

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

Tese de Doutorado

***Vellozia gigantea* (Velloziaceae) e seus fungos endofíticos: diversidade e  
bioprospecção de substâncias bioativas**

Mariana Costa Ferreira

Belo Horizonte  
2017

Mariana Costa Ferreira

***Vellozia gigantea* (Velloziaceae) e seus fungos endofíticos: diversidade e bioprospecção de substâncias bioativas**

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

Orientador: Luiz Henrique Rosa.

Laboratório de Sistemática e Biomoléculas de Fungos  
Departamento de Microbiologia/ICB  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte  
2017

**Colaboradores:**

Dr. Carlos Augusto Rosa

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

Dr. David E. Wedge, Dr. Charles Cantrell e Dr. Steven Duke

*United States Department of Agriculture (USDA-ARS), Natural Products Utilization Research Unit (NPURU) - University of Mississippi dos Estados Unidos da América.*

Melissa R. Jacob, Shabana Khan e Abbas Ali

*The University of Mississippi dos Estados Unidos da América, National Center for Natural Products Research, Mississippi.*

## **Agradecimentos**

A Deus, que é a rocha mais firme para os meus pés, agradeço pelo sustento, direcionamento e amor que tem me concedido. Por Ele e para Ele são todas as coisas.

Ao Prof. Luiz Rosa, agradeço pela orientação, oportunidade, discussões e ensinamentos. Muito obrigada pela paciência e confiança.

Ao Dr. David E. Wedge e Dr. Charles Cantrell, agradeço pela colaboração, ajuda, prestatividade, auxílio e paciência durante todo o período de realização do doutorado sanduíche.

Ao Solomon Green, Ms. Linda, Ramonaa Pace e Amber Reichley, agradeço pela ajuda, pela amizade, pelos momentos agradáveis e por todo ensinamento durante a minha estadia em Oxford-MS.

Aos Prof. Carlos A. Rosa, pela colaboração e auxílios durante o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Mariana Vieira, Dra. Viviane Gouveia, Dra. Valéria Godinho e Dra. Iara Santiago, por terem aceitado o convite e pela disponibilidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pela oportunidade, e a Capes pelo apoio financeiro.

Ao Leonardo Cotta Ribeiro e a Alice Hughes, pelo auxílio durante a realização das coletas de amostras utilizadas neste trabalho.

Ao pessoal do NAGE e do laboratório de Parasitologia – FioCruz, por disponibilizarem a infra-estrutura necessária para a realização do sequenciamento das amostras.

Aos amigos do Laboratório de taxonomia, biodiversidade e biotecnologia de fungos e do LSBF, obrigada pela amizade, companherismos, pelos inúmeros momentos divertidos e pela ajuda nos momentos de aperto. Gosto demais de vocês...

A Vivi, companheira de sanduíche, agradeço pelo tempo de convivência, pelo apoio, amizade, ajuda e pelos agradáveis momentos que tivemos juntas. Você foi fundamental para que eu conseguisse completar esta etapa.

A Camila Carvalho, agradeço pela amizade, pela excelente convivência, pela ajuda, força, cuidado, paciência e por tantas outras coisas. É difícil ter palavras para agradecer a alguém que foi tão importante e fundamental nesse período. Obrigada por fazer parte da minha história!

A minha família, obrigada pelo apoio e confiança durante toda esta trajetória. Obrigada por estarem sempre me apoiando nas minhas decisões. Vocês são muito importantes para mim.

Aos amigos da célula, obrigada pela amizade, apoio e orações. Mesmo que indiretamente vocês foram importantes durante esse período.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para que este estudo pudesse ser concluído. Afinal, nenhum trabalho é construído por um só e sim por um conjunto.

## Sumário

\_Toc470716488

Lista de Abreviaturas.....	IX
Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas.....	XIV
Lista de Anexos.....	XV
Resumo.....	1
Abstract.....	3
1 Justificativa e Relevância .....	5
2 Revisão Bibliográfica .....	7
2.1 Micro-organismos endofíticos .....	7
2.2 Fungos endofíticos: interação micro-organismo/planta hospedeira .....	8
2.3 Diversidade de fungos endofíticos.....	12
2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos .....	15
2.5 <i>Vellozia gigantea</i> N.L. Menezes & Mello-Silva ( <i>Velloziaceae</i> ).....	19
3 Objetivos.....	22
3.1 Objetivo geral .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
4 Material e Métodos.....	23
4.1 Área de coleta .....	23
4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos .....	23
4.3 Identificação dos fungos endofíticos .....	24
4.3.1 Fungos filamentosos .....	24
4.3.1.1 Extração do DNA Total.....	25
4.3.1.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG) <sub>5</sub> .....	25
4.3.1.3 Amplificação da região ITS .....	26
4.3.1.4 Amplificação parcial do gene da $\beta$ -tubulina .....	27
4.3.1.5 Amplificação parcial da RNA Polimerase II.....	27
4.3.2 Leveduras.....	28
4.3.2.1 Extração do DNA Total.....	28
4.3.2.2 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4.....	29
4.3.3 Purificação dos amplicons .....	29
4.3.4 Reações de sequenciamento .....	30

4.3.5	Análise computacional das sequências.....	30
4.4	Cultivo dos fungos e preparo dos extratos.....	31
4.4.1	Fungos filamentosos e leveduras.....	31
4.4.2	Folhas e raízes de <i>Vellozia gigantea</i> .....	31
4.5	Ensaio Biológicos.....	32
4.5.1	Determinação da atividade antimicrobiana .....	32
4.5.1.1	Padronização dos inóculos .....	32
4.5.1.2	Ensaio antimicrobiano.....	33
4.5.2	Ensaio antimicrobiano contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i> .....	34
4.5.3	Cálculo da Concentração Inibitória Mínima .....	35
4.6	Seleção de extratos para análise química.....	37
4.7	Cultivo em larga escala para obtenção de extratos brutos .....	37
4.8	Ensaio biológicos para o biomonitoramento da atividade .....	37
4.8.1	Determinação da atividade herbicida .....	38
4.8.1.1	Bioensaio com alface e gramínea.....	38
4.8.1.2	Bioensaio com <i>Lemna paucicostata</i> (lentilha-d'água) .....	38
4.8.2	Determinação da atividade larvicida .....	39
4.8.3	Determinação da atividade antimalárica e citotoxicidade .....	40
4.8.4	Determinação da atividade leishmanicida .....	40
4.8.5	Determinação da atividade antimicrobiana .....	41
4.9	Identificação dos metabólitos bioativos.....	41
4.10	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	42
4.11	Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos .....	42
4.11.1	Cromatografia Gasosa – Análise com Detector por Ionização de chama .....	43
4.12	Fracionamento químico biomonitorado.....	43
4.13	Análises de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	43
4.14	Elucidação estrutural dos constituintes químicos .....	44
5	Resultados e Discussão.....	45
5.1	Coleta e isolamento dos fungos endofíticos .....	45
5.2	Identificação dos fungos endofíticos .....	46
5.3	Composição da comunidade de fungos endofíticos associados à <i>Vellozia gigantea</i> .....	58
5.4	Diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas e raízes adventícias de <i>Vellozia gigantea</i> .....	63

5.5	Determinação da atividade antimicrobiana.....	67
5.6	Seleção de extratos para a análise química.....	70
5.7	Determinação da atividade biológica dos extratos brutos selecionados.....	71
5.8	Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos.....	73
5.9	Fracionamento químico biomonitorado do extrato de <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720.....	75
5.10	Elucidação estrutural do constituinte químico.....	79
5.11	Fracionamento químico biomonitorado do extrato das raízes <i>Vellozia gigantea</i> e elucidação estrutural dosconstituente químicos.....	81
5.12	Atividade fitotóxica e larvicida dos diterpenos obtidos a partir das raízes de <i>Vellozia gigantea</i> .....	87
7	Referências.....	92
	Anexos.....	108



## Lista de Abreviaturas

% - por cento

Act – Actina

AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC - American Type Culture Collection

BDA - Ágar Dextrose Batata

BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool

Calm – Calmodulina

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCT - Coleção de Cultura Tropicais

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória de 50%

CI<sub>90</sub> - Concentração inibitória de 90%

CG- DIC - Cromatografia Gasosa – Análise com Detector por Ionização de Chama

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas

CL-EM - Cromatografia Líquida acoplada com Espectrometria de Massas

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

cm - Centímetro

CTAB - Brometo de cetil trimetilamonio

DCM - Diclorometano

DEET - N, N-dietil-3-metilbenzamida

DGGE - Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO - Densidade óptica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO – Espécie reativa de oxigênio

EUA - Estados Unidos da América

g - gramas

GPS - Sistema de Posicionamento Global

HCl - Ácido Clorídrico

Hist - Histona  
ITS - Região transcrita interna  
M - molar  
MEGA - Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis  
mg/mL - miligramas por mililitro  
mL - mililitro  
mm - milímetro  
mM – Milimolar  
MOPS - Ácido morfolinepropano sulfônico  
MSP- PCR - PCR microsatélite  
MTT - Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico  
NaCl - Cloreto de Sódio  
NCBI - NCBI: National Center for Biotechnology Information  
ng/μL - nanogramas por mililitro  
°C - graus Celsius  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
P.A. - para análise  
p/v - peso por volume  
pb - pares de bases  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
PDT - Podofilotoxina  
pH - potencial hidrogeniônico  
PN – Produtos naturais  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
RPB2 – RNA polimerase II  
r.p.m. - rotações por minuto  
rDNA - DNA ribossomal  
rRNA - RNA ribossomal  
S - Sul  
SDS - sódio dodecil sulfato  
TBE - Tris borato  
TNTP – tetranortriterpenóides  
UDT – Unidade Taxonomica Distinta

UFC/mL - Unidades formadoras de colônia por mililitro

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UV – Ultra Violeta

V – volt

Vg – *Vellozia gigantea*

W - oeste

X - vezes

$\beta$ -Tub - Beta-tubulina

$\mu$ g/mL - Microgramas por mililitro

$\mu$ L - microlitro

$\mu$ M - Micromolar

$\mu$ mol – micromol

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Hipótese do antagonismo balanceado proposto por Schulz e colaboradores (2015).....	12
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de interação interespecífica endófito – endófito. (A) Interação fungo – fungo. (B) Interação fungo – bactéria endossimbionte. (C) Interação fungo – bactéria (KUSARI et al., 2012).....	16
<b>Figura 3.</b> Espécime de <i>Vellozia gigantea</i> . (a) Indivíduo adulto, (b) raiz adventícia, (c) folhas.....	21
<b>Figura 4.</b> Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios realizados.....	34
<b>Figura 5.</b> Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima.....	36
<b>Figura 6.</b> Frequência de isolamento dos fungos obtidos a partir das folhas e raízes de cada espécime de <i>Vellozia gigantea</i> . Vg: Espécime de <i>Vellozia gigantea</i> amostrado.....	45
<b>Figura 7.</b> Porcentagem dos fungos endofíticos classificados em nível de classe associados às folhas e raízes de <i>Vellozia gigantea</i> .....	47
<b>Figura 8.</b> Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ do extrato bruto produzido por <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720, demonstrando a presença de possíveis substâncias aromáticas de interesse.....	70
<b>Figura 9.</b> Cromatografia de camada delgada das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto produzido a partir do fungo <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720. Fase móvel hexano/acetato de etila 8:2.....	76
<b>Figura 10.</b> Cromatografia de camada delgada das frações obtidas a partir do fracionamento da fração I (obtida a partir do fracionamento do extrato bruto produzido a partir do fungo <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720). Fase móvel Hexano/Isopropanol 9:1.....	78
<b>Figura 11.</b> Composto identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720.....	79
<b>Figura 12.</b> Cromatografia de camada delgada das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto produzido a partir das raízes de <i>Vellozia gigantea</i> . Fase móvel Hexano/Isopropanol 9:1.....	82

<b>Figura 13.</b> Substância VG1 identificado a partir da Fração G” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de <i>V. gigantea</i> .....	84
<b>Figura 14.</b> Substância VG3 identificado a partir da Fração D” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de <i>V. gigantea</i> .....	85
<b>Figura 15.</b> Substância VG5 identificado a partir da Fração D” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de <i>V. gigantea</i> .....	86
<b>Figura 16.</b> Substância VG7 identificado a partir da Fração D” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de <i>V. gigantea</i> .....	87
<b>Figura 17.</b> Curvas dose/resposta para as quatro substâncias isoladas obtidas no bioensaio contra <i>Lactuca paucicostata</i> . As setas com números denotam a concentração que inibe o crescimento em 50%.....	89

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Identificação molecular dos fungos endoíticos associados à <i>Vellozia gigantea</i> .....	48
<b>Tabela 2.</b> Abundância dos fungos endofítcos associados à folhas e raízes adventícias de <i>V. gigantea</i> .....	63
<b>Tabela 3.</b> Atividade antimicrobiana dos extratos brutos vegetais e extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados a <i>Vellozia gigantea</i> .....	68
<b>Tabela 4.</b> Atividade antimicrobiana dos extratos brutos selecionados para caracterização química.....	72
<b>Tabela 5.</b> Quantificação (%) de ácidos graxos em extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos associados à <i>Vellozia gigantea</i> .....	74
<b>Tabela 6.</b> Atividade antimalárica das frações obtidas a partir do extrato dounge <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720.....	76
<b>Tabela 7.</b> Atividade antimalárica das frações obtidas do fracionamento da fração I.....	78
<b>Tabela 8.</b> Atividade antimalárica da Epoxicitocalasina H isolado do fungo endofítico <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720.....	80
<b>Tabela 9.</b> Atividade herbicida das frações obtidas a partir do extrato de raíz de <i>Vellozia giagntea</i> .....	82
<b>Tabela 10.</b> Atividade herbicida dos compostos puros isolados a partir das raízes adventícias de <i>Vellozia gigantea</i> .....	88

## Lista de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Fluxograma de fracionamento do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico <i>Diaporthe miriciae</i> UFMGCB 9720.....	109
<b>Anexo 2.</b> Fluxograma de fracionamento do extrato bruto produzido a partir das raízes de <i>Vellozia gigantea</i> .....	110
<b>Anexo 3.</b> Apresentações em congressos e artigos produzidos.....	111

## Resumo

Os micro-organismos endofíticos, aqueles que residem assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida, podem desempenhar diferentes efeitos na ecologia da planta hospedeira, no seu estado saudável e em sua evolução. Estes micro-organismos são estudados quanto a sua capacidade em produzir diferentes metabólitos bioativos de interesse na medicina e agricultura. Entre as plantas alvos para estudos da comunidade de fungos endofíticos, aquelas consideradas endêmicas parecem representar uma promissora alternativa para caracterização de espécies raras e/ou produtoras de moléculas bioativas. Neste contexto, a espécie vegetal *Vellozia gigantea* N.L. Menezes & Mello-Silva (*Velloziaceae*), uma monocotiledônea recentemente descrita, endêmica do Brasil e considerada rara, tendo a sua história e a biologia pouco conhecida até o presente momento representa um alvo interessante para obtenção de fungos endofíticos associados. A partir do exposto acima, o presente trabalho tem como propostas conhecer a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *V. gigantea*, bem como avaliar sua capacidade em produzir metabólitos bioativos. Fragmentos das folhas e raízes adventícias de *V. gigantea* foram desinfestados superficialmente e utilizados para isolamento dos fungos endofíticos. A partir do material amostrado foram obtidos 326 isolados, 321 fungos filamentosos e cinco leveduras, os quais foram agrupados em morfoespécies a partir de suas características morfológicas e moleculares. A identificação dos fungos filamentosos foi realizada por meio do sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rDNA, bem como pelo sequenciamento parcial do gene da  $\beta$ -tubulina e RNA polimerase II; as leveduras foram submetidas ao sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal. Ao final do processo de identificação foram caracterizadas 87 unidades taxonômicas distintas (UTD), as quais pertencem ao filo *Ascomycota*. A classe *Sordariomycetes* foi predominante e representada por 81% dos isolados obtidos, seguida por *Dothideomycetes* com 12%. As classes *Leotiomycetes* (4%) e *Eurotiomycetes* (2%) também foram encontradas, porém em menor frequência. Inseridos em *Sordariomycetes* foram encontrados os gêneros *Clonostachys*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Muscodor*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Xylaria*. Entre os *Dothideomycetes* foram identificados os gêneros *Bipolaris*, *Peyronellaea*, *Paraconiothyrium*, *Pallidocercospora*, *Mycosphaerella*, *Guignardia* e



*Pseudocercospora*. Como representantes da classe *Leotiomycetes* foram obtidos táxons pertencentes aos gêneros *Pezicula*, *Coccomyces*, *Myxotrichum* e um táxon identificado dentro da ordem *Helotiales*. Em *Eurotiomycetes* foram caracterizadas espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* e um táxon classificado dentro da família *Herpotrichiellaceae*. Também foram identificadas as leveduras *Yamadazyma michaelii*, *Lodderomyces (Candida) parapsilosis*, bem como uma nova espécie identificada como *Yamadazyma riverae* sp. nov. Quando comparado com estudos correlacionados, a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *V. gigantea* apresentou-se alta (Fisher- $\alpha$  = 42,68), com grande riqueza de espécies (Margalef = 15,21) e ausência de dominância de táxons (Simpson = 0,96). Com o objetivo de avaliar a capacidade de produção de metabólitos bioativos, os fungos foram cultivados no meio de cultura Agar Batata Dextrosado e seus metabólitos extraídos com o solvente diclorometano. Os extratos obtidos foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana e antiparasitária pelo método de microdiluição em placa, e, em seguida, caracterizados quimicamente para a determinação de suas moléculas bioativas. A partir do extrato do fungo *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720, o qual apresentou potencial antimalárico, foi identificado a substância epoxicitocalasina H, a qual apresentou atividade nas concentrações de 51,7 e 39,3 ng/mL contra *P. falciparum* sensível a cloroquina (D6) e resistente a cloroquina (W2), respectivamente; atividade esta nunca anteriormente relatada. A partir dos extratos antimicrobianos dos fungos *Trichoderma effusum* UFMGCB 9736, *Penicillium adametzii* UFMGCB 9829 e 9894 e *Penicillium quebecense* UFMGCB 9928 foram identificados, por meio de Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama (CG-DIC), diferentes ácidos graxos (capríco, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico e linoléico) bioativos. Também foi avaliado o potencial bioativo das folhas e raízes adventícias de *V. gigantea*. A partir do extrato das raízes adventícias foram isolados quatro novos diterpenos identificados como: (8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone, 7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol, 3,20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol, e 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistanthatetraen-10-ol) com atividades herbicidas. A partir dos resultados obtidos é possível afirmar que folhas e raízes de *V. gigantea*, uma espécie endêmica do Campo Rupestre do estado de Minas Gerais, Brasil, abrigam uma comunidade de fungos endofíticos altamente diversa e com potenciais fungos produtores de metabólitos bioativos. Além disso, os tecidos vegetais de *V. gigantea* demonstram ser uma promissora fonte de novos metabólitos de interesse na agricultura.

## Abstract

Endophytic microorganisms, those residing asymptotically within plant tissues for at least one period of their life cycle, may have different effects on the ecology of the host plant, its healthy state and its evolution. These microorganisms have been studied for their ability to produce different bioactive metabolites of interest in medicine and agriculture. Among the target plants for studies of the endophytic fungi community, those considered endemic seem to represent a promising alternative for the characterization of rare and/or bioactive molecule producers. In this context, the plant species *Vellozia gigantea* N.L. Menezes & Mello-Silva (Velloziaceae), a recently described monocotyledon, endemic to Brazil and considered rare, with its history and biology little known until the present moment represents an interesting target for obtaining associated endophytic fungi. From the above, the present work aims to know the diversity of the community of endophytic fungi associated with *V. gigantea*, as well as to evaluate its capacity to produce bioactive metabolites. Fragments of the leaves and adventitious roots of *V. gigantea* were surface disinfested and used for the isolation of endophytic fungi. From the sampled material were obtained 326 isolates, 321 filamentous fungi and five yeasts, which were grouped from their morphological and molecular characteristics. Fungi identification was performed by sequencing the internal transcribed region ITS-5.8S of the rRNA gene region, as well as by the partial sequencing of the  $\beta$ -tubulin gene, RNA polymerase II. At the end of the identification process, 84 distinct taxonomic units (UTD) were characterized, which belong to the Ascomycota phylum. The *Sordariomycetes* class was predominant representing 81% of the isolates obtained, followed by *Dothideomycetes* with 12%. The classes *Leotiomycetes* (4%) and *Eurotiomycetes* (2%) were also found, but less frequently. Inserted in *Sordariomycetes* were found the genera *Clonostachys*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Muscodor*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* and *Xylaria*. Among the *Dothideomycetes* were identified the genera *Bipolaris*, *Peyronellaea*, *Paraconiothyrium*, *Pallidocercospora*, *Mycosphaerella*, *Guignardia* and *Pseudocercospora*. As representatives of the class *Leotiomycetes* were found taxa belonging to the genus *Pezicula*, *Coccomyces*, *Myxotrichum* and a taxon identified within the order *Helotiales*. In *Eurotiomycetes*, species belonging to the genus *Penicillium* and a taxon classified within the family *Herpotrichiellaceae* were characterized. Yeasts

*Yamadazyma michaelii*, *Lodderomyces (Candida) parapsilosis*, as well as a new species identified as *Yamadazyma riverae* sp. Nov. When compared to correlated studies, the diversity of the endophytic fungi associated with *V. gigantea* was high (Fisher- $\alpha$  = 42.68), with great species richness (Margalef = 15,21) and absence of taxon dominance (Simpson = 0.96). In order to evaluate the production capacity of bioactive metabolites, the fungi were cultivated in BDA for 15 days and their metabolites extracted with the dichloromethane solvent. The extracts obtained were evaluated for antimicrobial and antiparasitic activity by the plate microdilution method, and chemically characterized for the determination of the bioactive compounds. From the extract of *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720, which showed antimalarial potential, the compound epoxycyclalasin H was identified, showing activity at concentrations of 51.7 and 39.3 ng / mL against *P. falciparum* chloroquine sensitive (D6) and to *P. falciparum* Chloroquine resistant (W2), respectively, activity is never previously reported for this molecule. From the fungal extracts of *Trichoderma effusum* UFMGCB 9736, *Penicillium adametzii* UFMGCB 9829 and 9894, *Penicillium quebecense* UFMGCB 9928, were identified by Gas Chromatography coupled to Flame Ionization Detector (GC-FID), different fatty acid (caproic, palmitic, palmitolytic, stearic, oleic and linoleic). The biotechnological potential of the leaves and adventitious roots of *V. gigantea* was also evaluated. From the extract of the adventitious roots, we isolated four new diterpenes (8 (9), 15-isopimaradiene-1,3,7,11-tetraone, 7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol, 20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol, and 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistanthatetraene-10-ol) with potential phytotoxic and pesticide activities. From the results obtained is possible to affirm that leaves and roots of *V. gigantea*, an endemic species of Campo Rupestre of the state of Minas Gerais, Brazil, harbor a community of highly diverse endophytic fungi with potential metabolite-producing fungi Bioactives. In addition, the plant tissues of *V. gigantea* demonstrate to be source of new metabolites of interest in agriculture.

## 1 Justificativa e Relevância

A avaliação da diversidade microbiana representa um grande desafio para a microbiologia moderna, devido ao grande número de espécies já conhecidas ou que se acredita existir. Diferentes estudos demonstram que os tecidos vegetais representam um reservatório promissor da diversidade microbiana (GAMBOA et al., 2002; ALY et al., 2011, BHARDWAJ & AGRAWAL, 2014). Os micro-organismos endofíticos, aqueles que residem assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida, podem desempenhar diferentes efeitos na ecologia da planta hospedeira, no seu estado saudável e em sua evolução (BRUNDRERT, 2006).

Apesar da grande diversidade esperada, relativamente poucos destes micro-organismos têm sido caracterizados. Além disso, muitos endófitos produzem metabólitos secundários bioativos (SMITH et al., 2008). De acordo com Bhardwaj & Agrawal (2014) o papel dos metabólitos secundários ainda não é completamente compreendido. No entanto, sugere-se que estes metabólitos desempenham um importante papel nos mecanismos de defesas e nas relações fúngicas.

Os metabólitos produzidos pelo metabolismo secundário fúngicos têm demonstrado potencial biotecnológico como moléculas protótipos para o desenvolvimento de fármacos com valor terapêutico (SMITH et al., 2008, BHARDWAJ & AGRAWAL, 2014). Diferentes trabalhos descrevem a importância dos metabólitos derivados de plantas e/ou micro-organismos no tratamento de diversas doenças de interesse humano, animal e vegetal. De acordo com Newman (2012), 60 e 75% dos novos medicamentos de combate ao câncer e doenças infecciosas, respectivamente, foram provenientes de produtos naturais entre os anos de 1981 a 2010; e ressaltam o grande avanço no número de registros de novas farmacos produzidos a partir de moléculas obtidas de micro-organismos ou por seus hospedeiros vegetais.

Plantas endêmicas presentes em ecossistemas com elevada biodiversidade, espécies que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns ou mesmo aquelas com longevidade incomum são consideradas bons alvos para busca de endofíticos produtores de substâncias com propriedades terapêuticas (STROBEL, 2003). De acordo com Silveira et al. (2016), os Campos Rupestres podem ser a mais antiga vegetação aberta do leste da América do Sul, representando um bioma *hotspot* com mais de 5.000 espécies vegetais, quase 15% da diversidade vegetal do Brasil, mas em uma área correspondente a 0,78% da superfície. *Vellozia gigantea* N.L. Menezes & Mello-Silva, uma monocotiledônea

recentemente descrita e endêmica desta região (MELLO-SILVA & MENEZES, 1999), é de acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008) uma espécie considerada rara. Esta espécie apresenta adaptações às condições climáticas altamente variáveis do local, como intensa radiação solar e escassez de água. De acordo com Ribeiro (2009),  
5 além de apresentarem tais adaptações para superar as adversidades climáticas, espécies de *Vellozia*, incluindo *V. gigantea*, também possuem como estratégia de sobrevivência o “investimento” em longevidade, uma vez que estas espécies apresentam dificuldades de estabelecimento. Tais características tornaram a *V. gigantea* um alvo promissor para o desenvolvimento deste estudo, em busca do conhecimento da biodiversidade da  
10 comunidade fúngica endofítica e do potencial biotecnológico de tal comunidade e dos tecidos vegetais. Desta forma, o presente trabalho visou responder as seguintes perguntas:

1. Qual a composição e diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a diferentes espécimes selvagens de *V. gigantea*?
- 15 2. Espécies da comunidade de fungos endofíticos associados a *V. gigantea* são boas fontes de metabólitos secundários protótipos úteis para o desenvolvimento de novas fármacos e pesticidas?
3. Os tecidos de *V. gigantea* são fonte de substâncias bioativas? Se sim, estas substâncias e/ou suas derivações são também produzidas por seus fungos  
20 endofíticos?

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Micro-organismos endofíticos

Atualmente, os endófitos têm sido referidos como qualquer micro-organismo que possa ser isolado a partir de tecidos de uma planta assintomática (HARDOIM et al. 2015; COMPANT et al., 2016). Segundo Hardoim e colaboradores (2015), esta definição inclui micro-organismos que apresentam uma relação neutra, comensal ou benéfica, bem como sapróbios dormentes e agentes patogênicos durante a fase latente de seu ciclo de vida. Estes micro-organismos desenvolvem uma associação íntima com suas plantas hospedeiras, estabelecendo uma comunidade microbiana dentro da endosfera vegetal, podendo ser encontrada em seus diversos tecidos.

Evidências dessa associação entre micro-organismo e planta parecem ser antigas e já foram encontradas em tecidos fossilizados de folhas e caules, o que sugere que a interação entre endófito-planta pode ter evoluído a partir do momento que as plantas surgiram pela primeira vez na Terra (REDECKER et al., 2000). A existência de fungos assintomáticos residindo em tecidos vegetais é conhecida desde o final do século XIX e o termo “endófito” foi proposto pela primeira vez em 1866 (de Bary, 1866). De acordo com Strobel e colaboradores (2004), todos os vegetais estudados até o momento apresentaram micro-organismos endofíticos em seus tecidos. Tais micro-organismos se alojam geralmente nas partes aéreas das plantas como caules e folhas, sendo que a colonização destas partes é normalmente confinada a células individuais ou localizada, enquanto nas raízes a colonização é usualmente extensa (TAN & ZOU, 2001; SCHULZ & BOYLE, 2005).

