue without causing apparent negative effects for the host. These microorganisms are living in association with medicinal plants and have received increasing attention after the discovery that the endophytic fungus *Taxomyces andreanae* recovered from *Taxus brevifolia*, produce the anticancer paclitaxel (Taxol®). In addition, recent studies have demonstrated that the endophytic fungal communities living within medicinal plant tissues produce a wide range of metabolites with different biological activities that may be useful as scaffolds for the development of new drugs. *E. purpurea* is the best known of the species of the genus *Echinacea*, used mostly to stimulate the immune system. The aim of the present study was to determine whether any of the endophytic fungi associated with *E. purpurea* produced metabolites with antifungal activity. Fragments of healthy leaves and upright flower stalks of 42 plants of *E. purpurea* were subjected to surface sterilization and inoculated on potato dextrose agar. A total of 246 endophytic fungal isolates were recovered from 410 fragments of the plant tissues (131 from leaves and 115 from upright flower stalks). Susceptibility testing against phytopathogenic *Colletotrichum* species was performed using dichloro-

methane (DCM) crude extracts of each endophytic fungus with a final concentration of 160 µg/mL. The DCM extracts from 103 (41.9%) endophytic fungi isolates displayed moderate antifungal activity against the spore germination of at least one target fungus. While eight (3.2%) extracts displayed clear zones of fungal growth inhibition in all phytopathogenic fungi tested in the direct TLC bioautography system. Our research showed the presence of endophytic fungi associated with the medicinal plant *E. purpurea* and that are able to produce bioactive compounds that may be useful as sources of novel biopesticides. **Acknowledgements:** Funding from Fapemig.

P28

Isolation and Identification of Triterpene Saponins from *Phytolacca americana* L. (Phytolaccaceae)Chan M^{1,2}, Ali Z³, Abe N³, Khan IA^{1,3}¹Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS, 38677, USA; ²British Columbia Institute of Technology, 3700 Willingdon Ave., Burnaby B.C., V5G-3H2, Canada; ³National Center for Natural Product Research, School of Pharmacy, The University of Mississippi, University, MS, 38677, USA

Phytolacca americana L. (Phytolaccaceae), commonly known as poke, pokeweed or pokeberry, is an herbaceous dicot native to North America. Despite the plant's documented toxicity, poke continues to be used as a food and therapeutic [1]. The roots of the plant have been traditionally used for a variety of indications including inflammation and rheumatism and for the treatment of viral, fungal and parasitic infections [2]. In order to formulate a better understanding of the risk and benefits associated with the use of poke, a thorough study of its phytochemical profile is required. Reported herein are the results of a preliminary investigation focused on the isolation and identification of triterpene saponins, including the toxic compounds phytolaccoside B and phytolaccin (1), from the plant. Several triterpene saponins were isolated through chromatographic techniques and identified through spectrometric methods. The isolated compounds and data obtained from this preliminary work will be further used to support a broader phytochemical investigation of the plant. **Acknowledgements:** This research is supported by Science Based Authentication of Dietary Supplements funded by the Food and Drug Administration grant number 5U01FD004246. **References:** [1] Nienaber MA, Thieret JW. (1993+) *Phytolacca Americana* in Flora of North America. Flora of North America Editorial Committee. New York and Oxford. 4: 5–8. [2] Barton BS (1810) Collections for an Essay towards a Materia Medica of the United States. Fry and Kammerer Printers. Philadelphia: 27–28.



phytolaccoside B: R = β-D-xylopyranosyl
 phytolaccin: R = H

P29

NMR Spectroscopic Data Comparison of Diastereomeric Alkaloids from *Mitragyna speciosa*Ali Z¹, Hataejae HD^{1,2}, Khan IA^{1,3}¹National Center for Natural Products Research and University of Mississippi, University, Mississippi 38677, USA; ²Ege University, Faculty of Science, Biology Department, 35100 Izmir, Turkey; ³Department of Pharmacognosy, University of Mississippi, University, Mississippi 38677, USA

Mitragyna speciosa (Korth) belongs to the Rubiaceae family and its leaves have been used traditionally as a substitute for opium. Indole alkaloids, the most common constituents, are considered the active con-



IX FÓRUM DE *m* MICROBIOLOGIA




PROFESSOR ROMAIN ROLLAND GOLGHER
A MICROBIOLOGIA E A IMUNIDADE INATA
Belo Horizonte – 05 e 06 de Junho de 2013

Certificado

Certificamos que o trabalho “IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS COM AÇÃO ANTIFÚNGICA ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Melocactus ernestii*” foi apresentado na qualidade de PÔSTER, tendo como autores Hughes, A.F.S., Wedge D.E., Cantrell C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H, no “IX Fórum de Microbiologia Professor Romain Rolland Golgher, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 05 e 06 de junho de 2013.


Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia


Belo Horizonte, 06 de junho de 2013.
Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador IX Fórum de Microbiologia Professor
Romain Rolland Golgher



Ministério da
Educação



Artigo da tese publicado:

- 1) SILVA-HUGHES, ALICE F.; WEDGE, DAVID E.; CANTRELL, CHARLES L.; CARVALHO, CAMILA R.; PAN, ZHIQIANG; MORAES, RITA M.; MADDOXX, VICTOR L.; ROSA, LUIZ H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research* (Print), v. 175, p. 66-77, 2015.
- 2) CARVALHO, CAMILA R.; FERREIRA-D'SILVA, ALICE; WEDGE, DAVID E.; CANTRELL, CHARLES L.; ROSA, LUIZ H. Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miricidae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal. *Canadian Journal of Microbiology*, 2018, 64(11): 835-843, <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0131>

Artigos da tese em submissão:

- 1) ALICE F. SILVA-HUGHES, FREDERIC M. HUGHES, DAVID E. WEDGE, CHARLES L. CANTRELL, CARLOS AUGUSTO ROSA, LUIZ H. ROSA. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with endemic cactus *Melocactus ernestii* (Cactaceae) in Brazil.

Artigos publicados como colaboradora:

- 1) VIEIRA, M. L. A.; HUGHES, A. F. S.; GIL, V. B.; VAZ, A. B. M.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology* (Print), v. 58, p. 54/1-66, 2012.
- 2) ABRÃO, FLÁVIA OLIVEIRA; DUARTE, EDUARDO ROBSON; FREITAS, CLÁUDIO EDUARDO SILVA; VIEIRA, EDVALDO ALVES; GERASEEV, LUCIANA CASTRO; DA SILVA-HUGHES, ALICE FERREIRA; ROSA, CARLOS AUGUSTO; RODRIGUES, NORBERTO MARIO. Characterization of Fungi from Ruminant Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. *Current Microbiology* (Print), v. 69, p. 649-659, 2014.