Os micro-organismos endofíticos têm sido utilizados para o controle biológico de pragas, doenças de plantas e produção de enzimas, vitaminas, antibióticos e antitumorais. No Brasil, por exemplo, os estudos atuais estão voltados para a caracterização dessa comunidade microbiana e investigação de suas aplicações biotecnológicas (AZEVEDO, 2014). Muitas espécies de endofíticos possuem o potencial de sintetizar diferentes metabólitos bioativos, os quais podem ser direta ou indiretamente utilizados como agentes terapêuticos no tratamento de diversas doenças (STROBEL, 2004, ALY et al., 2011; KUSARI, 2012). A produção de metabólitos bioativos por endófitos, em especial aqueles produzidos por suas plantas hospedeiras, não só é importante pela perspectiva de um estudo ecológico, mas também do ponto de vista bioquímico e molecular (KUSARI,

2012). Desta forma, os estudos atuais com endófitos visam uma melhor compreensão da ecologia e evolução desses micro-organismos, seu impacto no ecossistema e na composição das comunidades vegetais e sua utilização na busca de novos produtos naturais (ALY et al., 2011).

5

## **2.2 Fungos endofíticos: interação micro-organismo/planta hospedeira**

A comunidade vegetal é considerada hospedeira de um diversificado conjunto de endófitos simbióticos, incluindo micorrizas, bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos endofíticos (ASCHEHOUG et al., 2014). Estes simbióticos podem desempenhar diferentes efeitos na ecologia da planta, no seu estado saudável e em sua evolução (BRUNDRERT, 2006). De acordo com Aschehoug e colaboradores (2014) evidências tem se acumulado rapidamente demonstrando a onipresença dos fungos endofíticos em todas as plantas e seus benefícios mutualísticos. No entanto, de acordo com Compant e colaboradores (2016) apesar da realização de extensivos estudos a respeito da comunidade endofítica, essa interação estabelecida entre endófitos e seus hospedeiros é, contudo ainda mal compreendida. Os mecanismos subjacentes dessas interações, como por exemplo a influência de fatores ambientais, genéticos e fenológicos que aparentemente podem determinar o estabelecimento das específicas associações de comunidades microbianas encontradas nos diferentes tecidos vegetais, são alguns pontos interessante que estão atualmente em estudo.

O estabelecimento da interação fungo/planta pode ser moldado por fatores como modo de transmissão, padrão de infecção, idade da planta, fatores ambientais, além de propriedades genéticas (SAIKKONEN et al., 1998; ALY et al., 2011). Alguns estudos têm demonstrado que fungos transmitidos verticalmente (forma sistêmica) tendem a desenvolver uma relação mutualística com seus hospedeiros, enquanto, aqueles transmitidos horizontalmente (forma não sistêmica) são mais propensos a apresentarem uma relação antagonista (SAIKKONEN et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2009). A especificidade com o hospedeiro requer uma estreita adaptação entre a planta e o endófito, sugerindo uma influência mútua decorrente de uma coabitação e coevolução desenvolvida durante milhares de anos (KUSARI et al., 2012). De acordo com Moricca & Ragazzi (2008), com o decorrer do tempo, essa associação tornou-se, permanentemente, gravada na constituição genética de ambos, que passaram a desenvolver sistemas genéticos complementares.

Embora a base genética da relação simbiótica entre endófitos e plantas hospedeiras ainda não seja bem compreendida, estudos visando analisar a relação entre o genótipo do hospedeiro e o tipo de simbiose estabelecida revelou que algumas espécies de fungos podem desenvolver relações parasitárias ou mutualísticas, dependendo do genótipo do hospedeiro colonizado (UNTERSEHER & SCHNITTLER 2010; ALY et al., 2011).  
5 Desta maneira, a relação endófito/planta pode ser considerada uma relação flexível, cuja direção pode ser determinada por pequenas diferenças na expressão gênica fúngica, em resposta ao hospedeiro, ou diferenças na expressão gênica da planta em resposta a colonização fúngica (ALY et al., 2011).

10 Apesar da natureza assintomática da colonização de um endófito poder induzir à classificação de um relacionamento mutualístico, considera-se ainda a hipótese de que, em função da enorme diversidade existente, estes micro-organismos possam ser sapróbios ou patógenos oportunistas (STROBEL & DAISY, 2003). O fato de alguns fitopatógenos serem de origem endofítica reforça essa hipótese, na medida em que tais micro-  
15 organismos são capazes de causar infecções sintomáticas na planta quando esta se encontra submetida a condições de estresse ou idade avançada (TAN & ZOU, 2001; FIRÁKOVÁ et al., 2007). Segundo Schulz & Boyle (2005), fungos que são oportunistas acidentais podem ser normalmente encontrados em outros substratos e não são especificamente adaptados aos seus hospedeiros, tais como algumas espécies coprófilas  
20 detectadas nos tecidos vegetais.

Relações simbióticas requerem um sofisticado balanço entre as respostas de defesa da planta e a demanda de nutrientes pelo endofítico. Segundo Kogel (2006), interação mutualística não significa ausência de defesa da planta. Os fungos endofíticos representam um grupo altamente diversificado que podem desempenhar grande impacto  
25 sobre as comunidades vegetais (RODRIGUEZ et al., 2009). De acordo com Higgins e colaboradores (2014) existe uma carência de estudos das funções ecológicas destes endófitos, em parte, por causa da dificuldade em avaliar o papel de cada indivíduo no contexto de uma comunidade fúngica que compreende centenas de espécies de endofíticos em uma única planta hospedeira. No entanto, alguns trabalhos têm  
30 demonstrado importantes interações entre endófitos e suas plantas hospedeiras, tais como aumento da tolerância ao estresse biótico e abiótico; aumento de biomassa e diminuição do consumo de água (RODRIGUEZ et al., 2009); redução no herbivorismo e ataque de insetos (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996); e resistência a ataque de patógenos. A



proteção contra herbívoros pode ocorrer por meio de metabólitos secundários produzidos pelos fungos, tais como a peramina e lolina (atividade inseticida) e lolitrem B e ergovalina (atividade citotóxica) (ALEXOPOULOS et al., 1996; SCHULZ & BOYLE, 2005).

5 Alguns estudos sugerem que a proteção contra estresse oxidativo pode ser relacionado com o aumento da produção de metabólitos antioxidantes (flavonóides e compostos fenólicos) em plantas colonizadas por endófitos (TORRES et al. 2009), a qual é desencadeada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelo fungo. A ERO é produzida para oxidar e desnaturar as membranas celulares do hospedeiro, facilitando assim a saída de nutrientes da célula vegetal e consequente captação pelas hifas fúngicas  
10 (WHITE & TORRES, 2010).

A tolerância ao estresse conferida por alguns fungos tem sido demonstrada com um fenômeno de adaptação ao ambiente. O fungo *Curvularia protuberata* foi encontrado como espécie endofítica dominante na planta *Dichanthelium lanuginosum* e confere a planta aumento da tolerância ao calor e possibilitando seu crescimento em solos  
15 geotérmicos do Parque Nacional do Yellowstone, nos Estados Unidos da América (EUA) (REDMAN et al. 2002). *Leymus mollis*, uma planta presente na região costeira de Puget Sound, Washington, EUA, é colonizada pelo fungo *Fusarium culmorum*, o qual foi relatado como responsável pela tolerância da planta as condições salinas da região. Estudos comparando isolados de *F. culmorum* associados a plantas costeiras e não  
20 costeiras demonstraram que apenas os isolados de plantas costeiras foram capazes de conferir tolerância ao sal (RODRIGUEZ et al., 2008).

Alguns estudos também demonstraram que os endófitos são capazes de proporcionar a planta vantagens competitivas nas taxas de crescimento e germinação por meio da interação nas vias bioquímicas, estimulando a produção de hormônios do  
25 crescimento, como o ácido indol-3-acético, ácido indol-3-acetonitrato e citocininas ou aumentando a absorção de nutrientes pela planta (ZHANG et al., 2006; HARTLEY & GANGE, 2009). De acordo com Weyens e colaboradores (2009), endófitos que possuem vias adequadas de degradação ou acumulação de metais são capazes de promover a planta hospedeira aumento da tolerância a metais pesados, auxiliando-as a sobreviver em solos  
30 contaminados.

Na associação estabelecida entre endófitos e plantas, os fungos beneficiam-se por receber nutrição e proteção contra dessecação (TAN & ZOU, 2001). A planta hospedeira também pode fornecer metabólitos que são essenciais para a conclusão do ciclo de vida

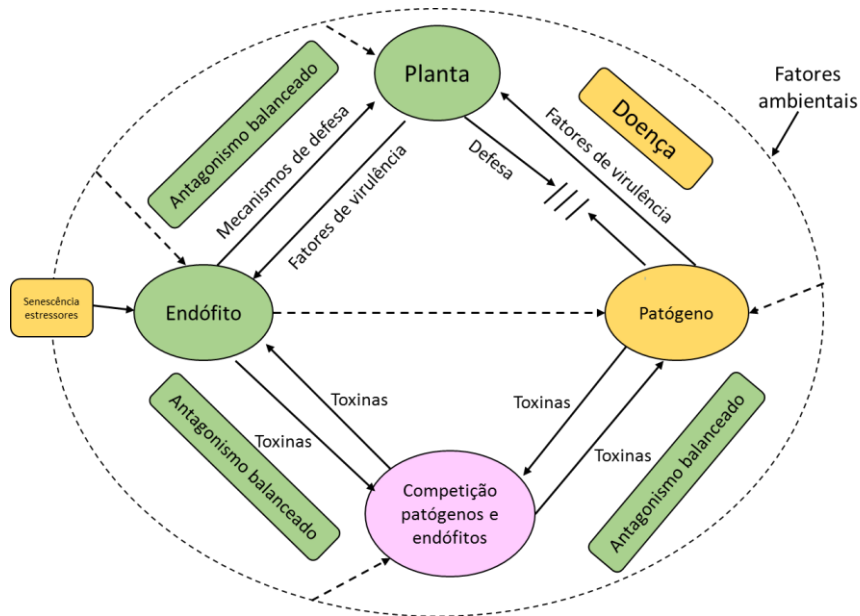
do endófito ou para o seu crescimento ou autodefesa (METZ et al., 2000; STROBEL, 2002). Além disso, o conhecimento do papel dos metabólitos secundários na interação endófito-hospedeiro é fundamental para o entendimento de como o fungo endofítico é capaz de desenvolver dentro da planta hospedeira sem causar sintomas visíveis de doença (SCHULZ et al., 1999).

A relação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira é bem complexa, envolvendo interações entre as espécies endofíticas e também a influência de fatores bióticos e abióticos. De acordo com Schulz & Boyle (2005), a colonização assintomática de um tecido ou órgão vegetal por um endófito resultaria de uma relação antagônica balanceada, onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do micro-organismo e as respostas de defesa do hospedeiro.

A hipótese do antagonismo balanceado foi inicialmente proposta para demonstrar como um endófito poderia evitar a ativação dos mecanismos de defesas do hospedeiro, garantindo assim a sua auto-resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro, bem como apresentar crescimento no tecido vegetal sem causar manifestações visíveis de infecção ou doença (SCHULZ & BOYLE, 2006). De acordo com Kusari et al., (2012), esta hipótese propõe que a colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismos entre o endófito e o hospedeiro. Endófitos e patógenos possuem muitos fatores de virulência que são neutralizados pelos mecanismos de defesa da planta. De acordo com Schulz & Boyle (2006) e Kusari e colaboradores (2012), (i) se a virulência do fungo e as estratégias de defesa da planta são equilibradas, a associação permanece aparentemente assintomática; esta fase é apenas um período transitório onde fatores ambientais desempenham um papel importante para desestabilizar o delicado equilíbrio estabelecido; (ii) se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência do fungo, o mesmo pode morrer; inversamente, se a planta sucumbir à virulência do fungo, o relacionamento planta/patógeno pode levar a planta à doença. A variabilidade dessa interação dependeria não só da adaptação do micro-organismo endofítico a um determinado hospedeiro ou órgão em particular, mas como também de fatores como a virulência inata do endófito, a resposta de defesa da planta e as condições ambientais. No entanto, estudo realizado por Schulz e colaboradores (2015) demonstram que além disso, para que os fungos endofíticos sejam capazes de crescer e sobreviver, estes devem manter um antagonismo balanceado não apenas com a planta hospedeira, mas também com a microbiota competidora, seja endofítica ou

patógena. Desta forma, os metabólitos secundários desempenham importante papel na manutenção deste equilíbrio, resultando em uma simbiose compatível e uma planta saudável (Figura 1). Porém, ainda se faz necessário a realização de outros estudos para elucidar as vias metabólicas e as funções de sinalização envolvidas nessas interações.

5



**Figura 8.** Hipótese do antagonismo balanceado proposto por Schulz e colaboradores (2015).

### 2.3 Diversidade de fungos endofíticos

A avaliação da diversidade microbiana representa um grande desafio para a microbiologia moderna devido ao grande número de espécies já conhecidas ou estimada (GAMBOA et al., 2002; ALY et al., 2011). Em contrastes com os outros grupos de seres vivos, os micro-organismos ocupam virtualmente todos os nichos da Terra (GUNATILAKA, 2006). Diferentes estudos demonstram que os tecidos vegetais representam um promissor reservatório de diversidade microbiana. Levando em consideração que existam cerca de 300 mil espécies de plantas em todo mundo e cada hospedeiro pode abrigar um ou mais micro-organismos endofíticos, tal fato torna os tecidos vegetais um ambiente/substrato propício à realização de estudos de biodiversidade. Contudo, a composição e a frequência destes micro-organismos podem ser significativamente afetadas por fatores como: a espécie do vegetal e sua distribuição geográfica, umidade relativa do ambiente, posição relativa da planta (sua altura em

relação ao solo), idade e parte da planta, entre outros fatores (SAIKKONEM et al., 1998; STROBEL, 2003; SIEBER, 2007; ALY et al., 2011).

De acordo com Aime & Brearley (2012), as comunidades de fungos endofíticos são divididas em dois grupos básicos; (1) generalistas (que são encontrados em abundância e em diferentes espécies de plantas) e os (2) especialistas (que são encontrados em baixa frequência e em hospedeiros vegetais específicos). Plantas de ecossistemas tropicais podem abrigar comunidades altamente diversificadas de fungos endofíticos (DREYFUSS & CHAPELA, 1994; AIME & BREARLEY, 2012). Esta grande diversidade de fungos em florestas tropicais está associada à presença de uma população altamente diversificada de angiospermas. Um grande número de espécies fúngicas tem sido descrita em associação com espécies de plantas na Ásia, Austrália, África, América Central e América do Sul, México e algumas ilhas do Pacífico e Atlântico (AIME & BREARLEY, 2012). Rodriguez et al. (2009) classificam ainda os fungos endofíticos em dois grandes grupos, refletindo suas diferenças nas relações evolutivas, taxonômicas, planta hospedeira e função ecológica:

- (1) Os clavicipitaceos endofíticos (C-endofíticos), os quais colonizam algumas espécies gramíneas;
- (2) Os não-clavicipitaceos (NC-endofíticos), os quais podem ser encontrados assintomaticamente nos tecidos de plantas avasculares, vasculares sem semente, gimnospermas e angiospermas.

Os NC-endofíticos são fungos diversificados que se dividem em pelo menos 3 grupos funcionais distintos, baseado nas características de colonização do hospedeiro, mecanismos de transmissão entre gerações, biodiversidades e papel ecológico. Os C-endofíticos pertencem à família *Clavicipitaceae* (*Hypocreales*; Ascomycota) e incluem muitas espécies conhecidas pela produção de moléculas bioativas (principalmente dos gêneros, *Cordyceps*, *Balansia*, *Epichloë/Neotyphodium*, *Claviceps* e *Myriogenospora*). Em contraste, os endófitos N-clavicipitaceos representam um grupo com diferentes espécies de Ascomycota e Basidiomycota que até o momento não foram bem definidos taxonomicamente; as quais pertencem aos gêneros *Alternaria*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinellus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete* e *Phoma* (RODRIGUEZ et al., 2009). Espécies pertencentes a estes dois grupos de endófitos associadas a plantas de ecossistemas tropicais foram

investigadas quanto à capacidade de produzir diversas moléculas bioativas (SCHULZ & BOYLE, 2005; RODRIGUEZ et al., 2009).

A metodologia comumente utilizada para a detecção e quantificação dos fungos endofíticos é realizada por meio do isolamento de superfícies desinfestadas de tecidos das plantas hospedeiras (STONE et al., 2000). A maior limitação destes estudos baseados em métodos dependentes de cultivo é o rápido crescimento das espécies ubíquas, o que representa um parâmetro competitivo em relação às espécies raras que podem permanecer desconhecidas (SUN et al., 2011). Como alternativa para minimizar tais problemas tem-se realizado estudos de metagenômica, o qual consiste no isolamento de DNA proveniente de amostras ambientais e posterior fragmentação e inserção deste DNA em vetores bacterianos adequados e subsequente transformação e *screening* das células recombinantes para sequenciamento e identificação dos genes de interesse (CERRADOS, 2010). Tal técnica tem permitido um avanço no conhecimento das unidades taxonômicas e identificação exata de morfotipos incapazes de produzir estruturas de reprodução e fungos não cultiváveis.

Diferentes estudos de taxonomia de fungos endofíticos vêm sendo realizados por meio do sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. O uso da região ITS oferece vantagens, sendo que a principal delas é sua fácil amplificação entre todos os grupos fúngicos, utilizando-se iniciadores universais e a ampla disponibilidade de informações em bancos de dados (NILSSON et al., 2008, GAZIS et al., 2011). De acordo com o levantamento de dados realizado por Haroim e colaboradores (2015) há aproximadamente 8.500 sequências de fungos endofíticos depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), os quais foram identificados utilizando-se a região ITS, sendo representados pelos filos *Glomeromycota* (40%), *Ascomycota* (31%), *Basidiomycota* (20%), filo não identificado (8%), e, em menor grau, *Zygomycota* (0,1%).

No entanto, a utilização desta região também possui desvantagens, como por exemplo, o grande intervalo de variações intraespecíficas relatado na literatura (LIECKFELDT & SEIFERT, 2000; NILSSON et al., 2008). Na tentativa de padronizar a delimitação das espécies de endofíticos, muitos pesquisadores propuseram o uso de uma porcentagem de similaridade entre as sequências de espécies próximas. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que somente esta região não é suficiente para delimitação da diversidade de fungos endofíticos, especialmente dentro de gêneros que evoluem

rapidamente, grupos muito diversificados ou complexos de espécies (GAZIS et al., 2011). Para evitar identificações duvidosas, Avise & Ball (1990) propuseram o sequenciamento de mais de uma região do genoma. De acordo com Glass & Donaldson (1995), os critérios para seleção das regiões geralmente são genes não codificantes (exemplo, ITS1 e ITS2), genes codificantes com baixa taxa de evolução (28S, 5.8S e 18S), genes codificantes com moderada taxa de evolução [Actina (Act), Fator de Elongação (EF-1 $\alpha$ ), Histona (Hist H3), Beta-tubulina ( $\beta$ -Tub) e Calmodulina (Calm)] ou até mesmo uma região de elevado polimorfismo, como a subunidade menor mitocondrial do rDNA.

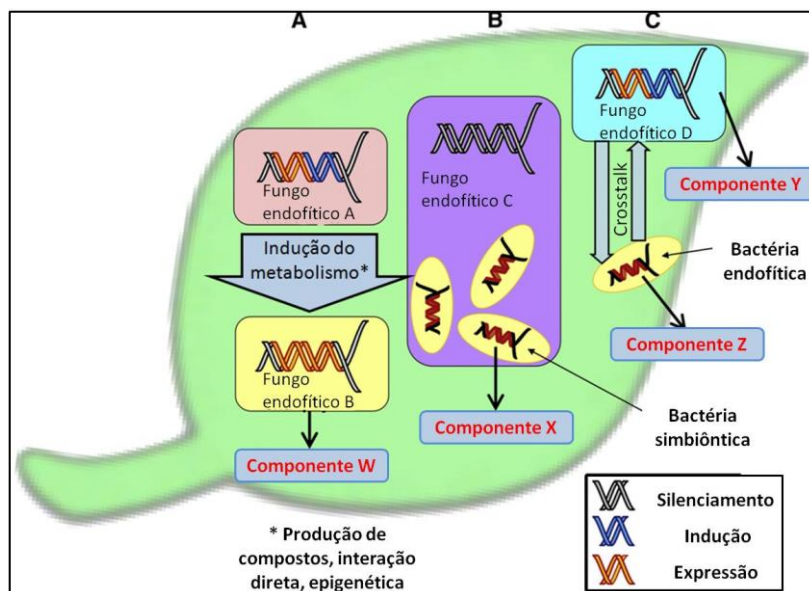
Diferentes autores relatam que é possível encontrar maior diversidade de micro-organismos endofíticos, em especial os fungos, em plantas endêmicas de regiões tropicais (ARNOLD et al., 2000; TAN & ZOU, 2001; STROBEL et al., 2004, FERRARA, 2006). Em função disto, uma elevada diversidade de micro-organismos endofíticos ainda não foi isolada e estudada, principalmente quando se considera a enorme diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas tropicais. Tal fato reforça a necessidade de trabalhos que contribuam para o conhecimento da micota endofítica associada a plantas presentes nestas regiões.

#### **2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos**

O percentual de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos é bem mais elevado em comparação com outros grupos de micro-organismos endofíticos, o que pode ser devido, em parte, a alta frequência de isolamento de fungos endofíticos em relação aos demais micro-organismos (RADIC & STRUKELJ, 2012). Estudos recentes têm mostrado centenas de novos produtos naturais tais como alcalóides, flavonóides, terpenóides e esteróides produzidos por fungos endofíticos. Estes metabólitos vêm sendo relatados por suas atividades antimicrobianas, antitumorais, imunossupressores, antioxidante, antiparasitária e no controle de pragas (JOSEPH & PRIYA, 2011). Levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela de endófitos foi estudada até o momento, vários grupos de pesquisa têm sido motivados a tentar avaliar e elucidar o potencial destes micro-organismos na sua aplicação biotecnológica focando na produção de metabólitos bioativos (JOSEPH & PRIYA, 2011).

Produtos naturais (PN) ou metabólitos secundários são definidos como substâncias de baixo peso molecular que a princípio são dispensáveis para a sobrevivência e desenvolvimento do organismo, os quais são continuamente modificados e adaptados

às contínuas mudanças por pressão seletiva ambiental. Os PNs são extremamente variáveis quanto à estrutura e incluem antibióticos, toxinas, alcalóides e fatores de crescimento para a planta (DEMAIN, 1981). De acordo com Kusari et al. (2012) a produção destes metabólitos secundários é altamente influenciada pela interação do endófito com a planta hospedeira. Além desta interação, Kusari et al. (2012) sugere que se deve levar em consideração que a planta é colonizada por elevada diversidade de micro-organismos endófitos e que estes interagem entre si direta ou indiretamente (fungo/fungo, fungo/bactéria, bactéria/bactéria) e que tais interações microbianas desempenham um importante papel na produção de metabólitos secundários pelos endófitos (Figura 2).



**Figura 9.** Representação esquemática de interação interespecífica endófito – endófito. (A) Interação fungo – fungo. (B) Interação fungo – bactéria endossimbiote. (C) Interação fungo – bactéria (KUSARI et al., 2012).

15

Estes metabólitos secundários são importantes na interação entre a planta e o endófito, podendo agir em processos de sinalização, defesa e regulação da simbiose (SCHULZ & BOYLE, 2005; KUSARI et al., 2012). Uma vez que os fungos endofíticos permanecem em constante interação com seu hospedeiro e outros endófitos, ocupando nichos ecológicos únicos e crescendo em diferentes ecossistemas, estes micro-organismos tornam-se capazes de produzir vários metabólitos com diversas aplicações biotecnológicas (KUSARI et al., 2012). Os fungos endofíticos podem ser considerados

20

uma fonte promissora de metabólitos bioativos, uma vez que dentre os 20 medicamentos mais comumente descritos seis são de origem fúngica (KUSARI et al., 2012).

Apesar da variedade de substâncias terapêuticas derivadas de fungos, esta é ainda uma área com enorme potencial a ser explorado, visto que estimativas sugerem a  
5 existência de aproximadamente 3,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos, dos quais somente cerca de 100 mil já foram descritos até o momento (BLACKWELL, 2011). Estudos realizados por Bills et al. (2002) demonstraram que endofíticos de regiões tropicais produzem mais metabólitos ativos quando comparados àqueles presentes em  
10 outras regiões. Ainda de acordo com este autor, 51% das substâncias bioativas isoladas a partir de fungos endofíticos eram até então desconhecidas. Muitas espécies de endofíticos podem ser frequentemente isoladas de uma planta hospedeira, contudo, somente alguns isolados são capazes de produzir altos índices de moléculas com atividade biológica (ZHAO et al., 2010). Alguns trabalhos mostram ainda que a porcentagem de isolados de fungos endofíticos produtores de substâncias com atividades biológicas pode ser, em  
15 alguns casos, superior a 30% (HUANG et al., 2001; WANG et al., 2006).

Strobel & Daisy (2003) relatam que é grande a necessidade de pesquisa por novos antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicos que sejam altamente eficientes, possuam baixa toxicidade e tenham um menor impacto ambiental. Esta busca é  
20 direcionada pelo desenvolvimento de resistência em infecções causadas por microorganismos, doenças como AIDS e outros fatores que enfraquecem o sistema imune, como câncer e transplantes de órgãos. De acordo com Strobel (2003) e Strobel et al. (2004), ao selecionar as plantas para realizar o isolamento e identificação dos microorganismos endofíticos algumas estratégias têm sido empregadas, tais como:

- 25 (1) plantas endêmicas de determinadas regiões que apresentam longevidade incomum;
- (2) a escolha de plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns;
- (3) plantas cujo desenvolvimento se dá em áreas de grande biodiversidade, tal como em florestas temperadas e tropicais;
- 30 (4) plantas que apresentam um histórico etnobotânico, ou seja, que são tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos indígenas, grupos étnicos e pela população de um modo geral. Estas plantas vêm sendo escolhidas a partir de relatos da literatura e por meio do contato direto estabelecido com a população que as utiliza.



De acordo com Arnold et al. (2000) e Ferrara (2006), 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 ou pela planta em resposta a uma infecção. Como exemplo, as plantas pertencentes ao gênero *Sinopodophyllum* são utilizadas na medicina popular devido à sua ação antitumoral, antioxidante, antiviral, antibacteriana, imunossupressora e antirreumática. As propriedades atribuídas às plantas deste gênero estão relacionadas à produção de Podofilotoxina (PDT). Yang et al. (2003) relataram pela primeira vez que fungos endofíticos obtidos a partir de *Sinopodophyllum hexandrum* com capacidade de produzir Podofilotoxina e seus análogos. Dentre as principais atividades apresentados pelos metabólitos fúngicos estão:

- (a) Atividade antimicrobiana: Diversos compostos com atividade antimicrobiana têm sido isolados a partir de fungos endofíticos. Estes compostos encontram-se distribuídos em vários grupos químicos, tais como alcaloides, peptídeos, esteroides, terpenóides, fenóis, quinonas e flavonoides. Alguns exemplos de compostos que desempenham tal atividade são: criptocandina, criptocina, ecomicinas, pseudomicinas, pestalósido e pestalopirona (YU et al,2010; BANO et al., 2016).
- (b) Atividade anticâncer: Os compostos geralmente secretados por fungos endofíticos são de natureza citotóxica. Até o presente momento cerca de 50 diferentes espécies fúngicas tem sido indetificadas como produtores de cerca de 100 compostos antitumorais. Aproximadamente cerca de 19 diferentes classes químicas de metabólitos secundários fúngicos tem sido relatado com propriedades anticâncer. Sendo que 57% dos metabólitos identificados são descritos como novos compostos (BANO et al., 2016).
- (c) Agentes antioxidantes: Os compostos que contêm atividade antioxidante são altamente efetivos aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres, o que aumenta a diversidade de efeitos patológicos, mudanças no DNA levando a carcinogênese, bem como a degeneração celular (ALY et al., 2008). Os antioxidantes têm sido utilizados como uma terapia promissora para a prevenção, bem como para o tratamento de doenças ligadas a EROs como cancro, doença cardiovascular, aterosclerose, lesão por isquemia/reperfusão hipertensiva,

diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, artrite reumatóide e também envelhecimento. Fungos endofíticos associados às plantas vasculares surgem como uma boa fonte de novos antioxidantes (BANO et al., 2016). Petasina e isopestacina são compostos que desempenham importante atividade antioxidante, além de apresentarem atividades antifúngicas (HUANG et al., 2007).

(d) Atividade antiparasitária: Diversos estudos em busca de novos antiparasitários têm sido direcionados para a busca de potenciais antimaláricos. A malária, doença causado por protozoários do gênero *Plasmodium*, tem sido uma preocupação durante muitos séculos. Os endofíticos têm demonstrado enorme potencial antimalárico, sendo considerados uma fonte promissora de novos compostos e gerando novas perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos (KAUL et al., 2012). São exemplos de novos compostos descritos com atividade antimalárica: Phomoxanthonos A e B (C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>O<sub>16</sub>) (ISAKA et al. 2001); 11-hydroxymonocerin (C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>), um novo análogo de monocerina (SAPPAPAN et al. 2008); xylariaquinona A (TANSUWAN et al., 2007).

Desta forma, os fungos endofíticos representam uma fonte promissora de metabólitos biologicamente ativos com possíveis aplicações biotecnológicas. Assim, estudos de bioprospecção representam uma boa oportunidade para descoberta de novos metabólitos bioativos que podem ser utilizados como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas de interesse (ALY et al., 2011).

## **2.5 *Vellozia gigantea* N.L. Menezes & Mello-Silva (*Velloziaceae*)**

Os Campos Rupestres apresentam uma distribuição descontínua, geralmente restrita aos topos de montanhas e são mundialmente conhecidos como centros de diversidades e endemismo de plantas (JACOBI & do CARMO, 2008). No Brasil, os Campos Rupestres são considerados centros de diversidade de famílias como *Eriocaulaceae*, *Xyridaceae* e *Velloziaceae* com aproximadamente 90% das suas espécies endêmicas dessa região (GIULIETTI et al., 2005). A família *Velloziaceae* compreendem aproximadamente 250 espécies que são predominantemente neotropicais. A maioria da diversidade e endemismo dentro desta família ocorre nas montanhas do Brasil, especialmente nos Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço (MENEZES et al. 1994). *Vellozia*, com aproximadamente 105 espécies, é o maior gênero da família. As espécies desse gênero

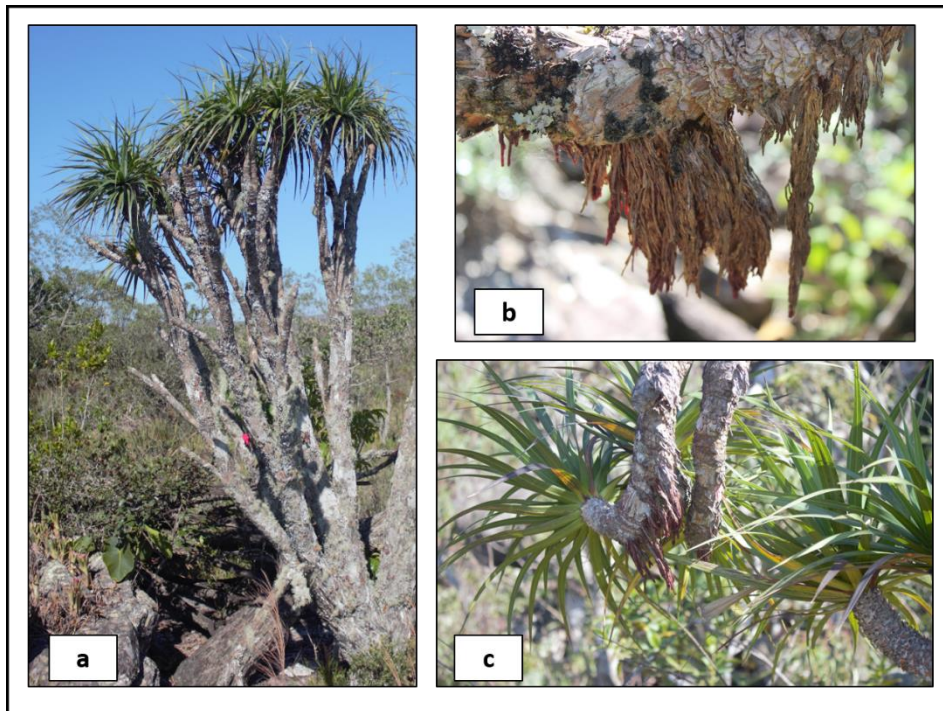
são conhecidas localmente como canela-de-ema e comuns em Campos Rupestres (GIULIETTI & PIRANI, 1988).

Plantas encontradas em ambientes xéricos, como os Campos Rupestres apresentam adaptações às condições climáticas altamente variáveis, como intensa radiação solar e escassez de água. Espécies de *Vellozia* possuem adaptações foliares para minimizar a perda de água, como mecanismos de regulação da transpiração e deslocamento dos estômatos para a porção abaxial das folhas (AYENSU, 1973). Ainda de acordo com Ayensu (1973), a bainha de folhas mortas, que recobre o caule, auxilia na manutenção de um microclima ideal, as raízes adventícias são extremamente úmidas e acumulam pingos de água, mesmo que a planta esteja crescendo um habitat seco. De acordo com Ribeiro (2009), além de apresentarem mecanismos para superar as adversidades climáticas, espécies de *Vellozia* também possuem como estratégia de sobrevivência o “investimento” em longevidade, uma vez que estas espécies apresentam dificuldades de estabelecimento (fixação e germinação). As velloziáceas são caracterizadas por possuírem um crescimento muito lento.

*Vellozia gigantea* N.L. Menezes & Mello-Silva, popularmente conhecida como canela-de-ema gigante, é uma monocotiledônea recentemente descrita (MELLO-SILVA & MENEZES, 1999). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008), *V. gigantea* é uma espécie endêmica e considerada rara. Sua distribuição geográfica é restrita e considerada endêmica dos Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço, Sudeste do Brasil. Das 9 populações conhecidas, 8 ocorrem predominantemente dentro do Parque Nacional da Serra do Cipó e da Área de Proteção Ambiental Morro da Pedreira e 1 fora de áreas protegidas, na Serra do Lobo - município de Itabira, em Minas Gerais. Esta região tem sido perturbada por recorrentes incêndios com a pecuária e urbanização (LOUSADA et al., 2011). Mello-Silva & Menezes (1999), destaca ainda que *V. gigantea* apresenta o ciclo de floração irregular e o recrutamento de novos indivíduos parece ser limitado, no entanto, é possível observar florações em massa induzidas por incêndios.

*Vellozia gigantea* cresce cerca de 1 m a cada século, podendo atingir até 6 m de altura (Figura 3). Estas espécies são consideradas fósseis vivos, podendo ser encontrados exemplares com mais de 1.000 anos de idade (RIBEIRO, 2009). Entretanto, pouco se conhece a respeito da história e a biologia de *V. gigantea*, tendo sido realizado apenas estudos a respeito de sua germinação de sementes, caracterização genética de populações

e produção de vitamina E pelas suas folhas foram realizados até o presente momento. (GARCIA & DINIZ, 2003; LOUSADA et al., 2011, MORALES et al., 2014).



**Figura 10.** Espécime de *Vellozia gigantea*. (a) Indivíduo adulto, (b) raiz adventícia, (c) 5 folhas.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade de fungos endofíticos associados à *Vellozia gigantea*, bem como as substâncias bioativas produzidas pelos fungos e tecidos da planta hospedeira.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter fungos endofíticos de amostras de folhas e raízes de espécimes de *V. gigantea* presente em seu habitat natural;
- Depositar todos os isolados de fungos endofíticos obtidos na Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais e contribuir para preservação *ex situ* da diversidade de fungos tropicais e montagem de uma coleção temática de fungos tropicais;
- Identificar os fungos obtidos utilizando técnicas taxonômicas moleculares, fisiológicas e morfológicas;
- Caracterizar diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *V. gigantea* utilizando diferentes índices ecológicos;
- Preparar extratos brutos a partir das culturas dos fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras para montagem de uma extratoteca para estudos de bioprospecção;
- Determinar a atividade biológica dos extratos fúngicos e vegetais obtidos contra bactérias e fungos de interesse na clínica e agricultura,
- Caracterizar os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos e planta hospedeira utilizando o fracionamento químico biomonitorado e técnicas cromatográficas.

25

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Área de coleta

As amostras de folhas e raízes de espécimes das populações de *V. gigantea* foram coletadas no Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. A região localiza-  
5 se a 90 km a nordeste de Belo Horizonte, na região sul da Cadeia do Espinhaço (19°14'87"S/43°30'57"W). O clima da região é de tropical de altitude com pluviometria anual média de 1.300 mm e cerca de 300 dias de sol por ano (<http://www.serradocipo.com>).

O acesso a esta área foi realizado respeitando-se as legislações Estaduais e Federais  
10 de acesso à biodiversidade. Todos os espécimes vegetais hospedeiros dos fungos foram identificados a partir de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, e por meio de comparações com exsicatas previamente depositadas no Herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 15 4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Foram coletadas amostras de folhas e raízes de indivíduos aparentemente saudáveis de *V. gigantea*, tendo sido amostrado folhas de 32 exemplares, dentre os quais 18 também tiveram suas raízes amostradas. Não foi possível realizar a coleta de raízes de todos os indivíduos amostrados devido à dificuldade de se encontrar exemplares com  
20 formação de raízes adventícias.

A localização dos indivíduos foi determinada por coordenadas geográficas obtidas pelo *Global Positioning System* (GPS). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas em um prazo inferior a 24 horas. Foram utilizadas três folhas e três raízes de cada indivíduo, sendo que cinco fragmentos de cada folha e de cada raiz  
25 foram plaqueados para isolamento dos fungos endofíticos.

Inicialmente ao processo de desinfestação, as folhas e raízes coletadas foram limpas superficialmente com detergente neutro e enxaguadas abundantemente com água destilada esterilizada. Em seguida, fragmentos foram retirados com auxílio de tesoura e pinças previamente esterilizadas. Fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro  
30 foram desinfestados superficialmente com Extran 2% (1 minuto), álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (3 minutos) e água destilada esterilizada (2 minutos) (CARVALHO et al., 2012). Após este processo de desinfestação superficial,

cinco fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrosado (BDA/Difco) suplementado com 100 mg/mL de cloranfenicol (Sigma), utilizado para inibir o crescimento de bactérias epifíticas contaminantes. Alíquotas da água destilada esterilizada utilizada no processo de desinfestação também foram inoculadas como controle para assegurar que somente os fungos endofíticos foram isolados. As placas foram incubadas a 25 °C por um período de até 60 dias.

Todos os isolados foram transferidos para placas de Petri com BDA para purificação. Os isolados de fungos endofíticos obtidos foram preservados em duplicata, em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967) e em glicerol 15% a -80 °C e depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG.

### **4.3 Identificação dos fungos endofíticos**

#### **4.3.1 Fungos filamentosos**

As colônias dos isolados de fungos filamentosos obtidos a partir das folhas e raízes da *V. gigantea* 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. Posteriormente, os grupos formados por meio das características citadas acima foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)<sub>5</sub>. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo.

Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rDNA. As identificações dos grupos foram posteriormente confirmadas por meio do sequenciamento parcial do gene da  $\beta$ -Tubulina e/ou da RNA Polimerase II. O sequenciamento parcial do gene da  $\beta$ -tubulina produz um fragmento de aproximadamente 540 pb e possui alto índice de polimorfismo entre diferentes fungos filamentosos do filo *Ascomycota*, o que reflete a variabilidade do número de íntrons presente neste gene (GLASS & DONALDSON, 1995). O gene da RNA Polimerase II (RPB2) codifica a segunda proteína da subunidade maior. Este gene se apresenta como cópia única em fungos e trata-se de região bem conservada (MALKUS et al., 2006). A escolha da região a ser sequenciada esta sendo

determinada de acordo com os gêneros encontrados por meio do sequenciamento da região ITS.

#### **4.3.1.1 Extração do DNA Total**

5 A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa e colaboradores (2009), sendo o DNA extraído a partir de micélio produzido em 5 mL de meio extrato de malte líquido 2%. Os micélios foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio

10 dodecil sulfato 1%) e deixado a – 20 °C por aproximadamente 10 minutos. Foram adicionadas em cada tubo três esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro) e posteriormente submetidos a trituração no equipamento Bullet Blender TM 24 (Uniscience). Após esta etapa foram acrescentados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 40 minutos

15 a 65 °C. Posteriormente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 rpm 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 3M. O tubo foi homogeneizado por inversão,

20 incubado a 0 °C por 30 minutos e centrifugado a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck) e a suspensão foi gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por

25 homogeneização com etanol 70% (Merck) p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 60 minutos, e então foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenada em freezer a -20 °C.

#### **30 4.3.1.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>**

O iniciador (GTG)<sub>5</sub> foi utilizado para amplificação de regiões de microssatélite, conforme descrito por Lieckfeldt et al. (1993). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada para um volume final de 25 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando



de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ $\mu$ L), 2,0  $\mu$ L do iniciador (GTG)<sub>5</sub> 10  $\mu$ mol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 2,5  $\mu$ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1,0  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa consiste de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 6 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

#### 4.3.1.3 Amplificação da região ITS

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA, conforme descrito por White et. al. (1990). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L contendo de 1,0 a 5,0  $\mu$ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador ITS1 e ITS4 10  $\mu$ mol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 5,0  $\mu$ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,0  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa consiste 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 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### 4.3.1.4 Amplificação parcial do gene da $\beta$ -tubulina

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) foram utilizados para amplificação parcial do gene da  $\beta$ -tubulina, conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L contendo de 1,0 a 5,0  $\mu$ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador BT2a e BT2b 10  $\mu$ mol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 5,0  $\mu$ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,0  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo Protect - 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. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### 4.3.1.5 Amplificação parcial da RNA Polimerase II

Os iniciadores RPB2 5F (GATGACCGTGGACCACTTCGG) e RPB2 7R (CCCATGGCTTGTTTGCCCAT) foram utilizados para amplificação parcial do gene da RNA polimerase II conforme descrito por Malkus e colaboradores (1999). A PCR foi realizada em um volume final de 50  $\mu$ L contendo de 1,0 a 5,0  $\mu$ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador RPB2 5F e RPB2 7F 10  $\mu$ mol<sup>-1</sup> (MWG Biotech), 5,0  $\mu$ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,0  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo Protect - Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 55 °C e 60 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose

1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5

### 4.3.2 Leveduras

As leveduras foram agrupadas de acordo com os perfis moleculares obtidos por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)<sub>5</sub>. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo. Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores NL1 e NL4. Os isolados que por meio da identificação molecular foram considerados possíveis espécies novas foram submetidas a testes de fermentação, crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, crescimento em diferentes meios complexos e diferentes temperaturas, conforme descrito por Kurtzman et al. (2011).

15

#### 4.3.2.1 Extração do DNA Total

O DNA genômico dos isolados de leveduras foi extraído segundo Sambrook et al. (1986), com modificações. Os isolados foram crescidos em Agar Sabouraud por 24 horas a 25 °C. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 µL Tampão de lise, agitado em vórtex e aquecido a 65 °C por 30 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 200 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizados 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 adicionaram-se 100 µL de isopropanol seguido de centrifugação 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 e dissolvido em 100 µl de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM). Todos os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies) e estocados a -20 °C até sua utilização.

25

30

#### 4.3.2.2 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

Os isolados de leveduras foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando os iniciadores NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG) segundo Lachance et al. (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol<sup>-1</sup>, 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 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 para injeção esterilizada. 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. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

#### 4.3.3 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 47 µL, foram adicionados 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto (Sigma). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 13.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 µL de etanol 70% e realizado homogeneização por inversão. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 20 minutos a 37 °C. O DNA então foi ressuspendido em 10 µL de água para injeção esterilizada. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

#### 4.3.4 Reações de 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  $\mu$ L, em que foram colocados: 1  $\mu$ L do iniciador a (5  $\mu$ mol<sup>-1</sup>), 1  $\mu$ L de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1  $\mu$ L de Big Dye, 1 a 5  $\mu$ L de DNA (de modo que a reação final contenha entre 15 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  $\mu$ L de EDTA a 125 mM, 1  $\mu$ L de acetato de amônio e 50  $\mu$ L de etanol 96% (Merck), em cada poço. A placa foi vortexada 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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

As sequências de DNA dos fungos endofíticos foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos, depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando 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. Os fungos que apresentaram sequências com valor de E = 0, cobertura e identidade  $\geq$ 99%, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente com

sequências de espécies tipo ou referência, utilizando o programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2013), foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequencias com valor de E diferente de 0, e cobertura e identidade  $\leq 98\%$ , os mesmos foram identificados em nível de espécie, gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Para identificação molecular foram utilizadas as sequências  $\geq 350$  pares de bases. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>) e KIRK et al. (2008).

#### **4.4 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos**

##### **4.4.1 Fungos filamentosos e leveduras**

Os fungos filamentosos e as leveduras obtidas foram crescidos em placas de Petri contendo meio BDA a 25 °C com umidade de 70-80%. Para cada isolado obtido foram preparadas 5 placas de Petri a fim de se obter um maior rendimento dos metabólitos produzidos pelos mesmos. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi transferido para frascos de vidro, congelados a -80 °C por 24 horas e posteriormente submetidos ao processo de liofilização (Liofilizador LíoTop - L101). Após a desidratação completa do micélio foi acrescentado 50 mL de diclorometano PA (Vetec). Os frascos foram incubados a temperatura ambiente e após 72 horas, o sobrenadante (fase diclorometânica) de cada frasco foi filtrado com auxílio de papel filtro e transferido para frascos de cintilação.

##### **4.4.2 Folhas e raízes de *Vellozia gigantea***

Folhas e raízes de *V. gigantea* foram liofilizadas por 72 horas e colocadas em erlenmeyers de 50 mL com 35 mL de diclorometano PA (Vetec). Os mesmos foram mantidos ao abrigo da luz e, após 72 horas, o diclorometano (sobrenadante) de cada erlenmeyer foi filtrado e transferido para frascos de vidro. Todos os extratos brutos obtidos, dos fungos filamentosos e dos vegetais, foram secos a temperatura ambiente, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), a uma concentração de 20 mg/mL, e

depositados na Extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do CPqRR/FIOCRUZ e mantidos a -20 °C até utilização nos ensaios biológicos.

## 4.5 Ensaio Biológicos

### 5 4.5.1 Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais foi realizada pelo método de microdiluição em placa de acordo com metodologia descrita no Documento 7.1 *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS-EUCAST 7.1 Rodríguez-Tudela et al. 2003) com as modificações (CARVALHO et al., 2012), o qual é baseado nos procedimentos de referência CLSI M27-A2, com modificações. Este método é de fácil execução, rápido, econômico e adequado para a leitura com leitores de placas de microtitulação, que permite a transferência direta, armazenamento e manipulação de dados com um computador (AFTS-EUCAST 7.1 Rodríguez-Tudela et al. 2003). Além de ser uma metodologia mais vantajosa, por reduzir o tempo de incubação necessário – 24 horas – para obter um crescimento dos alvos, suficiente para a determinação dos valores de CIM, devido à suplementação de 2% de glicose ao meio de cultura sintético utilizado (RPMI 1640 tamponado com MOPS) (STOPPA et al., 2009).

Como micro-organismos alvos foram utilizados as linhagens *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Candida albicans* ATCC 60193, *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) ATCC 6258 e *Cladosporium sphaerosperum* CCT 1740.

#### 4.5.1.1 Padronização dos inóculos

As bactérias testadas foram crescidas em Agar Mueller-Hinton (Difco/EUA) a 35 °C por 24 horas. Após este período, uma alçada da cultura foi suspensa em solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 0,08 a 0,1 de absorbância a 625nm, o que corresponde a 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (AFTS-EUCAST 7.1 Rodríguez-Tudela et al. 2003). Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em caldo Mueller-Hinton para utilização no ensaio.

Para o teste contra as leveduras foi preparado uma suspensão de células da levedura. Para tanto, a levedura foi crescida em ágar Sabouraud (Difco/EUA) a 35°C por 24 horas. Após este período, uma alçada da cultura foi suspensa em solução salina estéril 0,85% (0,145 mol/L). A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 70% de transmitância a 530nm, o que corresponde a 10<sup>6</sup> UFC/mL (CLSI, 2003). Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 suplementado com 2% de glicose) para utilização no ensaio.

10

#### **4.5.1.2 Ensaio antimicrobiano**

Para a realização do ensaio antimicrobiano contra leveduras e bactérias foram utilizados os meios de cultura sintéticos RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (SIGMA, EUA) suplementado com 2% glicose para as leveduras e Mueller-Hinton para as bactérias, e placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). Os extratos foram testados na concentração de 100 mg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicata. Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em água deionizada autoclavada para a concentração de 1 mg/mL), 25 µL do meio de cultura e 50 µL do inóculo. Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B (Sigma, EUA) a 2 µg/mL para as leveduras e cloranfenicol (Sigma, EUA) a 32 µg/mL para as bactérias. Ao final, o volume de cada poço será de 100 µL e as concentrações de DMSO 0,1% e extrato 250 µg/mL.

15

20

Ao final do processo as placas foram colocadas em agitador (Uniscience OS-10) por 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), homogeneizado e as placas novamente incubadas a 35 °C por 4 horas. O MTT, sal tetrazólio amarelo, é convertido à azul de formazan por desidrogenases das células vivas (SOUSA, 2007), revelando a presença daquelas metabolicamente ativas. Posteriormente, foi acrescentado a cada poço 100 µL de SDS/Isopropanol 5% (50g de Dodecil Sulfato de Sódio, 200 mL água deionizada autoclavada, 500 mL q.s.p. Isopropanol PA, pH 5,4), e então as placas foram

25

30



homogeneizadas rigorosamente. O SDS/Isopropanol rompe a membrana celular dos micro-organismos 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 absorvância de 570 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do controle de micro-organismo, sendo a porcentagem de inibição calculada por meio da fórmula abaixo, em que DO\* refere-se à densidade ótica dos poços. Arbitrariamente foram considerados ativos os extratos com valor de inibição maior ou igual que 70%. Estes foram testados para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Porcentagem de Inibição:  $\frac{DO^* \text{ poço controle} - DO \text{ poço testado}}{DO \text{ poço controle}} \times 100$

DO poço controle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	EX1	EX9	Ex17	EX25	Ex33	EX41	EX49	EX57	EX65	EX73	DMSO
B	BL	EX2	Ex10	Ex18	EX26	Ex34	EX42	EX50	EX58	EX66	EX74	DMSO
C	BL	EX3	Ex11	Ex19	EX27	Ex35	EX43	EX51	EX59	EX67	EX75	DMSO
D	BL	EX4	Ex12	Ex20	EX28	Ex36	EX44	EX52	EX60	EX68	EX76	DMSO
E	CN	EX5	Ex13	Ex21	EX29	Ex37	EX45	EX53	EX61	EX69	EX77	CP
F	CN	EX6	Ex14	Ex22	EX30	Ex38	EX46	EX54	EX62	EX70	EX78	CP
G	CN	EX7	Ex15	Ex23	EX31	Ex39	EX47	EX55	EX63	EX71	EX79	CP
H	CN	EX8	Ex16	Ex24	EX32	Ex40	EX48	EX56	EX64	EX72	EX80	CP

BL – Branco (meio de cultura)  
 CN – Controle Negativo (meio de cultura + água + inóculo)  
 EX - Extrato

DMSO – Controle de DMSO 0,25 e/ou 0,1% (água/ DMSO + inóculo)  
 CP – Controle Positivo (água/droga + inóculo)

**Figura 11.** Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios realizados.

#### 4.5.2 Ensaio antimicrobiano contra *Cladosporium sphaerospermum*

Para o ensaio contra *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740, este foi previamente crescido em BDA a 25 °C por 7 a 10 dias. Para o preparo da solução uma alçada bem carregada de esporos foi suspensa em solução salina estéril 0,85%. A suspensão resultante foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão será padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 15% de transmitância a 620nm, o que corresponde a 10<sup>6</sup> esporos/mL (NCCLS

M38 - A, v. 22, n° 16). Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 50 vezes em meio de cultura (RPMI 1640 - INLAB Diagnóstica) para utilização no ensaio.

Os extratos foram testados na concentração de 100 mg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicata. Em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em água deionizada autoclavada para a  
5 concentração de 1 mg/mL), 25 µL do meio de cultura e 50 µL do inóculo. Como controles positivos foi utilizado Benomyl a 1,16 µg/mL. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL e as concentrações de DMSO 0,1% e extrato 250 µg/mL.

Ao final do processo as placas foram colocadas em agitador (Uniscience OS-10)  
10 por 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente, foram incubadas a 25 ° C por 48 horas. A leitura foi realizada em leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), com a absorbância de 570 nm. A absorbância dos poços teste foi comparada com a absorbância do controle de micro-organismo. Arbitrariamente foram considerados ativos os extratos com valor de inibição  
15 maior ou igual que 70%, os quais foram testados para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

#### **4.5.3 Cálculo da Concentração Inibitória Mínima**

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos contra  
20 leveduras e bactérias foram utilizados os meios de cultura sintéticos RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (SIGMA, EUA) suplementado com 2% glicose para as leveduras e Mueller-Hinton para as bactérias. Os extratos foram testados na concentração de 100 mg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicata. Na primeira coluna do poço teste (coluna 2) foram  
25 inoculados 100 µL do extrato (dissolvidos em DMSO e diluídos em meio de cultura para a concentração de 500 µg/mL), 50 µL do meio de cultura (coluna 3 a 11) e 50 µL do inóculo (coluna 2 a 11). Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B (Sigma, EUA) a 2 µg/mL para as leveduras e cloranfenicol (Sigma, EUA) a 32 µg/mL para as bactérias. Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas a partir da coluna  
30 2 até a coluna 11. Ao final, o volume de cada poço será de 100 µL e as concentrações de DMSO 0,1% e os extratos nas concentrações de 250 µg/mL a 0,488 µg/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	EX1 250	EX1 125	EX1 62.5	EX1 31.25	EX1 15.62	EX1 7.81	EX1 3.90	EX1 1.95	EX1 0.97	EX1 0.48	DMSO
B	BL	EX2 250	EX2 125	EX2 62.5	EX2 31.25	EX2 15.62	EX2 7.81	EX2 3.90	EX2 1.95	EX2 0.97	EX2 0.48	DMSO
C	BL	EX3 250	EX3 125	EX3 62.5	EX3 31.25	EX3 15.62	EX3 7.81	EX3 3.90	EX3 1.95	EX2 0.97	EX3 0.48	DMSO
D	BL	EX4 250	EX4 125	EX4 62.5	EX4 31.25	EX4 15.62	EX4 7.81	EX4 3.90	EX4 1.95	EX3 0.97	EX4 0.48	DMSO
E	CN	EX5 250	EX5 125	EX5 62.5	EX5 31.25	EX5 15.62	EX5 7.81	EX5 3.90	EX5 1.95	EX5 0.97	EX5 0.48	CP
F	CN	EX6 250	EX6 125	EX6 62.5	EX6 31.25	EX6 15.62	EX6 7.81	EX6 3.90	EX6 1.95	EX6 0.97	EX6 0.48	CP
G	CN	EX7 250	EX7 125	EX7 62.5	EX7 31.25	EX7 15.62	EX7 7.81	EX7 3.90	EX7 1.95	EX7 0.97	EX7 0.48	CP
H	CN	EX8 250	EX8 125	EX8 62.5	EX8 31.25	EX8 15.62	EX8 7.81	EX8 3.90	EX8 1.95	EX8 0.97	EX8 0.48	CP

**BL** – Branco (meio de cultura)  
**CN** – Controle Negativo (meio de cultura + inóculo)  
**EX** - Extrato

**DMSO** – Controle de DMSO 0,25 e/ou 0,1% (meio de cultura/ DMSO + inóculo)  
**CP** – Controle Positivo (meio de cultura/droga + inóculo)

**Figura 12.** Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima.

5 Ao final do processo as placas foram colocadas em agitador (Uniscience OS-10) por 20 minutos a 200 rpm. Posteriormente, foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), homogeneizado e as placas novamente incubadas a 30 °C por 4 horas. O MTT, sal tetrazólio amarelo, é convertido à azul de formazan por

10 desidrogenases das células vivas (SOUSA, 2007), revelando a presença daquelas metabolicamente ativas. Posteriormente, foi acrescentado a cada poço 100 µL de SDS/Isopropanol 5% (50g de Dodecil Sulfato de Sódio, 200 mL água deionizada autoclavada, 500 mL q.s.p. Isopropanol PA, pH 5,4), e então as placas foram

15 homogeneizadas rigorosamente. O SDS/Isopropanol rompe a membrana celular dos micro-organismos alvos e disponibiliza no meio o formazan. A leitura será realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca *VERSAmax* (Molecular Devices) pelo programa *Softmax® Pro 5* (Molecular Devices). Todos os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos por Carvalho et al. (2012).

20

#### 4.6 Seleção de extratos para análise química

Após a triagem realizada com os extratos produzidos, os extratos fúngicos que apresentaram atividade biológica foram recultivados e novamente testados. Aqueles extratos que permaneceram ativos após o recultivo foram submetidos a experimentos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)  $H^1$ , a fim de se realizar uma avaliação inicial do perfil de compostos presentes em cada extrato bruto selecionado. Tais experimentos foram realizados no *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* (ARS/NPURU/USDA), com auxílio do pesquisador químico responsável, Dr, Charles Cantrell e técnicos especializados.

#### 4.7 Cultivo em larga escala para obtenção de extratos brutos

Apenas o fungo UFMGCB 9720 foi selecionado para o isolamento biomonitorado dos metabólitos de interesse. O mesmo foi cultivado em 250 placas de Petri contendo meio BDA e incubadas a 28 °C com umidade de 70-80%. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi liofilizado por 5 dias para remoção da água, sendo posteriormente transferidos para frascos de vidro e adicionados diclorometano PA. O conteúdo dos frascos foi mantido a temperatura ambiente durante 3 a 5 dias. Após, os extratos foram filtrados com papel filtro, concentrados com auxílio de rota vaporador e, então, secos. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C para análises posteriores.

#### 4.8 Ensaios biológicos para o biomonitoramento da atividade

Os ensaios biológicos para biomonitoramento da atividade dos extratos brutos, frações e compostos puros foram realizados por técnicos especializados do *National Center for Natural Products Research* (NCNPR)/USA. Os extratos foram avaliados quanto ao seu potencial herbicida, larvicida, antimalárico, leishmanicida, antifúngico e antibacteriano.

## 4.8.1 Determinação da atividade herbicida

### 4.8.1.1 Bioensaio com alface e gramínea

A atividade herbicida foi determinada utilizando-se sementes de alface (*Iceberg A crisphea*) como modelo para dicotiledôneas e sementes de gramínea (*Agrostis*, variedade *Penncross*) como modelo para monocotiledôneas. Para a realização dos ensaios, todas as sementes foram esterilizadas superficialmente em hipoclorito de sódio a 5% por 10 minutos. Posteriormente lavadas em água deionizada estéril e secas ao ar em um ambiente esterilizado. Os bioensaios foram realizados em duplicata em placas de poliestireno de 24 poços esterilizadas (CoStar 3524, Corning Incorporated). Um disco de papel de filtro (Whatman Grade 1, 1,5 cm), foi colocado em cada poço a ser utilizado. Aos poços controle foram adicionados 200 µL de água Millipore. Para avaliação de toxicidade do solvente utilizado na solubilização das frações foi realizado o controle de solvente. Para tanto, foi adicionado ao poço 180 µL de água e 20 µL de acetona P.A. Aos poços testes foram adicionados 180 µL de água e 20 µL da diluição da amostra na concentração de 1 mg/mL. Toda a preparação placa foi realizada em um ambiente estéril para diminuir as chances de qualquer possível contaminação. Posteriormente cinco sementes do vegetal teste foi adicionada a cada poço. As placas foram tampadas e seladas com parafilme. As placas foram incubadas em estufa (Percival Scientific CU-36L5) sob condições de luz contínua ( $120,1 \text{ umol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) a 26 °C por sete dias. Após este período, uma estimativa qualitativa de fitotoxicidade foi feita atribuindo-se uma classificação de 0 para onde não ocorreu nenhum efeito de inibição da germinação (as plantas dos poços teste encontraram-se idênticas às plantas controle), 2 para menos de 50% de inibição da germinação, 3 para cerca de 50% de inibição de germinação, 4 para mais de 50% de inibição de germinação e 5 para não germinação das sementes. Cada experimento foi repetido três vezes.

### 4.8.1.2 Bioensaio com *Lemna paucicostata* (lentilha-d'água)

O bioensaio com *Lemna paucicostata* (lentilha-d'água) foi realizado de acordo com o método de Michel et al. (2004). As amostras de lentilha-d'água foram obtidas a partir do cultivo de uma única colônia constituída por uma estrutura mãe e duas folhas filhas em 100 ml de mistura de sal basal N°. 2 de Hoagland (Sigma H2395) ( $1,6 \text{ g L}^{-1}$ ) adicionado de ferro (1 mL da solução de 1000X Fe-EDTA em 1 L de meio Hoagland, pH

ajustado para 5,5) em frascos estéreis com tampas ventiladas mantido em estufa Percival Scientific CU-36L5 sob condições de luz contínua a 26 °C e 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  PAR médio. A solução de ferro (1000X) continha 18,36 g L<sup>-1</sup> de Fe-EDTA. Os meios foram trocados a cada 2 ou 3 dias ou novos repiques foram preparados em meio fresco. O tempo de duplicação da planta foi de aproximadamente 24 a 36 horas. Os testes de triagem e de repetição foram realizados utilizando placas estéreis de poliestireno de seis poços (CoStar 3506, Corning Incorporated). Cada poço continha 4.950  $\mu\text{L}$  de meio de Hoagland mais 50  $\mu\text{L}$  de água, ou o solvente, ou o composto dissolvido no solvente apropriado (a uma concentração de 100X). A concentração final do solvente foi, portanto, de aproximadamente 1%. Um modelo gráfico das placas de seis poços foi utilizado para o software de análise de imagem LemnaTec (LemnaTec, Würselen, Alemanha). Cada poço foi inoculado com duas plantas de 3 folhas da mesma idade (4 a 5 dias de idade) e tamanho aproximado e incubadas em estufa Percival como descrito acima. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores de IC<sub>50</sub> (concentração de inibição de crescimento em 50%) foram determinados com o software de estatística R (R-Development-Core-Team, 2015). As áreas das folhas das plantas foram medidas em intervalos de tempo (0-7 dias) usando a metodologia de análise de imagem LemnaTec que registra o número de folhas, a área de folhas total, bem como classes de cores que indicam efeito clorótico ou necrótico.

20

#### **4.8.2 Determinação da atividade larvicida**

Os bioensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita por Ali e colaboradores (2013), com o objetivo de determinar a atividade larvicida dos compostos puros isolados a partir de *V. gigantea* contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços. Em cada poço foi acrescentado cinco larvas de 1 dia de desenvolvimento em uma gota de água de 30-40  $\mu\text{L}$ . Adicionou-se ainda a cada poço 50  $\mu\text{L}$  da dieta larval (2% de pasta de Fígado de Bovino em pó e de levedura de Brewer na proporção de 3:2 e 1 mL de água desionizada). Todos os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A mortalidade larval foi registrada 24 horas após o tratamento. Larvas que não apresentaram movimento no poço após perturbação manual foram registradas como mortas. A mortalidade larval foi convertida em porcentagem.

30

### 4.8.3 Determinação da atividade antimalárica e citotoxicidade

A atividade antimalárica foi determinada utilizando-se linhagens de *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (D6) e linhagens resistentes a cloroquina (W2) por meio da medição da atividade lactato desidrogenase (LDH) plasmódica, de acordo com a metodologia descrita por Makler & Hinrichs (1993). Os extratos brutos foram submetidos inicialmente ao Teste Primário contra linhagens de *P. falciparum* D6. Os extratos foram testados em duplicata na concentração de 15.867 ng/mL e o percentual de inibição foi calculado levando-se em consideração os controles positivos e negativos. Os extratos que exibiram percentual de inibição superior a 50% foram submetidos ao Teste Secundário. No Teste Secundário as amostras (extratos brutos e/ou frações) foram testadas contra ambas as linhagens de *P. falciparum* (D6 e W2). Os testes foram realizados em duplicata nas concentrações de 47.600, 15.867 e 5.289 ng/mL, e a  $CI_{50}$  das amostras foram calculadas, levando-se em consideração os controles positivos e negativos. No caso de compostos puros, o Teste secundário foi realizado nas concentrações 4.760, 1.587 e 529 ng/mL e a  $CI_{50}$  também foi calculada.

Em adição, para avaliar a citotoxicidades dos compostos, os mesmos foram submetidos a ensaios com linhagens celulares VERO. O Índice de Seletividade (SI) – razão entre a  $CI_{50}$  das células VERO e a  $CI_{50}$  das linhagens D6 e W2 – foram calculados. Todos os valores de  $CI_{50}$  foram calculados utilizando-se o software XLFit. Como controle de droga foram utilizados Cloroquina e Artemisinina.

### 4.8.4 Determinação da atividade leishmanicida

O teste antileishmanina avalia a capacidade das amostras em inibir o desenvolvimento do protozoário, *Leishmania donovani*, causador da leishmaniose visceral. Os extratos foram submetidos inicialmente ao Teste Primário contra linhagens de *L. donovani*. Os mesmos foram testados em duplicata na concentração de 80  $\mu$ g/mL e o percentual de inibição foi calculado levando-se em consideração os controles positivos e negativos. As amostras que exibiram percentual de inibição superior a 50% foram submetidas ao Teste Secundário. No Teste Secundário as amostras foram testadas em duplicata nas concentrações de 40, 8.0 e 1.6  $\mu$ g/mL, e as  $CI_{50}$  foram calculadas, levando-se em consideração os controles positivos e negativos. Todos os valores de  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$

foram calculados utilizando-se o software XLFit. Como controle de droga foram utilizadas Pentamidina e Anfotericina B.

#### 4.8.5 Determinação da atividade antimicrobiana

5 O ensaio antimicrobiano tem por objetivo avaliar o potencial das amostras em inibir o crescimento de uma série de patógenos humanos. Todos os organismos testados foram obtidos no American Type Culture Collection (Manassas, VA) e incluem os fungos *Candida albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113, e *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, e as  
10 bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* resistente à meticilina ATCC 33591 (MRS), *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068. Todos os organismos foram testados de acordo com protocolos descritos na CLSI (anteriormente NCCLS), com modificações.

Os extratos brutos foram submetidos inicialmente ao Teste Primário em duplicata  
15 na concentração de 50 µg/mL e o percentual de inibição foi calculado levando-se em consideração os controles positivos e negativos. Os extratos que exibiram percentual de inibição superior a 50% foram submetidos ao Teste Secundário. Neste ensaio, as amostras (extratos brutos e/ou frações) foram testadas nas concentrações de 200, 40, 8 µg/mL, e a  $CI_{50}$  das amostras foram calculadas, levando-se em consideração os controles positivos e  
20 negativos. No caso de compostos puros, o Teste secundário foi realizado nas concentrações 20, 4, 0.8 µg/mL e a  $CI_{50}$  também foi calculada. Todos os valores de  $CI_{50}$  foram calculados utilizando-se o software XLFit. Como controle de droga antifúngico foi utilizado Anfotericina B e como controle antibacteriano foi utilizado Ciprofloxacina.

#### 25 4.9 Identificação dos metabólitos bioativos

Os extratos com presença de ácidos graxos foram caracterizados por meio de experimentos de Cromatografia Gasosa – Análise com Detector por Ionização de Chama (CG- DIC). Os extratos selecionados para o isolamento biomonitorado tiveram os compostos ativos identificados por meio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear  
30 (RMN), Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida acoplada com Espectrometria de Massas (CL-EM). Tais experimentos foram realizados no *Natural Products Utilization Research Unit*



pertencente ao *National Center for Natural Products Research* (ARS/NPURU/USDA), com auxílio do pesquisador químico responsável, Dr. Charles Cantrell e técnicos especializados.

#### 5 4.10 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um aparelho Bruker 500 MHz (Massachusetts). As amostras foram preparadas a aproximadamente 10 mg/mL em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) ou DMSO deuterado 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).

#### 4.11 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos

Os extratos brutos avaliados com presença majoritária de ácidos graxos a partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram submetidos a análise quantitativa e qualitativa destas substâncias. Para a análise, 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-distilado ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) 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  $\mu\text{L}$  de éter dietil e 500  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{CH}_2\text{N}_2$ . 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  $\text{CH}_2\text{N}_2$ . Após a reação o produto éster metílico foi dissolvido em 500  $\mu\text{L}$  de éter dietil e analisado em CG-DIC.

30

#### 4.11.1 Cromatografia Gasosa – Análise com Detector por Ionização de chama

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 4 0°C min e mantido por 3 minutos; volume de injeção de 1µL (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 avaliados 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 <sup>1</sup>H, 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 e, também pelo calor, após aplicação de spray de Godin (Godin A, 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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).

#### 4.13 Análises de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Após a realização dos ensaios biológicos com as frações obtidas, 1 mg de todas as frações ativas foram dissolvidas em DCM (1000 µL) e analisadas pela cromatografia

gasosa acoplada a espectrometria de massa (Agilent 7890 A GC System). Utilizaram-se uma coluna DB-5 (coluna capilar de sílica fundida 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm 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 µL (splitless).

#### 4.14 Elucidação estrutural dos constituintes químicos

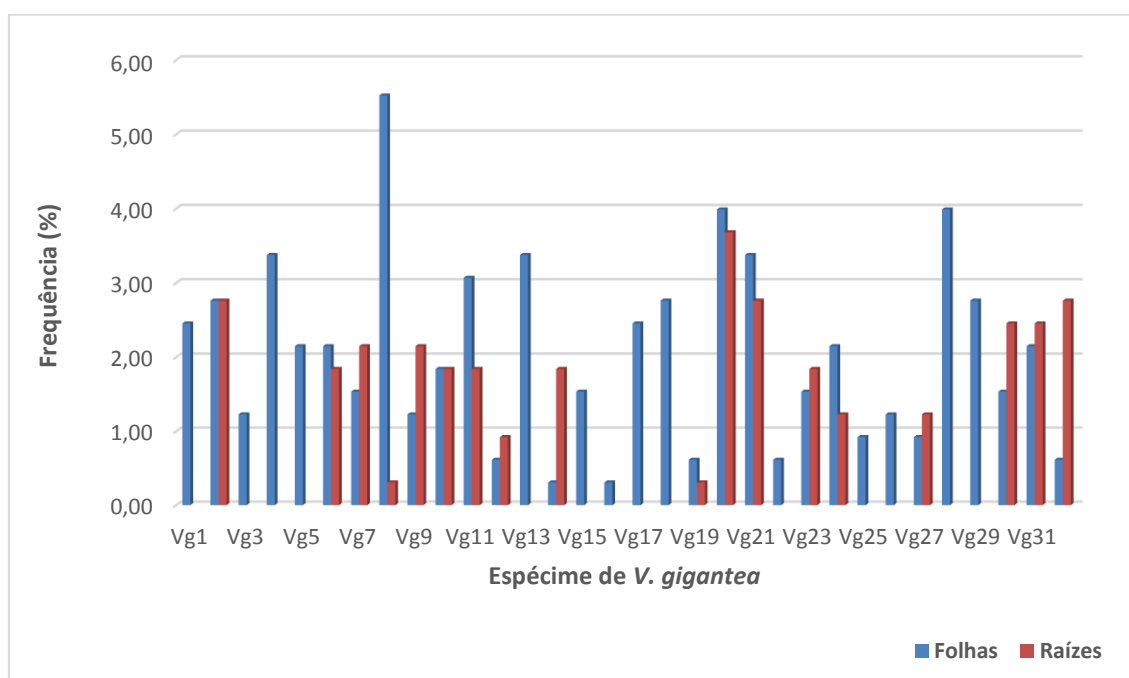
Os metabólitos isolados das frações ativas foram submetidos às técnicas de CL-EM (cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas), a qual é muito sensível e fornece informações estruturais importantes como, massa molar de alta ou baixa resolução e fórmula molecular. As amostras foram dissolvidas em metanol e 20 µL (aproximadamente 0,1 mg/mL) injetados manualmente a 0,5 minutos, enquanto que L-triptofano foram injetados 1,5 min após 2 minutos de corrida. A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) uni e bidimensionais, foram obtidos na frequência do hidrogênio a 500 MHz, e na frequência do carbono a 150,864 MHz. A identificação das moléculas foi finalizada a partir dos dados obtidos após estes experimentos somado a pesquisas realizadas em banco de dados comerciais, como *Dictionary of Natural Products e SciFinder Scholar*.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Coleta e isolamento dos fungos endofíticos

A partir da coleta realizada foram processados cinco fragmentos de três folhas e de três raízes de cada indivíduo de *V. gigantea* amostrado. Desta forma, foram plaqueados 480 fragmentos foliares e 270 fragmentos de raízes, totalizando 750 fragmentos. A metodologia utilizada para a desinfestação superficial das folhas e raízes, bem como a técnica de isolamento dos fungos aplicada no presente trabalho, tem sido comumente utilizada em diversos estudos e considerada um método tradicional e eficiente para detecção e quantificação de fungos endofíticos (TAN & ZOU, 2001; VIEIRA et al., 2012; CARVALHO et al., 2012; FERREIRA et al., 2015).

A partir do material amostrado foram obtidos 326 isolados de fungos endofíticos, sendo 321 fungos filamentosos e cinco leveduras. Dentre os fungos filamentosos, 208 (64,8%) foram provenientes de fragmentos foliares e 113 (35,2%) das raízes. Em relação as leveduras, quatro isolados foram obtidos a partir das folhas e apenas um a partir das raízes. Foi possível realizar o isolamento de fungos endofíticos a partir de todas as folhas e raízes amostradas. A frequência de isolamento a partir das folhas variou de 0,3 a 5,5%, enquanto a das raízes variou de 0,3 a 3,7% (Figura 6).



20 **Figura 13.** Frequência de isolamento dos fungos obtidos a partir das folhas e raízes de cada espécime de *Vellozia gigantea*. Vg: Espécime de *Vellozia gigantea* amostrado.

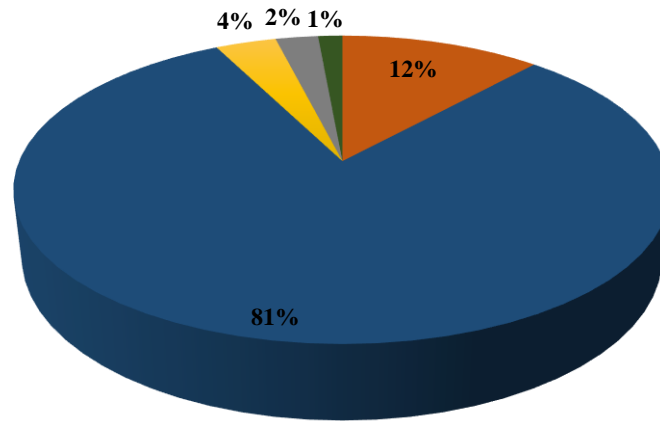
## 5.2 Identificação dos fungos endofíticos

Os 321 isolados de fungos filamentosos foram inicialmente separados em 172 grupos de acordo com as características macromorfológicas das suas colônias. Destes, 115 isolados foram considerados morfotipos únicos, ou seja, representados por um único  
5 isolado (singletos). Para confirmar o agrupamento morfológico, os isolados de cada grupo foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR). Após a análise dos perfis moleculares obtidos, os 172 grupos foram reagrupados em 233 grupos moleculares.

Um ou mais isolados de cada grupo molecular foi selecionado para  
10 sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rDNA. Posteriormente todos os táxons obtidos tiveram suas identificações confirmadas por meio do sequenciamento parcial do gene da  $\beta$ -tubulina e/ou da RNA Polimerase II.

Dos 321 isolados obtidos, 41 (12,7%) foram classificados como não identificados, mas representam táxons de fungos endofíticos associados a *V. gigantea*. A não  
15 identificação destes táxons está relacionada a não amplificação de nenhuma das regiões propostas ou a não obtenção de sequências de qualidade satisfatória. Em alguns casos a não amplificação pode estar relacionada à qualidade do DNA bruto obtido no processo de extração, o qual pode conter contaminantes tais como, proteínas, agentes caotrópicos, pigmentos, dentre outros que inibem a ação da Taq DNA polimerase (NILSSON et al.,  
20 2009). Em outros casos, não foi possível obter DNA com dosagens suficientes para realização da reação da PCR, o que pode ser relacionado à dificuldade de rompimento da parede celular fúngica e consequente disponibilização do material genético.

Ao final do processo de sequenciamento, 280 isolados de fungos filamentosos foram identificados em 84 unidades taxonômicas distintas (UTD) pertencentes ao filo  
25 *Ascomycota*, os quais estão distribuídos em 27 gêneros (Tabela 1). A classe *Sordariomycetes* foi predominante, seguida de *Dothideomycetes*, *Leotiomycetes* e *Eurotiomycetes* (Figura 7).



■ Dothideomycetes ■ Sordariomycetes ■ Leotiomyces ■ Eurotiomycetes ■ Não determinada

**Figura 14.** Porcentagem dos fungos endofíticos classificados em nível de classe associados às folhas e raízes de *Vellozia gigantea*.

5 A partir da análise realizada por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), os cinco isolados de leveduras obtidos foram agrupados em três perfis moleculares distintos (Tabela 1). Entre estas leveduras, o isolado UFMGCB Vg11F10 foi considerado uma nova espécie, pois a partir da análise de suas sequencias foi possível observar que esta levedura apresentou 100% de identidade com o isolado *Candida* sp. TT12 (código GenBank HQ014450) e não apresentou similaridade com sequencias de nenhuma outra espécie depositada no GenBank. A levedura UFMGCB Vg11F10 diferiu em oito substituições no domínio D1/D2 na subunidade maior do gene do RNA e por 53 substituições e 15 *gaps* na região ITS quando comparada com *Yamadazyma mexicana*, a espécie filogeneticamente mais próxima. Esta nova espécie também está filogeneticamente relacionada com as espécies *Candida conglobata*, *Candida pseudoaaseri*, *Candida andamanensis*, *Yamadazyma terventina*, *Candida aaseri* e *Candida insectorum*. Todos os isolados pertencentes à esta espécie foram identificados como *Yamadazyma riverae* sp. nov. (LOPES et al., 2015).

10

15

**Tabela 1.** Identificação molecular dos fungos endoíticos associados à *Vellozia gigantea*.

UFMGCB <sup>a</sup>	Tecido <sup>b</sup>	Nº de isolados	Sequências de referência do BLAST (Número de acesso no GenBank) <sup>c</sup>	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de bp analisados	Identificação proposta (Número de acesso no GenBank)
9874	F, R	29	<i>Xylaria berteri</i> (GU324749) <sup>d</sup>	100	99	441	<i>Xylaria berteri</i> (KU7276850 <sup>h</sup> ,
			<i>Xylaria berteri</i> (FJ904911) <sup>e</sup>	100	99	337	KU878163 <sup>i</sup> )
9823	F, R	27	<i>Diaporthe nothofagi</i> (JX862530) <sup>d</sup>	99	93	459	<i>Diaporthe</i> sp. 1 (KU727686 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe nothofagi</i> (KF170922) <sup>e</sup>	99	88	439	KU992319 <sup>i</sup> )
9657	F, R	27	<i>Nigrospora oryzae</i> (KC771457) <sup>d</sup>	100	100	434	<i>Nigrospora oryzae</i> (KU727687 <sup>h</sup> )
9886	F, R	20	<i>Muscodor equiseti</i> (JX089322) <sup>d</sup>	99	97	474	<i>Muscodor</i> sp. 1 (KU727688 <sup>h</sup> )
9682	F, R	13	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	100	100	485	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>
			(NR120133) <sup>d</sup>	100	98	640	(KU727689 <sup>h</sup> , KX015126 <sup>i</sup> )
			<i>Colletotrichum aeshynomenes</i> (JX010392) <sup>e</sup>				
9734	F, R	10	<i>Trichoderma viride</i> (DQ323428) <sup>d</sup>	99	100	481	<i>Trichoderma viride</i> (KU727690 <sup>h</sup> )
9740	F, R	8	<i>Diaporthe schini</i> (NR111861) <sup>d</sup>	100	99	451	<i>Diaporthe</i> sp. 2 (KU727691 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe masirevicii</i> (KJ197257) <sup>e</sup>	96	95	390	KX015134 <sup>i</sup> )

9803	F, R	7	<i>Colletotrichum karstii</i> (HM585409) <sup>d</sup>	89	99	400	<i>Colletotrichum karstii</i>
			<i>Colletotrichum karstii</i> (HM585428) <sup>e</sup>	100	100	463	(KU727692 <sup>h</sup> , KU878164 <sup>i</sup> )
9685	F, R	7	<i>Guignardia mangiferae</i> (JF261465) <sup>d</sup>	100	100	512	<i>Guignardia mangiferae</i>
			<i>Guignardia mangiferae</i> (AB704275) <sup>e</sup>	65	99	560	(KU727693 <sup>h</sup> , KX015127 <sup>i</sup> )
9679	F, R	5	<i>Diaporthe arengae</i> (NR111843) <sup>d</sup>	99	93	455	<i>Diaporthe</i> sp. 3 (KU727694 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe nothofagi</i> (KF170922) <sup>e</sup>	100	90	493	KU992320 <sup>i</sup> )
9720	F, R	5	<i>Diaporthe miriciae</i> (KJ197282) <sup>d</sup>	99	99	466	<i>Diaporthe miriciae</i> (KU727695 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe miriciae</i> (KJ197262) <sup>e</sup>	100	99	399	KU878162 <sup>i</sup> )
9752	F, R	5	<i>Geotrichum vulgare</i> (NR077072) <sup>d</sup>	100	92	423	<i>Dipodascaceae</i> sp. (KU727696 <sup>h</sup> )
9826	F, R	4	<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843295) <sup>d</sup>	100	98	491	<i>Diaporthe</i> sp. 4 (KU727697 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843209) <sup>e</sup>	99	96	450	KU992321 <sup>i</sup> )
9762	F, R	4	<i>Diaporthe sackstonii</i> (KJ197287) <sup>d</sup>	99	97	449	<i>Diaporthe</i> sp. 5 (KU727698 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe acaciarum</i> (KP004509) <sup>e</sup>	93	93	464	KX015135 <sup>i</sup> )
9678	F, R	4	<i>Fusarium circinatum</i> (NR120263) <sup>d</sup>	99	99	462	<i>Fusarium</i> sp. (KU727699 <sup>h</sup> ,
			<i>Fusarium bulbicola</i> (KF466437) <sup>e</sup>	72	99	378	KX015136 <sup>i</sup> )
9764	F, R	4	<i>Nemania abortive</i> (NR121350) <sup>d</sup>	99	89	460	<i>Xylariaceae</i> sp. 1 (KU727700 <sup>h</sup> )



9807	F, R	3	<i>Bipolaris drechsleri</i> (KF500530) <sup>d</sup>	100	98	453	<i>Bipolaris drechsleri</i> (KU727701 <sup>h</sup> )
9954	F	3	<i>Coccomyces proteae</i> (JX089385) <sup>d</sup>	100	93	438	<i>Coccomyces</i> sp. (KU727702 <sup>h</sup> )
9959	F	3	<i>Diaporthe diospyricola</i> (KF777156) <sup>d</sup>	100	96	455	<i>Diaporthe</i> sp. 6 (KU727703 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe macintoshii</i> (KJ197269) <sup>e</sup>	100	94	435	KX015137 <sup>i</sup> )
9824	F, R	3	<i>Diaporthe endophytica</i> (NR111847) <sup>d</sup>	99	97	486	<i>Diaporthe</i> sp.7 (KU727704 <sup>h</sup> )
9893	F	3	<i>Medicopsis romeroi</i> (NR130697) <sup>d</sup>	97	90	438	<i>Trematosphaeriaceae</i> sp. (KU727705 <sup>h</sup> )
9880	F	3	<i>Muscodor suthepensis</i> (JN558830) <sup>d</sup>	97	97	480	<i>Muscodor</i> sp. 2 (KU727706 <sup>h</sup> )
9975	R	3	<i>Neofusicoccum parvum</i> (KF766204) <sup>d</sup>	62	86	473	<i>Botryosphaeriales</i> sp. 1 (KU727707 <sup>h</sup> )
9829	R	3	<i>Penicillium herquei</i> (NR103659) <sup>d</sup>	95	99	481	<i>Penicillium herquei</i> (KU727708 <sup>h</sup> ,
			<i>Penicillium herquei</i> (JN625969) <sup>e</sup>	100	99	444	KU992317 <sup>i</sup> )
9741	F, R	3	<i>Pestalotiopsis australasiae</i> (KM199297) <sup>d</sup>	100	100	508	<i>Pestalotiopsis australasiae</i>
			<i>Pestalotiopsis australasiae</i> (KM199410) <sup>e</sup>	100	100	400	(KU727709 <sup>h</sup> , KU840800 <sup>i</sup> )
9960	F, R	3	<i>Phialocephala scopiformis</i> (NR119460) <sup>d</sup>	88	94	470	<i>Helotiales</i> sp. (KU727710 <sup>h</sup> )

Vg1F5	F	2	<i>Candida michaelii</i> (AY520329) <sup>g</sup>	99	100	419	<i>Yamadazyma michaelii</i> (KU752546 <sup>k</sup> )
Vg11F10	F	2	<i>Candida</i> sp. TT12 (HQ014450) <sup>g</sup>	100	100	480	<i>Yamadazyma riverae</i> (KU752547 <sup>h</sup> ,
			<i>Candida</i> sp. TT12 (HQ014447) <sup>d</sup>	100	100	480	KU752549 <sup>k</sup> )
9943	F, R	2	<i>Crucellisporiopsis marquesiae</i> (KP004443) <sup>d</sup>	98	89	407	<i>Hyaloscyphaceae</i> sp. (KU727711 <sup>h</sup> )
9718	F	2	<i>Diaporthe inconspicua</i> (NR111849) <sup>d</sup>	100	99	485	<i>Diaporthe</i> sp. 8 (KU727712 <sup>h</sup> )
9747	R	2	<i>Diaporthe maytenicola</i> (KF777157) <sup>d</sup>	99	96	455	<i>Diaporthe</i> sp. 9 (KU727713 <sup>h</sup> )
9686	F, R	2	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> (NR111862) <sup>d</sup>	100	98	461	<i>Diaporthe</i> sp. 10 (KU727714 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe miriciae</i> (KJ197262) <sup>e</sup>	100	90	399	KX024588 <sup>i</sup> )
9889	F, R	2	<i>Harpophora oryzae</i> (EU636699) <sup>d</sup>	97	86	450	<i>Magnaporthaceae</i> sp. 1 (KU727715 <sup>h</sup> )
9905	F	2	<i>Kabatiella lini</i> (FJ157873) <sup>e</sup>	65	84	401	<i>Dothideomycetes</i> sp. (KX024589 <sup>i</sup> )
9891	F	2	<i>Mycoleptodiscus terrestris</i> (JN711860) <sup>d</sup>	99	84	473	<i>Magnaporthaceae</i> sp. 2 (KU727716 <sup>h</sup> )
9937	R	2	<i>Myxotrichum arcticum</i> (NR111037) <sup>d</sup>	97	98	480	<i>Myxotrichum</i> sp. (KU727717 <sup>h</sup> )

9771	F, R	2	<i>Penicillium citrinum</i> (NR121224) <sup>d</sup>	98	99	460	<i>Penicillium citrinum</i> (KU727718 <sup>h</sup> ,
			<i>Penicillium citrinum</i> (KC345003) <sup>e</sup>	100	100	425	KX015128 <sup>i</sup> )
9903	R	2	<i>Pezicula sporulosa</i> (KF376107) <sup>d</sup>	100	98	429	<i>Pezicula sporulosa</i> (KU727719 <sup>h</sup> )
9962	F	2	<i>Phaeophleospora stramenti</i> (KF901617) <sup>d</sup>	69	95	583	<i>Mycosphaerellaceae</i> sp. (KU727720 <sup>h</sup> )
9949	R	2	<i>Quadricrura meridionalis</i> (NR119401) <sup>d</sup>	84	88	494	<i>Tetraplosphaeriaceae</i> sp. (KU727721 <sup>h</sup> )
9736	R	2	<i>Trichoderma effusum</i> (NR111833) <sup>d</sup>	99	99	562	<i>Trichoderma effusum</i> (KU727722 <sup>h</sup> )
9703	F	1	<i>Camarosporium aloes</i> (KF777142) <sup>d</sup>	100	90	470	<i>Botryosphaeriales</i> sp. 2 (KU727723 <sup>h</sup> )
9918	F	1	<i>Camarosporium aloes</i> (KF777142) <sup>d</sup>	100	90	468	<i>Pleosporineae</i> sp. (KU727724 <sup>h</sup> )
Vg27R5	R	1	<i>Candida parapsilosis</i> (JN091166) <sup>g</sup>	100	100	481	<i>Lodderomyces</i> ( <i>Candida</i> ) <i>parapsilosis</i> (KU752548 <sup>k</sup> )
9972	R	1	<i>Cladophialophora boppii</i> (EU103997) <sup>d</sup>	99	91	519	<i>Herpotrichiellaceae</i> sp. (KU727725 <sup>h</sup> )

9708	R	1	<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i> (AF358231) <sup>d</sup> <i>Clonostachys rosea</i> (KJ413352) <sup>e</sup>	97 75	99 99	487 394	<i>Clonostachys</i> cf. <i>rosea</i> (KU727726 <sup>h</sup> , KX015129 <sup>i</sup> )
9859	F	1	<i>Colletotrichum cymbidiicola</i> (NR111694) <sup>d</sup>	98	100	491	<i>Colletotrichum</i> sp. 1 (KU727727 <sup>h</sup> )
9802	F	1	<i>Colletotrichum gigasporum</i> (KF687715) <sup>d</sup> <i>Colletotrichum gigasporum</i> (KF687866) <sup>e</sup>	98 100	92 98	454 623	<i>Colletotrichum</i> sp. 2 (KU727728 <sup>h</sup> , KX060161 <sup>i</sup> )
9939	R	1	<i>Crucellisporiopsis marquesiae</i> (KP004443) <sup>d</sup>	100	99	475	<i>Crucellisporiopsis marquesiae</i> (KU727729 <sup>h</sup> )
9697	R	1	<i>Daldinia loculata</i> (AF176959) <sup>d</sup> <i>Daldinia loculata</i> (AY951698) <sup>e</sup>	100 100	99 98	395 352	<i>Daldinia loculata</i> (KU727730 <sup>h</sup> , KX015130 <sup>i</sup> )
9690	F	1	<i>Diaporthe acaciarum</i> (KP004460) <sup>d</sup> <i>Diaporthe acaciarum</i> (KP004509) <sup>e</sup>	99 100	99 97	456 426	<i>Diaporthe acaciarum</i> (KU727731 <sup>h</sup> , KX015131 <sup>i</sup> )
9770	F	1	<i>Diaporthe acaciarum</i> (KP004509) <sup>e</sup>	100	94	382	<i>Diaporthe</i> sp. 11 (KX060162 <sup>i</sup> )
9664	F	1	<i>Diaporthe acaciigena</i> (KC343005) <sup>d</sup> <i>Diaporthe acaciigena</i> (KC343973) <sup>e</sup>	99 90	94 93	476 462	<i>Diaporthe</i> sp. 12 (KU727732 <sup>h</sup> , KX060163 <sup>i</sup> )

9663	F	1	<i>Diaporthe anacardii</i> (NR111841) <sup>d</sup>	99	95	486	<i>Diaporthe</i> sp. 13 (KU727733 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843209) <sup>e</sup>	99	94	454	KX060164 <sup>i</sup> )
9765	R	1	<i>Diaporthe anacardii</i> (NR111841) <sup>d</sup>	99	95	483	<i>Diaporthe</i> sp. 14 (KU727734 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843209) <sup>e</sup>	100	94	401	KX060165 <sup>i</sup> )
9779	F	1	<i>Diaporthe citri</i> (KC843311) <sup>d</sup>	100	96	455	<i>Diaporthe</i> sp. 15 (KU727735 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843209) <sup>e</sup>	100	96	405	KX060166 <sup>i</sup> )
9801	R	1	<i>Diaporthe citri</i> (KC843311) <sup>d</sup>	100	92	486	<i>Diaporthe</i> sp. 16 (KU727736 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe citri</i> (KC843187) <sup>e</sup>	98	86	417	KX060167 <sup>i</sup> )
9693	R	1	<i>Diaporthe eucalyptorum</i> (NR120157) <sup>d</sup>	99	99	480	<i>Diaporthe eucalyptorum</i> (KU727737 <sup>h</sup> )
9674	R	1	<i>Diaporthe hickoriae</i> (NR103699) <sup>d</sup>	99	92	455	<i>Diaporthe</i> sp. 17 (KU727738 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe sclerotioides</i> (KC344161) <sup>e</sup>	100	91	491	KX060168 <sup>i</sup> )
9672	F	1	<i>Diaporthe kongii</i> (NR111616) <sup>d</sup>	98	99	450	<i>Diaporthe kongii</i> (KU727739 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe kongii</i> (KJ197272) <sup>e</sup>	100	99	448	KX015132 <sup>i</sup> )
9659	R	1	<i>Diaporthe masirevicii</i> (KJ197257) <sup>d</sup>	100	98	455	<i>Diaporthe masirevicii</i>
			<i>Diaporthe masirevicii</i> (KJ197257) <sup>e</sup>	100	98	493	(KU727740 <sup>h</sup> , KU992318 <sup>i</sup> )

9854	F	1	<i>Diaporthe maytenicola</i> (KF777157) <sup>d</sup>	99	94	483	<i>Diaporthe</i> sp. 18 (KU727741 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843209) <sup>e</sup>	99	94	497	KX060169 <sup>i</sup> )
9695	R	1	<i>Diaporthe nothofagi</i> (KF170922) <sup>e</sup>	97	88	460	<i>Diaporthe</i> sp. 19 (KX060170 <sup>i</sup> )
9754	F	1	<i>Diaporthe saccharata</i> (NR120260) <sup>d</sup>	100	97	449	<i>Diaporthe</i> sp. 20 (KU727742 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe macintoshii</i> (KJ197269) <sup>e</sup>	98	95	431	KX060171 <sup>i</sup> )
9665	R	1	<i>Diaporthe sojae</i> (KJ590719) <sup>d</sup>	99	97	437	<i>Diaporthe</i> sp. 21 (KU727743 <sup>h</sup> ,
			<i>Diaporthe masirevicii</i> (KJ197257) <sup>e</sup>	99	95	475	KX060172 <sup>i</sup> )
9970	R	1	Fungal sp. (AY699698) <sup>d</sup>	86	93	449	Fungal sp. (KU727744 <sup>h</sup> )
9794	F	1	<i>Fusarium inflexum</i> (U34577) <sup>d</sup>	99	99	427	<i>Fusarium</i> sp. (KU727745 <sup>h</sup> ,
			<i>Fusarium oxysporum</i> (KR072629) <sup>e</sup>	91	100	301	KX060173 <sup>i</sup> )
9729	R	1	<i>Hypoxylon liviae</i> (KC968922) <sup>d</sup>	100	91	401	<i>Xylariaceae</i> sp. 2 (KU727746 <sup>h</sup> )
9950	R	1	<i>Lecythophora decumbens</i> (HE610337) <sup>d</sup>	98	99	478	<i>Lecythophora decumbens</i> (KU727747 <sup>h</sup> )
9866	F	1	<i>Muscodor equiseti</i> (JX089322) <sup>d</sup>	99	100	475	<i>Muscodor equiseti</i> (KU727748 <sup>h</sup> )
9790	F	1	<i>Muscodor oryzae</i> (JX089321) <sup>d</sup>	99	99	501	<i>Muscodor oryzae</i> (KU727749 <sup>h</sup> )

9810	F	1	<i>Muscodor suthepensis</i> (JN558830) <sup>d</sup>	97	100	502	<i>Muscodor suthepensis</i> (KU727750 <sup>h</sup> )
9967	F	1	<i>Mycosphaerella stramenti</i> (DQ303042) <sup>d</sup>	99	99	485	<i>Mycosphaerella stramenti</i> (KU727751 <sup>h</sup> )
9675	R	1	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (KM199351) <sup>d</sup>	99 99	100 99	464 432	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (KU727752 <sup>h</sup> , KX060174 <sup>i</sup> )
			<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> (KM199465) <sup>e</sup>				
9694	F	1	<i>Ochrocladosporium adansoniae</i> (KF777176) <sup>d</sup>	100	90	510	<i>Pleosporales</i> sp. (KU727753 <sup>h</sup> )
9931	F	1	<i>Pallidocercospora ventilago</i> (KF777177) <sup>d</sup>	98	100	413	<i>Pallidocercospora</i> sp. (KU727754 <sup>h</sup> )
9772	R	1	<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> (AY642530) <sup>d</sup>	98	98	494	<i>Paraconiothyrium</i> sp.
			<i>Paraconiothyrium estuarinum</i> (JX496355) <sup>e</sup>	85	94	396	(KU727755 <sup>h</sup> , KX060175 <sup>i</sup> )
9793	R	1	<i>Paraphaeosphaeria parmeliae</i> (KP170654) <sup>d</sup>	100	99	491	<i>Paraphaeosphaeria parmeliae</i> (KU727756 <sup>h</sup> )

9928	F	1	<i>Penicillium quebecense</i> (NR121507) <sup>d</sup>	100	99	472	<i>Penicillium quebecense</i>
			<i>Penicillium quebecense</i> (JN606622) <sup>f</sup>	100	98	718	(KU727757 <sup>h</sup> , KU992316 <sup>i</sup> )
9864	F	1	<i>Peyronellaea prosopidis</i> (KF777180) <sup>d</sup>	100	96	419	<i>Peyronellaea</i> sp. (KU727758 <sup>h</sup> )
9979	F	1	<i>Pseudobotrytis bisbyi</i> (KF733464) <sup>d</sup>	97	85	437	<i>Coniochaetales</i> sp. (KU727759 <sup>h</sup> )
9945	F	1	<i>Pseudocercospora norchiensis</i> (GU269753) <sup>d</sup>	100	100	439	<i>Pseudocercospora norchiensis</i> (KU727760 <sup>h</sup> )
9946	R	1	<i>Pseudolachnea fraxini</i> (JQ889287) <sup>d</sup>	100	84	457	<i>Sordariomycetes</i> sp. (KU727761 <sup>h</sup> )
9915	F	1	<i>Pseudophialophora schizachyrii</i> (KF689650) <sup>d</sup>	99	89	401	<i>Magnaporthaceae</i> sp. 3 (KU727762 <sup>h</sup> )
9953	F	1	<i>Stagonospora perfecta</i> (KF251258) <sup>d</sup>	100	87	395	<i>Massarinaceae</i> sp. 1 (KU727763 <sup>h</sup> )
9901	F	1	<i>Stagonospora pseudocaricis</i> (KF251260) <sup>d</sup>	100	86	459	<i>Massarinaceae</i> sp. 2 (KU727764 <sup>h</sup> )
9667	R	1	<i>Xylaria arbuscula</i> (JN601145) <sup>e</sup>	100	99	500	<i>Xylaria arbuscula</i> (KU727765 <sup>h</sup> ,
			<i>Xylaria arbuscula</i> (GQ478226) <sup>d</sup>	100	96	360	KX015133 <sup>i</sup> )

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. <sup>b</sup>Tecido de isolamento: R = Raiz. F = Folha. <sup>c</sup>Sequência de referência obtida por meio do BLASTm e utilizada para comparação. <sup>d</sup>Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. <sup>e</sup>Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos do gene da  $\beta$ -tubulina. <sup>f</sup>Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos do gene da RNA Polimerase II. <sup>g</sup>Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA. Sequências depositadas no GenBank: <sup>h</sup>ITS1-5.8S-ITS2, <sup>i</sup> $\beta$ -tubulin, <sup>j</sup>Polymerase II e <sup>k</sup>D1/D2.



### 5.3 Composição da comunidade de fungos endofíticos associados à *Vellozia gigantea*

A comunidade de fungos endofíticos associada à *V. gigantea* é representada principalmente por táxons pertencentes à classe *Sordariomycetes*. O complexo *Diaporthe/Phomopsis* foi predominantemente encontrado e representado por 28% dos isolados identificados (Tabela 1), sendo estes distribuídos em 26 UTD. Espécies de *Diaporthe* e seu anamorfo *Phomopsis* já foram isolados como sapróbios, endofíticos e patógenos de diferentes plantas hospedeiras e são considerados agentes causadores de várias doenças, algumas de grande importância na agricultura (SANTOS et al., 2010, KO et al., 2011). O gênero *Phomopsis* (anamorfo) contém cerca de 1.000 espécies, as quais são consideradas, muitas vezes, predominantes em seus hospedeiros. Já o gênero *Diaporthe* (teleomorfo) possui aproximadamente 180 espécies descritas (GARCIA et al., 2012). A identificação dos isolados deste complexo foi realizada baseando-se no sequenciamento de duas regiões do genoma (ITS e  $\beta$ -tubulina). Após a realização de análises baseadas nestas regiões, foi possível elucidar a identificação de apenas cinco dos táxons obtidos ao nível de espécies. Todos os demais isolados foram identificados como *Diaporthe* sp. A maioria dos táxons encontrados dentro do complexo *Phomopsis/Diaporthe* apresenta baixa similaridade com as sequências tipo depositadas no GenBank, o que pode significar que folhas e raízes de *V. gigantea* possam representar um reservatório de possíveis espécies novas dentro deste complexo. Entretanto, estudos taxonômicos mais detalhados são necessários para a caracterização destes táxons.

A família *Xylariaceae* também foi predominantemente encontrada, representada por 21,7% dos isolados identificados (Tabela 1), distribuídos em 13 UTD. Espécies pertencentes à *Xylariaceae* já foram documentadas em associação com coníferas, monocotiledônea, dicotiledônea e pteridófitas (DAVIS et al., 2003). Estes endofíticos são colonizadores assintomáticos, posteriormente podem atuar como decompositores de celulose e lignina, quando a planta entra em fase de senescência (DAVIS et al., 2003). Dentro de *Xylariaceae*, o gênero *Muscodor* se destacou com 42% dos táxons, distribuídos em cinco espécies distintas (UFMGCB 9886, 9866, 9790, 9810 e 9880). Espécies de *Muscodor* tem sido amplamente obtidas como endófitos de plantas de ambientes tropicais na América do Sul e Central, bem como no Sudeste da Ásia e Austrália (STROBEL et al., 2007). A identificação de espécies pertencentes a este gênero é realizada principalmente por meio do sequenciamento da região ITS, sendo esta suficiente para a

elucidação dos táxons (SOPALUN et al., 2003). No presente trabalho, dois táxons dentro deste gênero apresentaram baixa similaridade com as sequências de espécies tipo depositadas no GenBank, sendo então classificadas apenas em gênero. No presente estudo, também, recuperamos *D. loculata* (UFMGCB 9697) como endófito de *V. gigantea*, uma espécie endêmica adaptada às condições áridas. O táxon *Daldinia* compreende cerca de 20 espécies, todas relatadas em associação com madeira (JU et al., 1997), incluindo táxons relatados como endófitos (WHALLEY, 1996). Ingold (1965) sugere que as espécies *Daldinia* são adaptadas ecologicamente e fisiologicamente às condições xerofíticas. Além disso, *D. loculata* é capaz de colonizar substratos queimados (JU et al., 1997).

O táxon *Nigrospora oryzae* foi encontrado em alta frequência tanto nas folhas como nas raízes adventícias de *V. gigantea*, representando 9,5% dos táxons identificados no presente estudo. Espécies de *N. oryzae* são comumente relatadas como endofíticas. No entanto, também é altamente descrita como patógeno, por exemplo sendo descrita como causadora da podridão das fibras de algodão (ROMERO et al., 2001; NALINI et al., 2005; THANABALASINGAM et al., 2015).

O gênero *Colletotrichum* representou 7,7% dos táxons identificados, distribuídos em quatro UTD (UFMGCB 9859, 9682, 9803 e 9802). Este gênero possui 66 espécies reconhecidas (HYDE et al. 2009), as quais são comumente obtidas como fitopatógenos e endofíticos foliares de diferentes plantas (FARR & ROSSMAN, 2009; ROJAS et al., 2010), bem como epifíticos, sapróbios e patógenos de humanos (HYDE et al., 2009). A identificação de *Colletotrichum* em nível de espécie deve ser realizada utilizando a combinação de características macro-, micro-morfológicas, fisiológicas e abordagens moleculares. No entanto, de acordo com Ko et al. (2011), a identificação molecular das espécies de *Colletotrichum* pode gerar erros taxonômicos, devido a existência de sequências depositadas incorretamente no GenBank identificadas como *Colletotrichum*. Estes erros têm sido minimizados com a utilização de sequências tipo para a comparação. No presente estudo, a identificação das espécies pertencentes a este gênero foi realizada baseando-se no sequenciamento da região ITS e  $\beta$ -Tubulina, sendo possível elucidar a identificação de apenas dois táxons: *Colletotrichum aeshynomenes* UFMGCB 9682 e *C. karstii* UFMGCB 9803.

O complexo *Hypocrea/Trichoderma* compreende um grupo de fungos comumente associado ao solo ou a madeira em decomposição e caracterizados pela produção de

diversas enzimas utilizadas na indústria, como agentes de biocontrole contra patógenos de plantas, bem como patógenos de humanos e outros animais (KUBICEK et al., 2008). De acordo com Druzhinina et al. (2011), poucas espécies de *Hypocrea/Trichoderma* foram isoladas até o momento como endofíticos, embora muitas espécies possam se comportar como endofíticos facultativos. No presente estudo foram encontrados dois táxons pertencentes a este complexo (UFMGCB 9734 e 9736), os quais representam 4% dos táxons identificados.

Ainda dentro de *Sordariomycetes*, outros seis grupos taxômicos foram encontrados em baixa frequência: *Fusarium* (1,7%), *Magnaporthaceae* (1,7%), *Pestalotiopsis* (1%), *Neopestalotiopsis* (0,3%), *Lecythophora* (0,3%) e *Clonostachys* (0,3%). O gênero *Fusarium* é relatado em diversos tipos de ecossistemas naturais como florestas tropicais, temperadas e desertos, assim como em ambientes polares (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Muitas espécies são encontradas como sapróbios no solo ou como colonizadores secundários de raízes de plantas. Outras espécies já foram descritas como patógenos de plantas capazes de causar diferentes doenças. Uma alta diversidade de espécies de *Fusarium* também são relatadas como endofíticos, porém também podem se tornar patógenos quando seus hospedeiros são submetidos a fortes estresses ambientais (WALSH et al., 2010).

Espécies de *Pestalotiopsis* são amplamente distribuídas por todo o planeta e ocorrem em diversos tipos de substratos. Algumas espécies de *Pestalotiopsis* já foram relatadas como sapróbios no solo e em restos vegetais, patógenos de diversas espécies de planta e como endofíticos (XU et al., 2010). Além disso, espécies de *Pestalotiopsis* tem recebido grande atenção nos últimos anos devido aos vários relatos de produção de metabólitos secundários bioativos de interesse na agricultura e medicina (GEHLOT et al., 2012). Também foi encontrado um táxon pertencente ao gênero *Neopestalotiopsis* (UFMGCB 9675). As espécies pertencentes a este gênero foram originalmente classificadas dentro de *Pestalotiopsis*, mas foram recentemente reclassificadas e separadas deste gênero com base em suas características morfológicas e moleculares (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

A família *Magnaporthaceae* representam um pequeno grupo fúngico dentro da classe dos *Sordariomycetes*, sendo composto por 13 gêneros e 98 espécies. Este clado não apresentam sua taxonomia muito bem esclarecida, dificultando a identificação das espécies pertencentes ao grupo (THONGKANTHA et al., 2009). Algumas espécies

dentro desta família vêm sendo relatadas como sérios patógenos de diversas planta no mundo inteiro. No entanto, também podem ser encontradas como endofíticos (THONGKANTHA et al., 2009).

Dentro os grupos encontrados em menor frequência, foi obtido o táxon  
5 *Clonostachys* cf. *rosea* UFMGCB 9708. *Clonostachys rosea*, estágio anamorfo de  
*Bionectria ochroleuca* (Bionectriaceae) (SCHROERS et al., 1999), é um fungo sapróbio  
comumente encontrado em diferentes tipos de solos (SUTTON et al., 1997). Vega et al.  
(2008) relataram a espécie *C. rosea* isolada a partir de folhas de café na Colômbia, como  
10 uma espécie entomopatogênica com atividade contra o coleóptero *Hypothenemus hampei*,  
uma praga devastadora de café em todo o mundo. Além disso, *C. rosea* também já foi  
descrita como endofítico de pepino (CHATTERTON et al., 2008) e como sendo capaz de  
induzir a expressão de genes de defesa em trigo e canola (ROBERTI et al., 2008;  
LAHLALI & PENG, 2014). *Clonostachys rosea* é também descrito como produtor de  
enzimas quitinase e glucanase, bem como peptídeos contra fungos fitopatogênicos (XUE,  
15 2003; ROBERTI et al., 2008; RODRÍGUEZ et al., 2011).

*Dothideomycetes* representou 11,6% dos isolados identificados no presente  
trabalho. A maioria dos grupos taxômicos encontrados dentro desta classe aparece em  
baixa frequência. O táxon mais representativo dentro de *Dothideomycetes* é do gênero  
*Guignardia*, o qual possui sete isolados agrupados e identificados como *Guignardia*  
20 *mangiferae* UFMGCB 9685. Este gênero corresponde a formas teleomorfas de  
*Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos, geralmente, sapróbios ou  
parasitas de folhas. Espécies de *Guignardia* vêm sendo descritas como endofíticas, mas  
são também amplamente relatadas como patógenos de diversas plantas de interesse na  
agricultura (SILVA, 2008).

25 O gênero *Bipolaris* e a ordem *Botryosphaeriales* foram representantes  
minoritários dentro da classe dos *Dothideomycetes*, correspondo a 2,5% dos táxons  
identificados. Espécies pertencentes a estes grupos taxonômicos incluem um grande  
número de patógenos de folhas e raízes de diversos tipos vegetais (LIU et al., 2012;  
MANAMGODA et al., 2014). A maioria dos táxons encontrados dentro da classe  
30 *Dothideomycetes* se apresenta como singletos (*Pseudocercospora* sp., *Pallidocercospora*  
*ventilago*, *Massarinaceae* sp., *Mycosphaerella stramenti* e *Paraconiothyrium* sp.  
*Pleosporales* sp.), os quais são comumente isolados como patógenos de planta,  
endofíticos e sapróbios. Algumas espécies de *Pseudocercospora* podem ser utilizadas no

controle biológico de ervas daninhas (VERKLEY et al., 2004; CROUS et al., 2013a; CROUS et al., 2013b).

A classe *Leotimycetes* representa 3,5% dos táxons associados a *V. gigantea*. Espécies pertencentes à esta classe são abundantemente encontrados em ambientes temperados do hemisfério norte. No entanto, muitos membros deste grupo possuem ampla distribuição geográfica (WANG et al., 2006). Pertencentes à esta classe foram encontradas quatro unidades taxonômicas distintas (*Helotiales* sp. UFMGCB 9960, *Pezicula sporulosa* UFMGCB 9903, *Coccomyces* sp. UFMGCB 9954 e *Myxotrichum* sp. UFMGCB 9937). *Coccomyces* (*Rhytismataceae*) é um gênero relatado composto por cerca de 116 espécies e é representado por fungos ligninolíticos (KIRK et al., 2008). Hirose et al. (2013) recuperaram *Coccomyces sinensis* como um decompositor endófito de *Camellia japonica*. O gênero *Myxotrichum* (*Myxotrichaceae*) inclui muitas espécies celulolíticas e micorrízicas que já foram encontradas em associação com *Ericaceae* e *Epacridaceae* (CANNON & KIRK, 2007). *Pezicula* (*Dermateaceae*) inclui espécies que crescem endofiticamente, incluindo a espécie *P. sporulosa*, que já foi encontrada associada à arbustos e árvores, enquanto algumas outras espécies do gênero são relatadas como parasitas (ABELN et al., 2000).

Em menor proporção foram encontrados táxons representantes da classe *Eurotiomycetes* (2,5% dos táxons identificados). Foram encontrados um táxon pertencente à família *Herpotrichiellaceae* (UFMGCB 9972) e três táxons pertencentes ao gênero *Penicillium*, dentro do qual foram identificadas as espécies *Penicillium quebecense* UFMGCB 9928, *P. adametzii* UFMG 9894 e *P. herquei* UFMGCB 9829.

No presente estudo, foram encontrados três táxons que não se encontram classificados em nenhuma das classes fúngicas descrita. Tratam-se de grupos fúngicos que apresentam o micélio estéril, o que dificulta a elucidação taxonômica. A identificação dos indivíduos isolados foi determinada por meio do sequenciamento da região ITS. Devido à ausência de banco de dados completos não é possível utilizar outras regiões para melhor elucidação taxonômica. Os táxons identificados foram: *Hyaloscyphaceae* sp. UFMGCB 9943, Fungal sp. UFMGCB9970 e *Crucellisporiopsis marquesiae* UFMGCB 9939. O gênero *Crucellisporiopsis* inclui apenas três espécies aceitas (NAG RAJ, 1993). *Crucellisporiopsis marquesiae* foi recentemente descrita como uma nova espécie que ocorre em galhos de *Marquesia acuminata* (*Dipterocarpaceae*) na Zâmbia, África (CROUS et al., 2014).

#### 5.4 Diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas e raízes adventícias de *Vellozia gigantea*

A abundância de fungos endofíticos associados às folhas e raízes de *V. gigantea* variou entre 0,35 e 10,2% (Tabela 2). Para a determinação destes valores foram considerados apenas 285 isolados, uma vez que não foi possível realizar a identificação de 41 isolados por meio da metodologia utilizada. Um total de 87 táxons distintos (fungos filamentosos e leveduras) associados à *V. gigantea* foram identificados e os gêneros *Xylaria*, *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Muscodor*, *Colletotrichum* e *Trichoderma* foram os mais abundantes, respectivamente e representaram táxons comumente relatados em diferentes plantas de ambientes tropicais (CARVALHO et al., 2012, ROSA et al., 2012, VIEIRA et al., 2014, FERREIRA et al., 2015, SILVA-HUGHES et al., 2015). Dentre as 87 unidades taxonômicas distintas obtidas no presente estudo, 62 foram encontradas como singletos (um ou dois representantes), representando a porção minoritária da comunidade endofítica associada à *V. gigantea*. Estes táxons estão representados por espécies pertencentes aos gêneros *Clonostachys*, *Crucellisporiopsis*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Lecythophora*, *Muscodor*, *Mycosphaerella*, *Neopestalotiopsis*, *Pallidocercospora*, *Paraconiothyrium*, *Penicillium*, *Pseudocercospora* e *Xylaria*.

**Tabela 2.** Abundância dos fungos endofíticos associados às folhas e raízes adventícias de *V. gigantea*.

Táxon	Tecido de origem	Nº de isolados	Abundância (%)
<i>Xylaria berteri</i>	F, R	29	10,2
<i>Diaporthe</i> sp. 1	F, R	27	9,5
<i>Nigrospora oryzae</i>	F, R	27	9,5
<i>Muscodor</i> sp. 1	F, R	20	7
<i>Colletotrichum aeschynomenes</i>	F, R	13	4,6
<i>Trichoderma viride</i>	F, R	10	3,5
<i>Diaporthe</i> sp. 2	F, R	8	2,8
<i>Colletotrichum karstii</i>	F, R	7	2,5
<i>Guignardia mangiferae</i>	F, R	7	2,5
<i>Diaporthe</i> sp. 3	F, R	5	1,75
<i>Diaporthe miriciae</i>	F, R	5	1,75
<i>Dipodascaceae</i> sp.	F, R	5	1,75
<i>Diaporthe</i> sp. 4	F, R	4	1,4
<i>Diaporthe</i> sp. 5	F, R	4	1,4
<i>Fusarium</i> sp.	F, R	4	1,4

<i>Xylariaceae</i> sp. 1	F, R	4	1,4
<i>Bipolaris drechsleri</i>	F, R	3	1
<i>Coccomyces</i> sp.	F	3	1
<i>Diaporthe</i> sp. 6	F	3	1
<i>Diaporthe</i> sp.7	F, R	3	1
<i>Trematosphaeriaceae</i> sp.	F	3	1
<i>Muscodor</i> sp. 2	F	3	1
<i>Botryosphaeriales</i> sp. 1	R	3	1
<i>Penicillium herquei</i>	R	3	1
<i>Pestalotiopsis australasiae</i>	F, R	3	1
<i>Helotiales</i> sp.	F, R	3	1
<i>Yamadazyma michaelii</i>	F	2	0,7
<i>Yamadazyma riverae</i>	F	2	0,7
<i>Hyaloscyphaceae</i> sp.	F, R	2	0,7
<i>Diaporthe</i> sp. 8	F	2	0,7
<i>Diaporthe</i> sp. 9	R	2	0,7
<i>Diaporthe</i> sp. 10	F, R	2	0,7
<i>Magnaporthaceae</i> sp. 1	F, R	2	0,7
<i>Dothideomycetes</i> sp.	F	2	0,7
<i>Magnaporthaceae</i> sp. 2	F	2	0,7
<i>Myxotrichum</i> sp.	R	2	0,7
<i>Penicillium citrinum</i>	F, R	2	0,7
<i>Pezicula sporulosa</i>	R	2	0,7
<i>Mycosphaerellaceae</i> sp.	F	2	0,7
<i>Tetraplophaeriaceae</i> sp.	R	2	0,7
<i>Trichoderma effusum</i>	R	2	0,7
<i>Botryosphaeriales</i> sp. 2	F	1	0,35
<i>Pleosporineae</i> sp.	F	1	0,35
<i>Lodderomyces (Candida) parapsilosis</i>	R	1	0,35
<i>Herpotrichiellaceae</i> sp.	R	1	0,35
<i>Clonostachys</i> cf. <i>rósea</i>	R	1	0,35
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	F	1	0,35
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	F	1	0,35
<i>Crucellisporiopsis marquesiae</i>	R	1	0,35
<i>Daldinia loculata</i>	R	1	0,35
<i>Diaporthe acaciarum</i>	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 11	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 12	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 13	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 14	R	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 15	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 16	R	1	0,35
<i>Diaporthe eucalyptorum</i>	R	1	0,35

<i>Diaporthe</i> sp. 17	R	1	0,35
<i>Diaporthe kongii</i>	F	1	0,35
<i>Diaporthe masirevicii</i>	R	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 18	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 19	R	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 20	F	1	0,35
<i>Diaporthe</i> sp. 21	R	1	0,35
Fungal sp.	R	1	0,35
<i>Fusarium</i> sp.	F	1	0,35
Xylariaceae sp. 2	R	1	0,35
<i>Lecythophora decumbens</i>	R	1	0,35
<i>Muscodor equiseti</i>	F	1	0,35
<i>Muscodor oryzae</i>	F	1	0,35
<i>Muscodor suthepensis</i>	F	1	0,35
<i>Mycosphaerella stramenti</i>	F	1	0,35
<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i>	R	1	0,35
Pleosporales sp.	F	1	0,35
<i>Pallidocercospora</i> sp.	F	1	0,35
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	R	1	0,35
<i>Paraphaeosphaeria parmeliae</i>	R	1	0,35
<i>Penicillium quebecense</i>	F	1	0,35
<i>Peyronellaea</i> sp.	F	1	0,35
<i>Coniochaetales</i> sp.	F	1	0,35
<i>Pseudocercospora norchiensis</i>	F	1	0,35
<i>Sordariomycetes</i> sp.	R	1	0,35
Magnaporthaceae sp. 3	F	1	0,35
Massarinaceae sp. 1	F	1	0,35
Massarinaceae sp. 2	F	1	0,35
<i>Xylaria arbuscula</i>	R	1	0,35
<b>Total</b>		<b>285</b>	<b>100</b>

Atualmente, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de conhecer a comunidade de fungos endofíticos associados a plantas presentes nos Campos Rupestres do Brasil. No entanto, os trabalhos já realizados têm demonstrado que plantas presentes em tal ambiente possuem uma rica e diversificada comunidade de fungos endofíticos associados (OKI et al., 2016). Rodrigues (2010) caracterizou a comunidade de fungos endofíticos associados com *Vellozia compacta*, planta amplamente encontrada nos campos rupestres brasileiros e popularmente conhecida como “canela-de-ema”. Em seu estudo, o autor encontrou uma promissora comunidade de fungos endofíticos associados com folhas e raízes de *V. compacta*, a qual é composta por representante dos gêneros



*Acarospora*, *Chaetomium*, *Diaporthe*, *Gelasinospora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Xylaria*. Vieira e etal. (2014) avaliaram a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *Baccharis trimera*, planta encontrada nas Savana brasileira, e identificou 25 táxons distintos e os gêneros mais foram *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cochliobolus*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Guignardia*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Podospora*, *Preussia*, *Sporormiella* e *Xylaria*.

De acordo com Melo (2008), uma das metodologias mais seguras de se mensurar a diversidade de um ambiente é por meio do uso de índices de diversidade. Tais índices proporcionam vantagens tais como combinar diferentes componentes de diversidade, expressar matematicamente os resultados obtidos, além da independência em relação ao esforço amostral. Para determinar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados à *V. gigantea* foram utilizados índices de diversidade (Fisher- $\alpha$ ), dominância (Simpson) e riqueza (Margalef). Desta forma, a diversidade de espécies associadas à *V. gigantea* foi calculada por meio do índice de Fisher- $\alpha$  e considerada alta, tendo apresentado valor de 42,7. Quanto maior o valor de Fisher- $\alpha$ , maior a diversidade de espécies do ambiente analisado. Esta comunidade fungica também se apresentou com um alto índice de riqueza de espécies (Margalef = 15,2), indicando a presença de um alto número de diferentes espécies dentro da comunidade. O cálculo de dominância foi realizado utilizando o índice de Simpson. Valores de Simpson próximos a 1 demonstram uma comunidade com alta diversidade e com ausência de dominância entre os táxons encontrados. A comunidade de fungos endofíticos associados de *V. gigantea* apresentou índice de Simpson de 0,96, sugerindo que poucos táxons foram dominantes e se distribuíram de forma homogênea dentro da comunidade.

Os fungos endofíticos têm sido relatados como capazes de propiciar uma maior adaptação à suas plantas hospedeiras conferindo tolerância ao estresse abiótico e biótico, por meio da produção de metabólitos tais como hormônios, pigmentos, produtos naturais e polissacarídeos que podem contribuir para que a planta aumente sua taxa de sobrevivência em ambientes extremos. A comunidade fúngica endofítica de *V. gigantea* foi considerada rica, diversa e complexa, incluindo táxons mutualistas, sapróbios e parasitas, mas também apresentaram fungos com a capacidade de controlar fitopatogênicos e insetos, fungos xerofíticos adaptados ao fogo e fungos endófitos-micorrizicos. De acordo com Alves (1994), as populações de *V. gigantea* são restritas aos Campos

Rupestres e podem ter centenas de anos de idade, mostrando uma alta adaptação para a sobrevivência nos campos rochosos brasileiros. Sugerimos que sua microbiota endofítica natural pode contribuir diretamente para sua adaptação e, conseqüentemente, com sua idade milenar. No entanto, este estudo só permite especulação sobre a interação natural entre os fungos endofíticos e seu hospedeiro, e para elucidar os detalhes de sua simbiose estudos adicionais são necessários.

### 5.5 Determinação da atividade antimicrobiana

Um total de 376 extratos diclorometânicos foram produzidos. Destes, 326 foram obtidos a partir do cultivo dos fungos endofíticos e 50 a partir das folhas e raízes dos espécimes de *V. gigantea* amostrados (32 de folhas e 18 de raízes). Todos os extratos foram submetidos a ensaios de triagem para determinação da atividade antimicrobiana. Dos 326 extratos fúngicos, apenas 10 (3%) apresentaram inibição superior a 70% frente pelo menos um dos micro-organismos alvos. No entanto, entre estes extratos, apenas seis permaneceram ativos após o processo de recultivo (Tabela 3). Perdas de atividades são comumente relatadas após cultivos sucessivos. Uma vez que, nem sempre é possível estabelecer uma correlação direta entre os metabólitos produzidos por fungos endofíticos quando estes se encontram em seu hospedeiro e quando os mesmos são cultivados externamente em meios de cultura (STROBEL et al., 2003).

Com relação aos extratos vegetais produzidos a partir de folhas e raízes de *V. gigantea*, apenas um dos extratos foliares apresentou atividade, sendo capaz de inibir em 89% a linhagem de *C. albicans* na concentração de 125 µg/mL. No entanto, todos os extratos produzidos a partir das raízes apresentaram atividades contra *S. aureus* em concentrações que variaram entre 125 e 250 µg/mL (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana dos extratos brutos vegetais e extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados a *Vellozia gigantea*.

Código	Bactérias						Leveduras				Fungo filamentososo	
	<i>E. coli</i> <sup>b</sup>		<i>S. aureus</i> <sup>c</sup>		<i>P. aeruginosa</i> <sup>d</sup>		<i>C. albicans</i> <sup>e</sup>		<i>C. krusei</i> <sup>f</sup>		<i>C. sphaerospermum</i> <sup>g</sup>	
	Inibição	CIM	Inibição	CIM	Inibição	CIM	Inibição	CIM	Inibição	CIM	Inibição	CIM
UFMGCB <sup>a</sup>	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)	(%)	(µg/mL)
9664	23 ± 56	-	20 ± 3	-	0 ± 3	-	0 ± 10	-	24 ± 20	-	<b>72 ± 41</b>	125
9720	0 ± 18	-	<b>98 ± 2</b>	125	0 ± 11	-	22 ± 15	-	0 ± 12	-	64 ± 12	-
9736	0 ± 56	-	<b>97 ± 4</b>	125	0 ± 23	-	40 ± 28	-	13 ± 3	-	58 ± 14	-
9829	0 ± 23	-	<b>83 ± 9</b>	62,5	0 ± 0	-	30 ± 16	-	0 ± 2	-	46 ± 28	-
9894	0 ± 14	-	<b>96 ± 5</b>	62,5	0 ± 2	-	8 ± 8	-	0 ± 1	-	46 ± 28	-
9928	0 ± 21	-	0 ± 4	-	0 ± 24	-	<b>98 ± 34</b>	62,5	16 ± 16	-	<b>89 ± 17</b>	62,5
Vg1 <sup>h</sup>	28 ± 0	-	0 ± 5	-	24 ± 5	-	<b>89 ± 19</b>	125	0 ± 9	-	0 ± 0	-
Vg2R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>85 ± 22</b>	250	31 ± 1	-	35 ± 9	-	8 ± 2	-	33 ± 13	-
Vg6R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>88 ± 23</b>	250	30 ± 1	-	7 ± 9	-	0 ± 11	-	23 ± 7	-
Vg7R <sup>i</sup>	0 ± 1	-	<b>96 ± 62</b>	250	26 ± 3	-	35 ± 10	-	9 ± 12	-	44 ± 9	-
Vg8R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>92 ± 1</b>	250	26 ± 2	-	0 ± 1	-	10 ± 11	-	8 ± 8	-

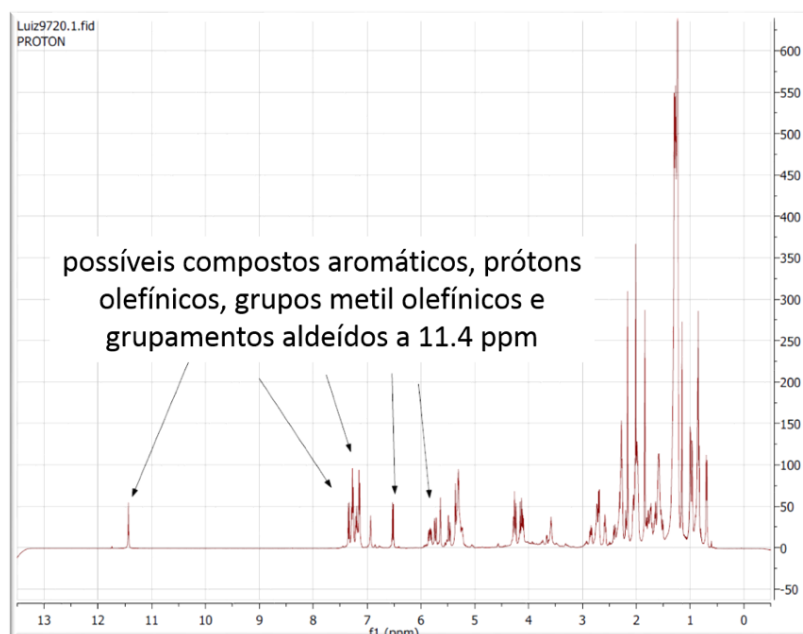
Vg9R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>94 ± 11</b>	250	30 ± 0	-	2 ± 12	-	0 ± 6	-	8 ± 31	-
Vg10R <sup>i</sup>	0 ± 2	-	<b>89 ± 10</b>	125	32 ± 0	-	22 ± 11	-	0 ± 7	-	40 ± 10	-
Vg11R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>91,7 ± 6</b>	250	24 ± 1	-	12 ± 12	-	0 ± 7	-	34 ± 19	-
Vg14R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>91 ± 2</b>	250	22 ± 3	-	0 ± 20	-	8 ± 2	-	2 ± 1	-
Vg19R <sup>i</sup>	0 ± 18	-	<b>96 ± 7</b>	250	26 ± 2	-	4 ± 14	-	0 ± 36	-	1 ± 11	-
Vg20R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>90 ± 6</b>	250	21 ± 1	-	3 ± 2	-	0 ± 6	-	46 ± 23	-
Vg21R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>75 ± 23</b>	125	20 ± 1	-	21 ± 17	-	0 ± 3	-	40 ± 28	-
Vg23R <sup>i</sup>	0 ± 1	-	<b>88 ± 23</b>	250	22 ± 1	-	18 ± 5	-	15 ± 9	-	42 ± 5	-
Vg24R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>94 ± 2</b>	250	17 ± 0	-	18 ± 21	-	25 ± 10	-	0 ± 1	-
Vg27R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>80 ± 10</b>	125	24 ± 0	-	21 ± 18	-	0 ± 3	-	0 ± 36	-
Vg30R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>93 ± 20</b>	250	11 ± 0	-	35 ± 18	-	14 ± 9	-	21 ± 23	-
Vg31R <sup>i</sup>	0 ± 0	-	<b>78 ± 8</b>	125	21 ± 1	-	27 ± 9	-	22 ± 9	-	0 ± 16	-
Vg32R <sup>i</sup>	0 ± 3	-	<b>73 ± 20</b>	250	37 ± 3	-	50 ± 11	-	5 ± 3	-	45 ± 33	-

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. <sup>b</sup>*Escherichia coli*; <sup>c</sup>*Staphylococcus aureus*; <sup>d</sup>*Pseudomonas aeruginosa*; <sup>e</sup>*Candida albicans*; <sup>f</sup>*Candida krusei*; <sup>g</sup>*Cladosporium sphaerospermum*. <sup>h</sup>Extrato produzido a partir das folhas de *V. gigantea*. <sup>i</sup>Extratos produzidos a partir das raízes de *V. gigantea*. CIM=Concentração Inibitória Mínima.

## 5.6 Seleção de extratos para a análise química

Após a triagem realizada, os extratos produzidos a partir dos fungos *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720, *Trichoderma effusum* UFMGCB 9736, *Penicillium herquei* UFMGCB 9829, *Penicillium adametzii* UFMGCB 9894, *Diaporthe* sp. UFMGCB 9664 e *Penicillium quebecense* UFMGCB 9928 foram submetidos a experimentos de espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  a fim de se realizar uma avaliação inicial do perfil de substâncias presentes em cada extrato bruto selecionado. Os extratos de *T. effusum* UFMGCB 9736, *P. herquei* UFMGCB 9829, *P. adametzii* UFMGCB 9894, *Diaporthe* sp. UFMGCB 9664 e *P. quebecense* UFMGCB 9928 apresentaram sinais com presença majoritária de ácidos graxos e, desta forma, foram submetidos a análise quantitativa e qualitativa destas substâncias por meio da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Detectores de Ionização de Chamas (CG-DIC).

Por outro lado, o extrato de *D. miriciae* UFMGCB 9720 apresentou sinais com presença de possíveis metabólitos aromáticos, prótons olefínicos, grupos metil olefínicos e grupamentos aldeídos a 11,4 ppm (Figura 8), indicando a presença de possíveis substâncias aromáticas. Desta forma, *D. miriciae* UFMGCB 9720 foi recultivado em larga escala para o isolamento biomonitorado dos metabólitos de interesse.



20 **Figura 8.** Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato bruto produzido por *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720, demonstrando a presença de possíveis substâncias aromáticas de interesse.

## 5.7 Determinação da atividade biológica dos extratos brutos selecionados

Os extratos dos fungos *D. miriciae* UFMGCB 9720, *T. effusum* UFMGCB 9736, *P. herquei* UFMGCB 9829, *P. adametzii* UFMGCB 9894, *Diaporthe* sp. UFMGCB 9664, *P. quebecense* UFMGCB 9928 e o extrato vegetal obtido a partir das raízes foram submetidos a ensaios biológicos para determinação de seus potenciais antimalárico, leishmanicida, antifúngico, antibacteriano e herbicida. Todos os ensaios foram realizados por técnicos especializados do *National Center for Natural Products Research* (NCNPR/USA).

O extrato de *Diaporthe* sp. UFMGCB 9664, que inicialmente demonstrou ser capaz de inibir o crescimento do fungo *C. sphaerospermum*, não apresentou nenhuma atividade biológica nos ensaios realizados no NCNPR/USA. Os extratos de *T. effusum* UFMGCB 9736, *P. herquei* UFMGCB 9829, *P. adametzii* UFMGCB 9894 e *P. quebecense* UFMGCB 9928 exibiram atividade frente pelo menos um dos alvos testados (Tabela 4).

O extrato de *D. miriciae* UFMGCB 9720, o qual foi selecionado para isolamento das substâncias de interesse, foi capaz de inibir o crescimento das linhagens de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *S. aureus* MRS. Também foi observada atividade antimalárica, sendo capaz de inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (D6) em 96% na concentração de 15,867 ng/mL.

O extrato das raízes de *V. gigantea* foi ativo contra *C. neoformans*, *S. aureus* MRS e *P. falciparum* sensíveis a cloroquina (D6). Além disso, o extrato da raiz de *V. gigantea* também foi submetido a ensaios de atividade herbicida, o qual foi capaz de inibir em 100% a germinação de sementes dos modelos de monocotiledônea e dicotiledônea avaliados.

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana dos extratos brutos selecionados para caracterização química.

Táxon	UFMGCB <sup>a</sup>	Leveduras			Fungos Filamentosos			Bacterias			Actinobacteria	Malária <sup>c</sup>
		CA	CG	CK	CN	AF	SA	SA MRS	EC	PA	MI	PC (D6)
		<i>Diaporthe miriciae</i>	9720	<b>148,8<sup>b</sup></b>	<b>11,4</b>	<b>40,8</b>	>200	>200	>200	<b>65.8</b>	>200	>200
<i>Trichoderma effusum</i>	9736	>200	>200	>200	>200	>200	>200	<b>64.6</b>	>200	>200	<b>31.98</b>	24
<i>Penicillium herquei</i>	9829	>200	>200	>200	>200	>200	<b>24.4</b>	<b>9.98</b>	>200	>200	>200	17
<i>Penicillium adametzii</i>	9894	>200	>200	>200	>200	>200	>200	<b>23.24</b>	>200	>200	>200	36
<i>Penicillium quebequense</i>	9928	<b>10,81</b>	<b>18.81</b>	<b>14.89</b>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	39
VgR		>200	>200	>200	<b>25,75</b>	>200	>200	<b>47,37</b>	>200	>200	>200	<b>89</b>
Controle de drogas	Anfotericina B	<b>0.3</b>	<b>0.3</b>	<b>0.6</b>	<b>0.3</b>	<b>1.3</b>	-	-	-	-	-	-
	Ciprofloxacina	-	-	-	-	-	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0.1</b>	<b>0.4</b>	-

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Cultura de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.. VgR = extrato de raiz de *Vellozia gigantea*.<sup>b</sup>Concentração em que os extratos testados apresentaram atividade contra leveduras, fungos filamentosos e actinobactéria (Concentração do teste 200 – 8 µg/mL). <sup>c</sup>Contra *P. falciparum* os extratos foram testados a 15.866 µg/mL e os resultados mostrados em <sup>d</sup>Porcentagem de inibição. CA = *Candida albicans*; CG = *Candida glabrata*; CK = *Candida krusei*; CN = *Cryptococcus neformans*; AF = *Aspergillus fumigatus*; SA = *Staphylococcus aureus*; SA MRS = *Staphylococcus aureus methicillin resistant*; EC = *Escherichia coli*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; MI = *Mycobacterium intracellulare*; PC (D6) *Plasmodium falciparum* sensível a cloroquina. VgR = extrato produzido a partir das raízes de *V. gigantea*.

## 5.8 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos

Análises de CG-DIC dos extratos produzidos de *T. effusum* UFMGCB 9736, *P. herquei* UFMGCB 9829, *P. adametzii* UFMGCB 9894, *Diaporthe* sp. UFMGCB 9664 e *P. quebecense* UFMGCB 9928 confirmaram a presença de uma mistura de seis ácidos graxos (Tabela 5). Os ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico e linoléico foram detectados em todos os extratos brutos avaliados dentro do presente trabalho. O ácido capróico foi encontrado em pequenas quantidades apenas no isolado *P. adametzii* UFMGCB 9894, enquanto o ácido palmitoléico foi detectado apenas no isolado *T. effusum* UFMGCB 9736 também em pequenas quantidades.

Os ácidos graxos capróico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico e linoléico já foram reportados com atividade antimicrobiana (antifúngica, antibacteriana, antimicobacteriana) e atividade antitumoral (POHL et al. 2011; ROSA et al. 2013). Os ácidos graxos pertencem a uma classe de moléculas fisiologicamente importante envolvidas no processo de armazenagem de energia, constituição de membrana e vias de sinalização (LIU et al. 2008).



**Tabela 5.** Quantificação (%) de ácidos graxos em extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos associados à *Vellozia gigantea*.

Ácidos graxos	Extratos dos fungos endofíticos				
	<i>Trichoderma effusum</i> UFMGCB 9736	<i>Penicillium herquei</i> UFMGCB 9829	<i>Penicillium adametzii</i> UFMGCB 9894	<i>Penicillium quebecense</i> UFMGCB 9928	<i>Diaporthe</i> sp. UFMGCB 9664
Palmítico (16:0)	37,5 <sup>a</sup>	27,35	21,8	16,7	29,5
Estearico (18:0)	2,9	11,8	9,4	9,9	8,4
Oléico (18:1n9c)	23,2	23,35	37,8	50	44,8
(LA) Linoléico (18:2n6c)	28,3	37,5	19,9	23,4	17,3
Capróico (6:0)	-	-	11	-	-
Palmitoléico (16:1)	8	-	-	-	-

<sup>a</sup>Valor em porcentagem, - = não detectado.

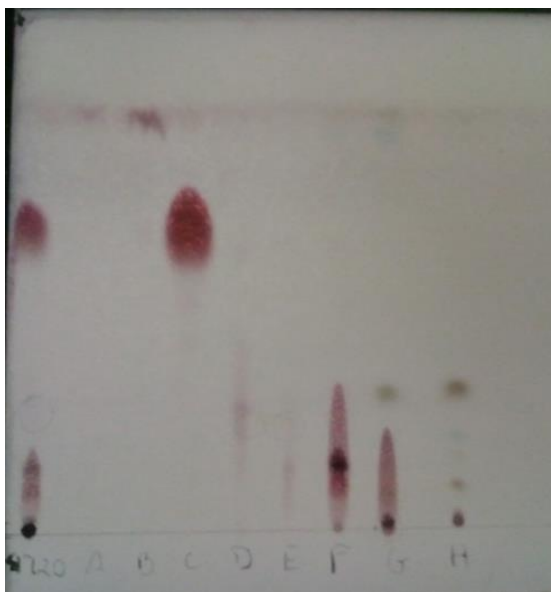
## 5.9 Fracionamento químico biomonitorado do extrato de *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720

O extrato de *D. miriciae* UFMGCB 9720 foi selecionado para o fracionamento químico biomonitorado (Fluxograma – Anexo 1) e cultivado em larga escala em 350  
5 placas de Petri contendo o meio BDA, as quais renderam 4,127 g de extrato diclorometânico. Inicialmente o extrato foi submetido a análises de CCD em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel hexano/acetato de etila 5:5, hexano/acetato de etila 7:3, hexano/acetato de etila 8:2 hexano/éter 5:5 e hexano/acetona 8:2. Após a revelação em Godin a melhor  
10 condição foi obtida com a mistura hexano/acetato de etila.

A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). Para tanto, 1,149 g de 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  
15 realizada em um Biotage XP-Sil, 100g, SNAP cartridge com fluxo de 40 mL/min, tendo como gradiente hexano:acetato de etila, com 0:100 a 100:0 durante 3.024 mL.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em 112 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 oito  
20 frações [A (1-16), B (17-20), C (21-29), D (30-40), E (41-43), F (44-55), G (56-87) e H (88-112)]. Ao final do processo a coluna foi lavada com metanol 100% para remoção do extrato retido na sílica. A partir desta lavagem foi gerada a nona fração (I). As frações obtidas foram concentradas em rota vapor e os rendimentos foram calculados [A (7,7 mg), B (9,1 mg), C (441,4 mg), D (9,3 mg), E (11,2 mg), F (133,8 mg), G (46,2 mg), H  
25 (12 mg) e I (479,3 mg)]. Com o objetivo de se obter um perfil de cada fração, estas foram submetidas a CCD (hexano/acetato de etila 8:2) (Figura 9).

Uma alíquota contendo 1 mg de cada fração foi submetida aos ensaios antimalárico, leishmanicida, antifúngico e antibacteriano para determinação da fração ativa. Após o fracionamento do extrato bruto houve uma perda das atividades antifúngicas  
30 e antibacterianas, uma vez que nenhuma das frações obtidas demonstrou atividade contra os micro-organismos alvos testados. No entanto, foi possível detectar atividade antimalárica em duas das frações obtidas (Tabela 6).



**Figura 9.** Cromatografia de camada delgada das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto produzido a partir do fungo *Diaporthe miricidae* UFMGCB 9720. Fase móvel hexano/acetato de etila 8:2.

5

**Tabela 6.** Atividade antimalárica das frações obtidas a partir do extrato de *Diaporthe miricidae* UFMGCB 9720.

Frações	<i>Plasmodium falciparum</i>				
	D6 <sup>a</sup> - CI <sub>50</sub>	D6 - IS	W2 <sup>b</sup> - CI <sub>50</sub>	W2 - IS	VERO <sup>c</sup> CI <sub>50</sub>
Fração A	>4760	1	>4760	1	>4760
Fração B	>4760	1	>4760	1	>4760
Fração C	>4760	1	>4760	1	>4760
Fração D	>4760	1	>4760	1	>4760
Fração E	>4760	1	>4760	1	>4760
Fração F	>4760	1	>4760	1	>4760
Fração G	>4760	1	>4760	1	>4760
<b>Fração H</b>	<b>3024,8</b>	<b>&gt;1.6</b>	<b>3754,2</b>	<b>&gt;1.3</b>	<b>&gt;4760</b>
<b>Fração I</b>	<b>&lt;528.9</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&lt;528.9</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&gt;4760</b>

<sup>a</sup>*Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (D6), <sup>b</sup> *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (W2), <sup>c</sup>Células VERO, CI<sub>50</sub> = Concentração Inibitória de 50%. IS=Índice de seletividade. Concentração do teste: 4760 - 528.9 ng/mL.

A fração H exibiu baixa atividade contra ambas as linhagens de *P. falciparum* com valores de CI<sub>50</sub> de 3024,8 ng/mL para *P. falciparum* D6 e 3754,2 ng/mL para *P. falciparum* W2. A fração H ainda desempenhou baixos índices de seletividade contra

ambas as linhagens. Considerando tais pontos e aliado ao baixo rendimento da fração, esta foi considerada não interessante para elucidação do composto ativo. A fração I, lavagem do resíduo retido na coluna, apresentou promissora atividade antimalárica contra ambas as linhagens de *P. falciparum*. Demonstrou valores de  $CI_{50}$  inferior a 528,9 ng/mL para ambas as linhagens avaliadas, exibiu alto índice de seletividade e não apresentou atividade contra células VERO, indicando que o composto não apresenta citotoxicidade. Desta forma, a fração I foi selecionada para continuidade do isolamento dos possíveis compostos ativos.

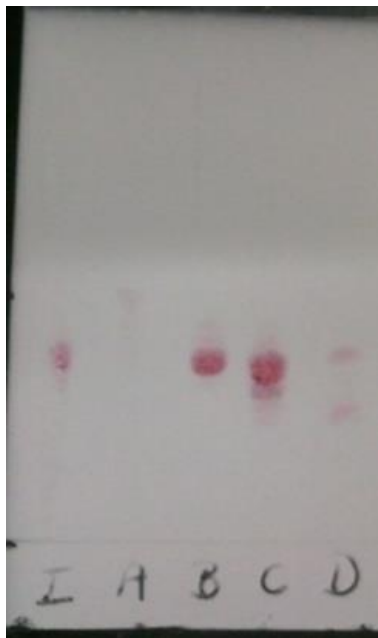
Por meio de análises de CCD a fração I não se apresentou pura, sendo desta forma necessário a realização de um novo fracionamento. Inicialmente a fração I foi novamente submetida a análises de CCD com um painel de misturas de solventes como fase móvel hexano/acetato de etila 5:5, hexano/acetato de etila 8:2, hexano/éter 8:2, hexano/acetona 9:1, hexano/acetona 5:5 e hexano/isopropanol 9:1. Após a revelação em Godin a melhor condição foi obtida com a mistura hexano/isopropanol.

A cromatografia em coluna da fração I foi novamente realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage<sup>®</sup> Isolera<sup>™</sup> One (Biotage, Uppsala, Suécia). Para tanto, 470 gramas da fração foi dissolvido em 2 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63  $\mu$ m, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge com fluxo de 40 mL/min, tendo como gradiente hexano/isopropanol, com 100:0 a 80:20 durante 2400 mL, seguido com 80:20 a 50:50 durante 1200 mL, posteriormente com 50:50 a 0:100 durante 152mL e 0:100 durante 396 mL.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em 169 tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida a CCD (Hexano/Isopropanol 9:1), e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em cinco frações [A' (1-54), B' (55-59), C' (60-70), D' (71-77) e E' (78-169)]. As frações obtidas foram concentradas em rota vapor e os rendimentos foram calculados [A' (18,8 mg), B' (69,5 mg), C' (168,7 mg), D' (15,2 mg) e E' (23,5 mg)]. Com o objetivo de se obter um perfil de cada fração, estas foram submetidas a CCD (Hexano/Isopropanol 9:1) (Figura 10).

Uma alíquota contendo 1 mg de cada fração foi submetida ao ensaio antimalárico para determinação da fração ativa. As frações B', C' e D' apresentaram atividades promissoras para ambas a linhagens de *P. falciparum*. Demonstraram valores de  $CI_{50}$

inferior a 528,9 ng/mL para ambas as linhagens avaliadas, exibiram alto índice de seletividade e não apresentaram atividade contra células VERO, indicando que o composto não apresenta citotoxicidade (Tabela 7).



5

**Figura 10.** Cromatografia de camada delgada das frações obtidas a partir do fracionamento da fração I (obtida a partir do fracionamento do extrato bruto produzido a partir do fungo *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720). Fase móvel Hexano/Isopropanol 9:1.

10

**Tabela 7.** Atividade antimalárica das frações obtidas do fracionamento da fração I.

Frações	<i>Plasmodium falciparum</i>				
	D6 <sup>a</sup> - CI <sub>50</sub>	D6 - IS	W2 <sup>b</sup> - CI <sub>50</sub>	W2 - IS	VERO <sup>c</sup> CI <sub>50</sub>
Fração A'	3025	>1.6	2571	>2	>4760
<b>Fração B'</b>	<b>&lt;529</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&lt;529</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&gt;4760</b>
<b>Fração C'</b>	<b>&lt;529</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&lt;529</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&gt;4760</b>
<b>Fração D'</b>	<b>&lt;529</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&lt;529</b>	<b>&gt;9</b>	<b>&gt;4760</b>
Fração E'	>4760	1	>4760	1	>4760

<sup>a</sup>*Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (D6), <sup>b</sup>*Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (W2), <sup>c</sup>Células VERO, CI<sub>50</sub> = Concentração Inibitória de 50%. IS=Índice de seletividade. Concentração do teste: 4760 - 529 ng/mL. Negrito: frações ativas.

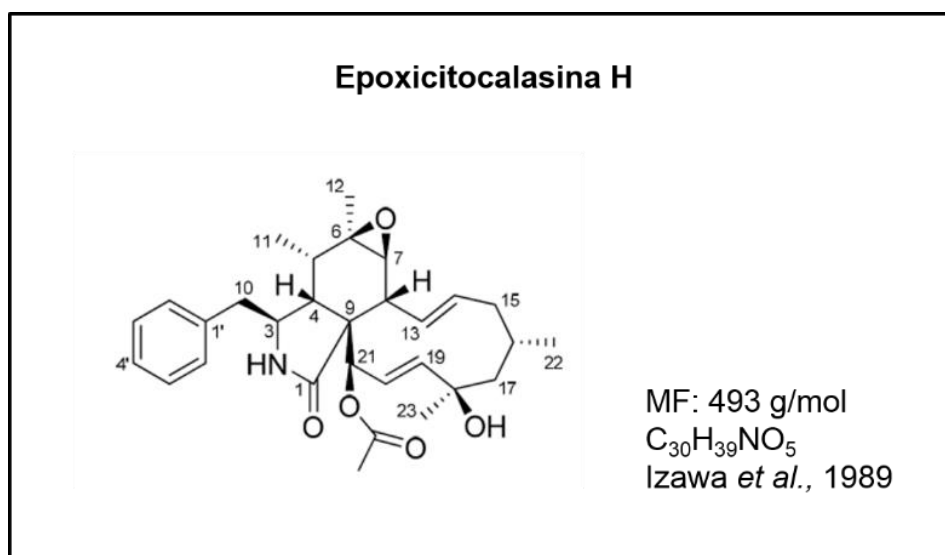
15

Por meio da análise da CCD realizada com as frações obtidas foi possível observar que as frações B' e C' apresentaram o mesmo composto majoritário. Sendo que a fração

B' se mostrou pura, enquanto na fração C' foi possível detectar a presença de outros compostos. Desta forma, a fração B' foi selecionada para elucidação da substância ativa. Com relação a fração D', nesta foi possível detectar a presença de compostos diferentes daqueles presentes nas frações B' e C'. No entanto, a fração D' apresentou baixo rendimento (15,2 mg), sendo insuficiente para purificação.

### 5.10 Elucidação estrutural do constituinte químico

A frações B' com atividade antimalárica foi submetida a experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 e 90, e COSY. Os sinais exibidos pelos espectros desta fração juntamente analisados com os dados obtidos a partir do CL-MS/MS, como fórmula molecular ( $m/z$  494.29065  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{NO}_5$ , 494.29065;  $m/z$  492.27259  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{NO}_5$ , 492.27102) permitiram identificar a molécula ativa como Epoxicitocalasina H (fórmula molecular:  $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{NO}_5$ , peso molecular: 493 g/mol). Os dados de  $^{13}\text{C}$  RMN [(120 MHz em DMSO-d)  $\delta$  174,27, 170,04, 138,67, 137,11, 134,13, 129,58, 128,49, 128,36, 126,52, 124,49, 75,39, 72,22, 62,34, 56,74, 53,68, 53,52, 53,23, 48,52, 44,80, 44,67, 42,56, 35,89, 30,45, 27,58, 26,05, 20,44, 19,21, 11,95.] corroboram com os dados encontrados na literatura, descritos por Izawa et al. (1989), que confirmam a estrutura descrita por estes autores com a estrutura da Epoxicitocalasina H identificada neste trabalho (Figura 11).



**Figura 11.** Composto identificado a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720.

Após a elucidação do constituinte químico, a substância purificada foi novamente submetida ao ensaio antimalárico para determinação do exato valor da  $CI_{50}$  e para comparação com as drogas controle comumente utilizadas hoje na clínica. Os resultados demonstram que a Epoxicitocalasina H, produzida pelo fungo *D. miriciae* UFMGCB 9720, possui alta atividade antimalárica contra *P. falciparum* resistente a cloroquina (Tabela 8).

As citocalasinas incluem metabólitos secundários estruturalmente complexos com mais de oitenta moléculas descritas, as quais já foram relatadas como sendo produzidos por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Penicillium*, *Zygosporium*, *Chaetomium*, *Phoma* spp., *Xylaria* spp., *Hypoxylon* spp. e *Rhinocladiella* spp. (DAGNE et al., 1994; WAGENNAR et al., 2000; ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Esta classe de metabólitos vem sendo relatada com inúmeras atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antitumoral, anti-HIV e atividades herbicidas (CIMMINO et al., 2008; LIN et al., 2009; XU et al., 2009).

**Tabela 8.** Atividade antimalárica da Epoxicitocalasina H isolado do fungo endofítico *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720.

Substância	<i>Plasmodium falciparum</i>				
	D6 <sup>a</sup> - $CI_{50}$	D6 <sup>a</sup> - IS	W2 <sup>b</sup> - $CI_{50}$	W2 <sup>b</sup> - IS	VERO <sup>c</sup> $CI_{50}$
Epoxicitocalasina H	51,7	>92,1	39,4	>120,7	>4760
Cloroquina <sup>d</sup>	10,3	>23	137,6	>1,7	>238
Artemisinina <sup>d</sup>	2,9	>83	3,2	>74	>238

<sup>a</sup>*Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (D6), <sup>b</sup> *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina (W2), <sup>c</sup>Células VERO, <sup>d</sup>Droga controle,  $IC_{50}$  = Concentração Inibitória de 50%. IS=Índice de seletividade. Valores calculados em ng/mL.

A Epoxicitocalasina H é comumente produzida por fungos endofíticos, já tendo sido isolado principalmente de espécies pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis*, (IZAWA et al., 1989; KAKEYA et al., 1997; FU et al., 2011), o qual foi pela primeira vez obtido como um composto produzido por *Phomopsis sojae*, um patógeno de soja (COLE et al., 1982) e *Phoma* sp., isolado a partir de uma amostra de solo (KAKEYA et al., 1997). Porém também já foi isolado dos táxons *Pestalotia* sp. (BURREN et al., 1992) e *Endothia gyrosa* (WANG et al., 2011). Epoxicitocalasina H já foi relatada com poucas atividades biológicas, já tendo sido descritas atividades antifúngica (FU et al., 2011), antitumoral

(WANG et al., 2011) e imunossupressora (BURRESS et al., 1992). Até o presente momento, não foram encontrados relatos de atividade antimalárica relacionados a esta molécula. Desta forma, o presente trabalho vem descrever pela primeira vez este tipo de atividade relacionada ao composto Epoxicitocalasina H.

5

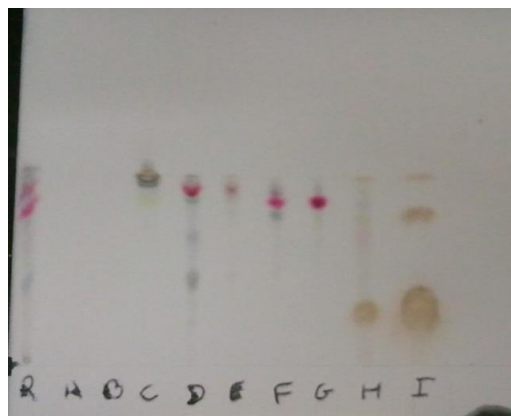
### **5.11 Fracionamento químico biomonitorado do extrato das raízes *Vellozia gigantea* e elucidação estrutural dosconstituente químicos**

O extrato das raízes adventícias de *V. gigantea* foi selecionado para o fracionamento químico biomonitorado (Fluxograma – Anexo 2). A combinação dos extratos produzidos a partir das raízes dos 18 indivíduos de *V. gigantea* renderam 5,218 g de extrato diclorometânico. Inicialmente o extrato foi submetido a análises de CCD em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel hexano/isopropanol 9:1, hexano/acetato de etila 5:5, hexano/acetato de etila 8:2, hexano/éter 8:2, hexano/acetona 9:1 e hexano/acetona 5:5. Após a revelação em Godin a melhor condição foi obtida com a mistura hexano/isopropanol.

A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). Para tanto, 1,108 g de 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, 100g, SNAP com fluxo de 40 mL/min, tendo como gradiente hexano/isopropanol, começando 100:0 a 90:10 por 2.400 mL, seguindo por 90:10 a 70:30 por 1.200 mL, seguindo por 70:30 a 0:100 durante 102 mL e finalizando com 0:100 por 792 mL.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em 203 tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida a CCD (Hexano/isopropanol 9:1), e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em nove frações. As frações obtidas foram concentradas em rota vapor e os rendimentos foram calculados [A'' (7,7 mg), B'' (10,9 mg), C'' (576,8 mg), D'' (150,9 mg), E'' (61,1 mg), F'' (23,7 mg), G'' (22,2 mg), H'' (153,6 mg) e I'' (110,1 mg)]. Com o objetivo de se obter um perfil de cada fração, estas foram submetidas a CCD (Hexano/isopropanol 9:1) (Figura 12).





**Figura 12.** Cromatografia de camada delgada das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto produzido a partir das raízes de *Vellozia gigantea*. Fase móvel Hexano/Isopropanol 9:1.

5

Uma alíquota contendo 1 mg de cada fração foi submetida aos ensaios antimalárico, leishmanicida, antifúngico e antibacteriano e 2 mg para o ensaio herbicida. Após o fracionamento do extrato bruto houve uma perda das atividades antibacterianas e antimalárica, uma vez que nenhuma das frações obtidas demonstrou atividade contra os alvos testados. No entanto, foi possível detectar atividade herbicida em quatro das frações obtidas (Tabela 9).

10

**Tabela 9.** Atividade herbicida das frações obtidas a partir do extrato de raiz de *Vellozia gigantea*.

Amostra	Nível de atividade	
	<i>Lactuca sativa</i> (Alface)	<i>Agrostis stolonifera</i> (gramínea)
Fração A <sup>''</sup>	0	2
Fração B <sup>''</sup>	0	1
Fração C <sup>''</sup>	1	3
<b>Fração D<sup>''</sup></b>	2	<b>4</b>
<b>Fração E<sup>''</sup></b>	2	<b>4</b>
<b>Fração F<sup>''</sup></b>	3	<b>4</b>
<b>Fração G<sup>''</sup></b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Fração H <sup>''</sup>	1	2
Fração I <sup>''</sup>	0	2

15

<sup>a</sup>Modelo dicotiledônea, <sup>b</sup>Modelo monocotiledônea. Nível de atividade: 0 = sem efeito na germinação, 5 = 100% de inibição da germinação. Negrito: Frações ativas.

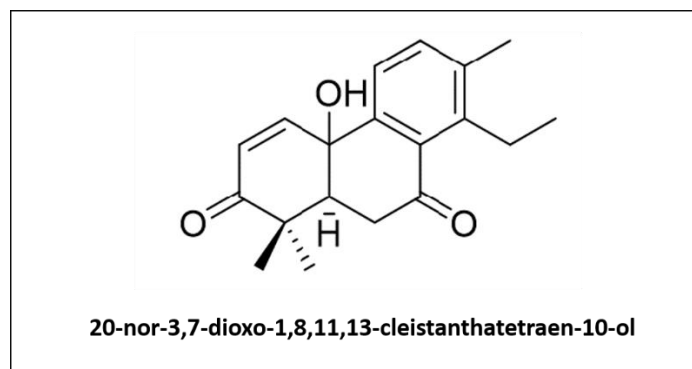
As frações D'', E'' e F'' apresentaram escala de inibição com valor 4 para sementes de *Agrostis stolonifera*, enquanto a fração G'' apresentou inibição com valor 4 para sementes de alface e 5 para sementes de *Agrostis*. Por meio da análise da CCD das frações F'' e G'' foi possível observar a presença do mesmo composto moajoritário. Como a fração G'' demonstrou apresentar uma mistura de substâncias, esta foi selecionada para as etapas subsequentes de purificação.

A purificação da fração bioativa G'' foi realizada em um sistema de CLAE (Agilent 1200) que consistia em sistema de desgaseificação a vácuo, bomba quaternária, ALS autosampler, detector de arranjos de diodos e uma coluna Agilent Zorbax RX-SIL, 9.4 mm × 250 mm, 5µm. A injeção direta do volume da amostra foi de 40 µL, analisadas a temperatura ambiente. O método semi-preparatório utilizado foi Hexano/Acetato de etila 8:2 a Hexano/Acetato de etila 62:38 por 30 minutos seguido por 5 minutos de lavagem da coluna com hexano e reequilíbrio. O processo resultou no isolamento de duas substâncias puras, VG1 (8,8 mg) E VG2 (6,1mg). No entanto, a sustância VG2 não pode ser identificada devido ao baixo rendimento redimento obtido.

A substancia VG1 foi submetida a experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT 135 e 90, HMBC, HMQC e COSY. Os sinais exibidos pelos espectros desta fração juntamente analisados com os dados obtidos a partir do CL-MS/MS, permitiram determinar a configuração do substancia VG1 (Figura 13) e esta foi considerada um novo composto e foi descrito como:

#### **20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistanthatetraen-10-ol**

Alta Resolução ESI-MS:  $m/z$  299.1669 [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, 299,1647.  $[\alpha]_D^{25} = -216,9$  (c 0,065, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7,34 (1H, d, J=7,9 Hz, H-12), 7,24 (1H, d, J=8,0 Hz, H-11), 7,17 (1H, d, J=10,3 Hz, H-1), 6,07 (1H, d, J=10,2 Hz, H-2), 3,09 (1H, m, H-6a), 3,07 (1H, m, H-15a), 2,86 (1H, m, H-15b), 2,73 (1H, dd, J=7,6, 4,8 Hz, H-5), 2,50 (1H, dd, J=16,8, 4,9 Hz, H-6b), 2,38 (3H, s, H-17), 1,24 (3H, s, H-19), 1,16 (3H, t, J=7.4 Hz, H-16), 0,63 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C RMN (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 203,12 (C-3), 199,77 (C-7), 150,04 (C-1), 144,46 (C-14), 143,48 (C-9), 138,76 (C-13), 135,00 (C-12), 131,75 (C-8), 127,44 (C-2), 123,41 (C-11), 70,17 (C-10), 49,93 (C-5), 45,54 (C-4), 39,09 (C-6), 24,67 (C-19), 23,11 (C-15), 21,28 (C-18), 19,61 (C-17), 14,47 (C-16).



**Figura 13.** Substância VG1 identificado a partir da Fração G” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de *V. gigantea*.

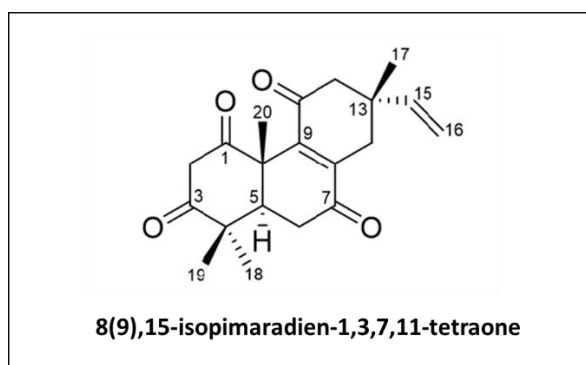
5 A purificação da fração bioativa D” também foi realizada em um sistema de CLAE (Agilent 1200), como descrito acima. A injeção direta do volume das amostras foi de 25  $\mu\text{L}$ . O método semi-preparatório utilizado foi hexano/isopropanol 8:2 a hexano/isopropanol 9:1 (isocrático) por 10 minutos seguindo para hexano/isopropanol 97:3 por 40 minutos, seguido por 10 minutos de lavagem da coluna com hexano e reequilíbrio. O processo resultou no isolamento de cinco substâncias puras, VG3 (8 mg), VG4 (6,1mg), VG5 (8,2 mg), VG6 (6,3 mg) e VG7 (15,5 mg). No entanto, apenas as substâncias VG3, VG5 e VG7 puderam ser identificadas. As substâncias VG3, VG5 e VG7 foram submetidas a experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 e 90, HMBC, HMQC e COSY (Anexo 5, 6 e 7, respectivamente) e CL-MS/MS.

15 Os sinais exibidos pelos espectros de VG3 juntamente analisados com os dados obtidos a partir do CL-MS/MS, permitiram determinar a configuração do substância VG3 (Figura 14) e esta foi considerada um novo composto e foi descrito como:

#### **8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone**

20 Alta Resolução ESI-MS:  $m/z$  327.1597  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ; calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4$ , 327,1596.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +33,5$  (c 0,275,  $\text{CHCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5,79 (1H, dd,  $J=17,5$ , 10,7 Hz, H-15), 5,04 (2H, dd,  $J=14,1$ , 3,2 Hz, H-16), 3,70 (1H, d,  $J=19,9$  Hz, H-2), 3,39 (1H, d,  $J=19,9$  Hz, H-2), 2,76 (1H, d,  $J=15,7$  Hz, H-12), 2,67 (1H, d,  $J=18,5$  Hz, H-14), 2,61 – 2,54 (2H, m, H-6), 2,40 (1H, d,  $J=18,5$  Hz, H-14), 2,33 (1H, d,  $J=15,8$  Hz, H-12), 25 2,15 (1H, dd,  $J=13,3$ , 5,0 Hz, H-5), 1,61 (3H, s, H-20), 1,26 (3H, s, H-19), 1,12 (3H, s, H-18), 1,07 (3H, s, H-17).  $^{13}\text{C}$  RMN (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  208,98 (C-3), 202,51 (C-1), 199,69 (C-11), 198,87 (C-7), 147,11 (C-9), 144,18 (C-15), 143,28 (C-8), 113,06 (C-16),

53,46 (C-10), 50,60 (C-2), 49,68 (C-12), 47,00 (C-4), 45,33 (C-5), 38,08 (C-13), 34,75 (C-14), 34,55 (C-6), 28,52 (C-18), 25,79 (C-17), 21,55 (C-19), 15,59 (C-20).

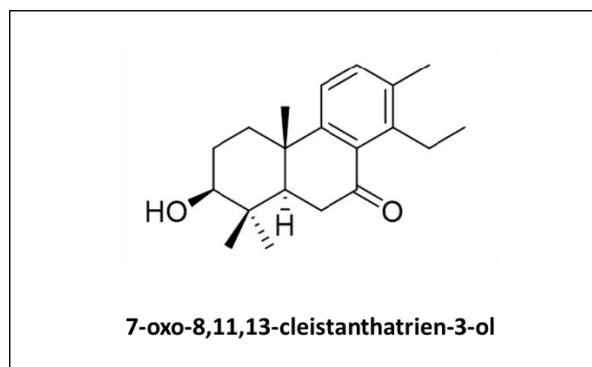


- 5 **Figura 14.** Substância VG3 identificado a partir da Fração D” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de *V. gigantea*.

Os sinais exibidos pelos espectros de VG5 juntamente analisados com os dados obtidos a partir do CL-MS/MS, permitiram determinar a configuração do substancia VG5 (Figura 15) e esta foi considerada um novo composto e foi descrita como:

#### **7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol**

Alta Resolução ESI-MS:  $m/z$  301.2173  $[M + H]^+$ ; calculado para  $C_{20}H_{29}O_2$ , 301,2168.  $[\alpha]_D^{25} = +9,7$  (c 0,33,  $CHCl_3$ ).  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7,24 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-12), 7,05 (1H, d,  $J=8,0$  Hz, H-11), 3,31 (1H, dd,  $J=10,8, 4,5$  Hz, H-3), 3,00 – 2,89 (1H, m, H15a), 2,87 – 2,79 (1H, m, H-15b), 2,72 – 2,66 (2H, m, H-6), 2,31 (3H, s, H-17), 2,26 (1H, dt,  $J=12,7, 3,0$  Hz, H-1a), 1,88 (1H, m, H-2), 1,83 (1H, m, H-5), 1,75 (1H, m, H-1b), 1,19 (3H, t,  $J=7,4$  Hz, H-16), 1,14 (3H, s, H-20), 1,04 (3H, s, H-18), 1,01 (3H, s, H-19).  $^{13}C$  RMN (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  201,83 (C-7), 153,89 (C-9), 144,38 (C-14), 135,60 (C-13), 134,83 (C-12), 131,00 (C-8), 120,68 (C-11), 78,44 (C-3), 47,32 (C-5), 39,04 (C-4), 38,11 (C-6), 37,98 (C-10), 36,77 (C-1), 27,74 (C-2), 27,39 (C-18), 23,71 (C-15), 23,36 (C-20), 19,29 (C-17), 14,91 (C-19), 14,64 (C-16).



**Figura 15.** Substância VG5 identificado a partir da Fração D'' obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de *V. gigantea*.

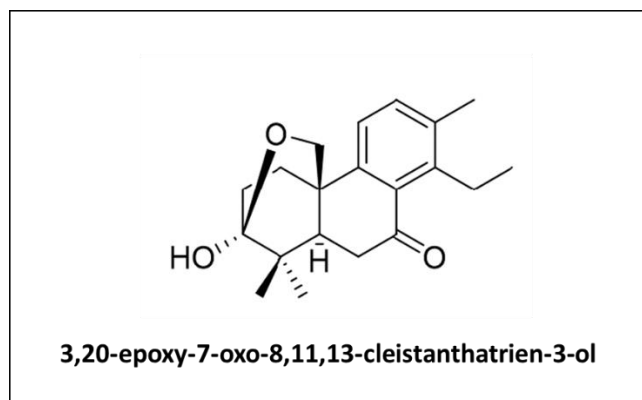
5 Os sinais exibidos pelos espectros de VG7 juntamente analisados com os dados obtidos a partir do CL-MS/MS, permitiram determinar a configuração do substancia VG7 (Figura 16) e esta foi considerada uma nova substância descrita como:

**3,20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol**

10 Alta Resolução ESI-MS:  $m/z$  337.1797  $[M + Na]^+$ ; calculada para  $C_{20}H_{26}O_3Na$ , 337,1779.  $[\alpha]_D^{25} = + 2,9$  (c 0,56,  $CHCl_3$ ).  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7,25 (1H, d,  $J=7,9$  Hz, H-12), 7,09 (1H, d,  $J=8,2$  Hz, H-11), 4,21 (1H, dd,  $J=9,5, 2,9$  Hz, H-20a), 3,99 (1H, d,  $J=9,4$  Hz, H-20b), 3,02 – 2,82 (2H, m, H-15), 2,78 (1H, dd,  $J=15,0, 13,2$  Hz, H-6a), 2,51 (1H, dd,  $J=13,1, 3,5$  Hz, H-6b), 2,49 – 2,42 (1H, m, H-1a), 2,30 (3H, s, H-17), 2,25 (1H, ddd,  $J=13,4, 11,7, 5,5$  Hz, H-2), 2,20 – 2,11 (1H, m, H-5), 1,94 (1H, ddd,  $J=13,4, 11,8, 3,7$  Hz, H-2b), 1,15 (3H, t,  $J=7,4$  Hz, H-16), 1,10 (3H, s, H-18), 1,02 (3H, s, H-19).  $^{13}C$  RMN (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  201,87 (C-7), 144,28 (C-14), 142,96 (C-9), 136,48 (C-13), 134,83 (C-12), 131,80 (C-8), 124,40 (C-11), 99,02 (C-3), 71,14 (C-20), 47,30 (C-5), 40,55 (C-4), 39,27 (C-6), 37,11 (C-10), 34,80 (C-1), 29,46 (C-2), 26,76 (C-19), 23,52 (C-15), 19,42

15

20 (C-17), 18,14 (C-18), 14,51 (C-16).



**Figura 16.** Substância VG7 identificado a partir da Fração D” obtida a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato de *V. gigantea*.

5           As quatro novas moléculas isoladas são pertencentes a classe dos diterpenos, classe esta amplamente encontrada em espécies pertencentes ao gênero *Vellozia* (PINTO, 1991; RIEHL, et al., 2000; SILVA, et al., 2001; BRANCO, et al, 2004).

### 5.12 Atividade fitotóxica e larvicida dos diterpenos obtidos a partir das raízes de *Vellozia gigantea*

10           As atividades fitotóxicas das substâncias puras contra *L. sativa* e *A. stolonifera* são mostradas na Tabela 10. Na concentração de 1000 µg/mL, as substâncias 8 (9), 15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraona (VG3) , 7-oxo-8,11,13-cleistantatrien-3-ol (VG5) e 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistantateretraen-10-ol (VG1) foram moderadamente ativos  
15 (2-4) contra ambas as espécies, enquanto que o composto 3,20-epoxi-7-oxo-8,11,13-cleistantatrien-3-ol (VG7) não foi capaz de inibir a germinação das sementes alface nessa concentração, mas foi moderadamente ativo contra *A. Stolonifera*.

**Tabela 20.** Atividade herbicida dos compostos puros isolados a partir das raízes adventícias de *Vellozia gigantea*.

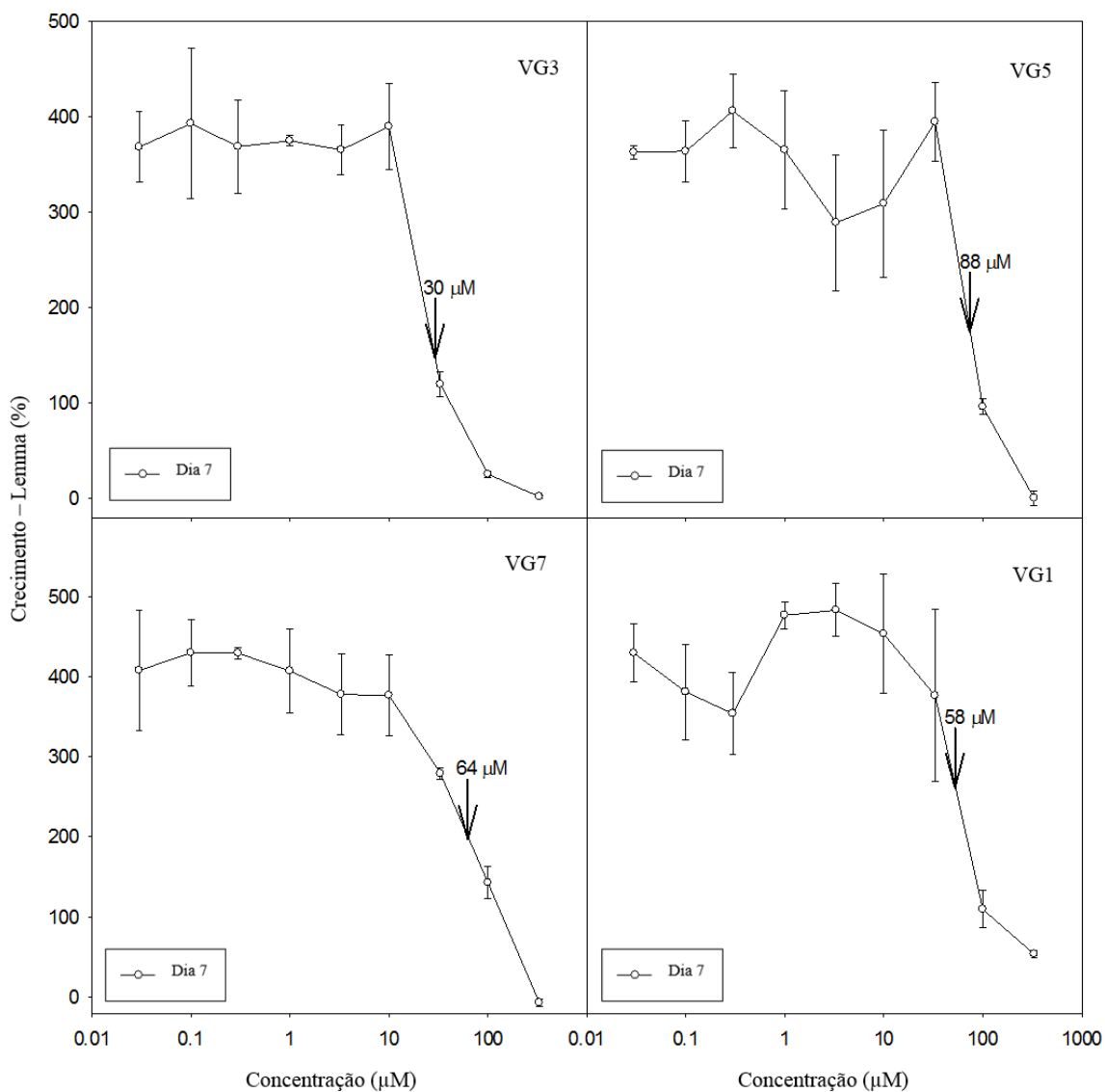
Substância	Concentração avaliada (µg/mL)	Fitotoxicidade <sup>a</sup>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Agrostis stolonifera</i>
<b>VG1</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	0	0
	1000	2	<b>3</b>
<b>VG3</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	1	0
	1000	2	<b>3</b>
<b>VG5</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	2	1
	1000	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>VG7</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	0	0
	1000	0	<b>3</b>

<sup>a</sup>A estimativa qualitativa da fitotoxicidade foi avaliada utilizando-se uma escala de 0 a 5, onde 0 = sem efeito e 5 = sem crescimento ou sem germinação das sementes.

5

Adicionalmente, todas as quatro substâncias foram ativas como inibidores de crescimento de *L. paucicostata* com a ordem de atividade VG3> VG1> VG7> VG5 (Figura 17). Na concentração de 10 µM não houve efeito significativo, já na concentração de 333 µM houve inibição completa do crescimento, exceto pelo composto VG1, o qual apresentou uma inibição de crescimento quase completa. Os valores de CI<sub>50</sub> são comparáveis aos herbicidas comerciais clomazona (126 µM), EPTC (62 µM) e naptalam (128 µM) no mesmo bioensaio (MICHEL, et al., 2004).

10



**Figura 17.** Curvas dose/resposta para as quatro substâncias isoladas obtidas no bioensaio contra *Lactuca paucicostata*. As setas com números denotam a concentração que inibe o crescimento em 50%.

Nos testes larvicidas das substâncias puras contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, o composto 7-oxo-8,11,13-cleistantatrien-3-ol (VG5) demonstrou ser o mais tóxico contra as larvas de *A. aegypti* com 1 dia de idade. As larvas de *A. aegypti*, após o tratamento de 24 horas, apresentou 100% de mortalidade na maior concentração de 125 ppm, seguido de 40% e 10%, respectivamente, em 62,5 e 31,25 ppm. Adicionalmente, 3,20-epoxi-7-oxo-8,11,13-cleistantatrien-3-ol (VG7) promoveu 50% de mortalidade em todas as dosagens acima. Os compostos 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistantateretraen-10-ol



(VG1) e 8 (9), 15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraona (VG3) não apresentaram atividade contra as larvas *A. aegypti*.

Os quatro novos diterpenos obtidos a partir das raízes adventícias de *V. gigantea* demonstraram promissoras atividades herbicidas e pesticidas. Outros diterpenos obtidos a partir de tecidos vegetais já foram relatados com atividades pesticidas (DUKE, et al., 2000; DUKE, et al., 2004; TELLEZ, et al., 2002). Sendo interessante destacar que diversas espécies pertencentes à família *Velloziaceae* já foram relatadas como produtoras de compostos diterpenóides, como por exemplo: diterpenos com o esqueleto de isopimarano foram isolados a partir de *V. bilocor* (PINTO et al., 1991); outros com o esqueleto estrutural do tipo pimarano foram encontrados em *V. flavicans* (PINTO et al., 1996); e 19-hidroxi-8 (9), 15-abietadieno, 19 Hidroxi-8 (9), 13 (16) -14S, 17-ciclolabdadieno e 17-hidroxi-8 (9), 15-isopimaradien obtidos a partir de *V. compacta* (PINTO et al., 1983). No entanto, até o presente momento, poucos compostos foram descritos tendo sido obtido partir de tecidos de *V. gigantea*. Apenas Morales e colaboradores (2014) descreveram os tocotrienóis antioxidantes (tocoferóis e tocotrienóis) acumulados em folhas de *V. gigantea*.

## 6 Conclusões

O presente trabalho contribui para o conhecimento da comunidade de fungos endofíticos associados a plantas endêmicas do Brasil, bem como do seu potencial valor como fonte de substâncias bioativas. Desta forma, este estudo indica que:

5

- Folhas e raízes de *V. gigantea* abrigam uma notória e diversa comunidade de fungos endofíticos. Dentro da comunidade ocorre a predominância de espécies descritas como endófitos, mas também com presença de inúmeros singletos pouco relatados ou recém descritos na literatura.

10

- A comunidade de fungos endofíticos associadas às folhas e raízes de *V. gigantea* abriga possíveis espécies novas de leveduras e fungos filamentosos.
- A comunidade endofítica de *V. gigantea* abriga potenciais fungos produtores de metabólitos bioativos.

15

- A Epoxicitocalasina H, relatada pela primeira vez com atividade contra *P. falciparum*, pode ser utilizada com molécula protótipo para estudos de substâncias antimaláricas.

20

- Raízes de *V. gigantea* apresentam um notório reservatório de novas moléculas de interesse na agricultura. Este resultado agrega informações a respeito da constituição química das raízes de adventícias de *V. gigantea*, também descreve quatro novas substâncias naturais que podem vir a serem usados como protótipos para desenvolvimento de novos herbicidas e pesticidas.

Por fim, os resultados obtidos demonstram que as plantas endêmicas, antigas e únicas, como *V. gigantea*, que é ameaçada de extinção, devem ser protegidas por seu valor intrínseco como fontes de novos compostos bioativos.

25

## 7 Referências

- ABELN, E. C., DE PAGTER, M. A., & VERKLEY, G. J. Phylogeny of *Pezicula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia*, 685-693, 2000.
- 5 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, 2003.
- 10 AIME, M. C.; BREARLEY, F. Q. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species discovery. *Biodivers Conserv*, v21, p2177–2180, 2012.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- 15 ALI, A.; TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; BASER, K.H.C.; ELLIS, J.; GRAY, S.; LACKEY, B.R.; MURPHY, C.; KHAN, I.A.; WEDGE, D.E. Composition, mosquito larvicidal, biting deterrent and antifungal activity of essential oils of different plant parts of *Cupressus arizonica* var. *glabra* (Sudw.) Little ('Carolina Sapphire'), *Natural Prod. Commun.* v8, p257-260, 2013.
- ALVES, R. J. V. Morphological age determination and longevity in some *Vellozia* populations in Brazil. *Folia Geobotanica*, 29(1), 55-59, 1994.
- 20 ALY, A. H., EDRADA-EBEL, R., WRAY, V., MÜLLER, W. E., KOZYTSKA, S., HENTSCHEL, U., ... & EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry*, 69(8), 1716-1725, 2008.
- 25 ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90:1829–1845, 2011.
- 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.
- 30 ASCHEHOUG, E. T., CALLAWAY, R. M., NEWCOMBE, G., THARAYIL, N., & CHEN, S. Fungal endophyte increases the allelopathic effects of an invasive forb. *Oecologia*, 175(1), 285-291, 2014.
- AVISE, J.C.; BALL, R. M. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. In: *Evolutionary Biology* (eds Futuyama D, Antonovics J), pp. 45–67, 1990.

- AYENSU, E.S. Biological and Morphological Aspects of the *Velloziaceae*. *Biotropica*, v5, p135-149, 1973.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. p. 17-22, 2014.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biothecnology*, v. 3, p. 40-64, 2000.
- BANO, N., RIZVI, I. F., SHARMA, N., SIDDIQUI, M. H., KALIM, M., KHAN, A., & AKHTAR, S. Production of Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic fungi, 2016.
- BHARDWAJ, A.; AGRAWAL, P. A review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v3. p 228-237, 2014.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany*. v98(3): p 426–438, 2011.
- BRANCO, A.; PINTO, A.C. & BRAZ FILHO, R. - Chemical constituents from *Vellozia graminifolia* (*Velloziaceae*). *An. Acad. bras. Cienc.*, 76: 505-518, 2004.
- BRUNDRETT, M.C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, eds. *Microbial root endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 281–293. 2006.
- BURRES, N. S., PREMACHANDRAN, U., HUMPHREY, P. E., JACKSON, M., & CHEN, R. H. A new immunosuppressive cytochalasin isolated from a *Pestalotia* sp. *The Journal of antibiotics*, 45(8), 1367-1369, 1992.
- CANNON, P. F., & KIRK, P. M. (Eds.). *Fungal families of the world*. Cabi, 2007.
- 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*, 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.

- CERRADOS, E. Metagenômica e sua Aplicação no Estudo de Diversidade e Função de Microrganismos de Solos do Cerrado. 2010.
- CHATTERTON, S., JAYARAMAN, J., & PUNJA, Z. K. Colonization of cucumber plants by the biocontrol fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control*, 5 46(2), 267-278, 2008.
- CIMMINO, A., ANDOLFI, A., BERESTETSKIY, A., EVIDENTE, A. Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, A potential mycoherbicide against perennial thistles. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6304–6309, 2008.
- COLE, R. J., WILSON, D. M., HARPER, J. L., COX, R. H., COCHRAN, T. W., 10 CUTLER, H. G., & BELL, D. K. Isolation and identification of two new [11] cytochalasins from *Phomopsis sojae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 301-304, 1982.
- COMPANT, S., SAIKKONEN, K., MITTER, B., CAMPISANO, A., & MERCADO-BLANCO. Editorial special issue: soil, plants and endophytes. *Plant and Soil*, 1-11, 15 2016.
- CROUS, P. W., BRAUN, U., HUNTER, G. C., WINGFIELD, M. J., VERKLEY, G. J. M., SHIN, H. D., ... & GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*, 75, 37-114, 2013.
- CROUS, P. W., WINGFIELD, M. J., GUARRO, J., CHEEWANGKON, R., VAN DER 20 BANK, M., SWART, W. J. & DUEÑAS, M. Fungal Planet description sheets: 154–213. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 188, 2013.
- CROUS, P. W., WINGFIELD, M. J., SCHUMACHER, R. K., SUMMERELL, B. A., GIRALDO, A., GENÉ, J., ... & GROENEWALD, J. Z. Fungal Planet description sheets: 281–319. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 33(1), 25 212-289, 2014.
- DAGNE, E., GUNATILAKA, A. A. L., ASMELLASH, S., ABATE, D., KINGSTON, D. G. I., HOFMANN, G. A., JOHNSON, R. K. Two new cytotoxic cytochalasins from *Xylaria obovata*. *Tetrahedron*. 50, 5615–5620, 1994.
- DAVIS, E. C.; FRANKLIN, J. B. Endophytic *Xylaria* (*Xylariaceae*) Among Liverworts and Angiosperms: Phylogenetics, Distribution, and Symbiosis. *American Journal of Botany* v90(11), p1661–1667, 2003. 30
- DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. *Science*, v. 214, p. 987-994, 1981.

- DREYFUSS, M.; CHAPELA, I. Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. V26, p.49–80, 1994.
- 5 DRUZHININA, I. S., SEIDL-SEIBOTH, V., HERRERA-ESTRELLA, A., HORWITZ, B. A., KENERLEY, C. M., MONTE, E., ... & KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749-759, 2011.
- 10 DUKE, S. O., & OLIVA, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids (pp. 201-206). F. A. MACIAS, J. C. G. GALINDO, J. M. G. MOLINILLO, & H. G. CUTLER (Eds.). CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2004.
- DUKE, S.O.; ROMAGNI, J.G.; DAYAN, F.E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protect.* 19, 583-589, 2000.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A.Y., *Systematic mycology and Microbiology Laboratory*, ARS, USDA. *Fungal Databases*, 2009.
- 15 FERRARA, M.A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.73-79, jun, 2006.
- FERREIRA, M. C., VIEIRA, M. D. L. A., ZANI, C. L., DE ALMEIDA ALVES, T. M., JUNIOR, P. A. S., MURTA, S. M., ... & ROSA, L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 36-44, 2015.
- 20 FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, Bratislava, v.62(3), p.251- 257, 2007.
- 25 FU, J., ZHOU, Y., LI, H. F., YE, Y. H., & GUO, J. H. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(10), 1231-1236, 2011.
- GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia* 156:41– 45, 2002.
- 30 GARCÍA, A.; RHODEN1, S. A.; FILHO, C. J. R.; NAKAMURA, C. V.; PAMPHILE, J. A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L . and their localization by scanning electron microscopy. *Biol Res* 45: 139-148, 2012.

- GARCIA, Q.S.; DINIZ, I.S.S. Comportamento Germinativo De Três Espécies De *Vellozia* Da Serra Do Cipó, Mg. Acta bot. bras. V17: P487-494, 2003.
- GAZIS, R.; REHNER†, S.; CHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. Molecular Ecology. V. 20, P. 3001–3013, 2011.
- 5 GEHLOT, P.; SINGH, S. K.; PATHAK, R. Morphometric and molecular characterization of fungus *Pestalotiopsis* using nuclear ribosomal DNA analysis. J. Environ. Biol. V33, p 897-901, 2012.
- GIULIETTI, A.M., HARLEY, L.P. QUEIROZ, M.G.L. WANDERLEY; C. VAN DEN BERG.. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. Megadiversidade v1: p52-61. 2005.
- 10 GIULIETTI, A.M.; PIRANI, J.R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini PE, Heyer WR (eds) Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp 39–69, 1988.
- 15 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, Apr., p. 1323–1330, 1995.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plants-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and applications of their occurrence. Journal of Natural Products, v. 69, p. 509-526, 2006.
- 20 HARDOIM, P. R., VAN OVERBEEK, L. S., BERG, G., PIRTTILÄ, A. M., COMPANT, S., CAMPISANO, A., ... & SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79(3), 293-320, 2015.
- 25 HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. Annu Rev Entomol 54:323–342, 2009.
- HIGGINS, K. L., ARNOLD, A. E., COLEY, P. D., & KURSAR, T. A. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host-and habitat generalists characterized by strong spatial structure. Fungal Ecology, 8, 1-11, 2014.
- 30 HIROSE, D., MATSUOKA, S., & OSONO, T. Assessment of the fungal diversity and succession of ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis. Mycologia, 105(4), 837-843, 2013.

- HUANG, W. Y., CAI, Y. Z., XING, J., CORKE, H., & SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*, 61(1), 14-30, 2007.
- HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; SURVESWARAN, S.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M.  
5 Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity* v36: p69-88, 2009.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z. & SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 31, p.163-167, 2001.
- 10 HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUT, I H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAYLOR, P. W. J.; TAN, Y. P.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* — names  
15 in current use. *Fungal Divers.* v39, p147–182, 2009.
- INGOLD, C.T. Spore liberation. Clarendon Press, Oxford. 1965.
- ISAKA, M., JATURAPAT, A., RUKSEREE, K., DANWISETKANJANA, K., TANTICHAROEN, M., & THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of natural products*, 64(8), 1015-1018, 2001.
- 20 IZAWA, Y., HIROSE, T., SHIMIZU, T., KOYAMA, K., & NATORI, S. Six new 10-pheynl-[11] cytochalasans, cytochalasins N-S from *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*, 45(8), 2323-2335, 1989.
- JACOBI, C. M.; CARMO, F. F. Diversidade dos campos rupestres ferruginosos no uadrilátero Ferrífero, MG. *Megadiversidade*, v4, p 26-33, 2008.
- 25 JOSEPH, B.; PRIYA, M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potencial in Pharmaceutical Rffect: A Review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011.
- JU, Y. M., ROGERS, J. D., & SAN MARTIN, F. A revision of the genus *Daldinia*.  
30 *Mycotaxon*, 61, 243-293, 1997.
- KAKEYA, H., MORISHITA, M., ONOZAWA, C., USAMI, R., HORIKOSHI, K., KIMURA, K. I., ... & OSADA, H. RKS-1778, a new mammalian cell-cycle inhibitor



and a key intermediate of the [11] cytochalasin group. Journal of natural products, 60(7), 669-672, 1997.

KAUL, S., GUPTA, S., AHMED, M., & DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. Phytochemistry reviews, 11(4), 487-505, 2012.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W., & STALPERS, J. A. Dictionary of the Fungi. 10th ed. CAB International: Wallingford, U.K., 2008.

KO, T. W.; STEPHENSON, S. L.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? Fungal Diversity. 2011.

KOGEL, K-H.; FRANJKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasitewhat decides. Current Opinion in Plant Biology, v.9, p.358-363, 2006.

KUBICEK, C. P.; ZELAZOWSKA, M. K.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. Journal of Zhejiang University SCIENCE. , v9, p753-763, 2008.

KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., BOEKHOUT, T. & ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In The Yeasts, a Taxonomic Study, pp. 87–107, 2011.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. Chemistry & Biology 19, 2012.

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. Can J Microbiol 45, 172–177, 1999.

LAHLALI, R., & PENG, G. Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. Plant pathology, 63(2), 447-455, 2014.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. *Fusarium* laboratory manual. 2006.

LIECKFELDT E., MEYER W. AND BO'NER T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. J. Basic Microbiol. 33: 413–426, 1993.

LIECKFELDT, E.; SEIFERT, K. A. An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. Studies in Mycology, v. 45, p. 35–44, 2000.

- LIN, Z., ZHANG, G., ZHU, T., LIU, R., WEI, H., GU, Q. Bioactive cytochalasins from *Aspergillus flavipes*, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Helv. Chim. Acta.* 92, 1538–1544, 2009.
- LIU S., WEIBIN R., JING L., HUA X., JINGAN W., YUBAO G., JINGGUO W.  
5 Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* 166:93–102, 2008.
- LIU, J. K., PHOOKAMSAK, R., DOILOM, M., WIKEE, S., LI, Y. M., ARIYAWANSHA, H., ... & HYDE, K. D. Towards a natural classification of *Botryosphaeriales*. *Fungal Diversity*, 57(1), 149-210, 2012.
- 10 LOPES, M.R., FERREIRA, M.C., CARVALHO, T.F.C., PAGNOCCA, F.C., CHAGAS, R.A., MORAIS, P.B., ROSA, L.H., LACHANCE, M.A., ROSA, C.A. *Yamadazyma riverae* sp. nov., a yeast species isolated from plant materials. *Int J Syst Evol Microbiol.* 65, 4469-447, 2015.
- LOUSADA, J.M; BORBA, E.L.; RIBEIRO, K.T.; RIBEIRO, L.C.; LOVATO, M.B.  
15 Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (*Velloziaceae*) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica*, V139: P431–440, 2011.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N., HYDE, K. D., GROENEWALD, J. Z., XU, J., & CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in mycology*, 79, 121-186, 2014.
- 20 MAKLER, M. T.; HINRICHS, D. J., *AM. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 205, 1993.
- MALKUS, A., CHANG, P. F. L., ZUZGA, S. M., CHUNG, K. R., SHAO, J., CUNFER, B. M., ... & UENG, P. P. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *mycological research*, 110(10), 1152-1164, 2006.
- 25 MANAMGODA, D. S., ROSSMAN, A. Y., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., MADRID, H., CHUKEATIROTE, E., & HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. *Studies in mycology*, 79, 221-288, 2014.
- manual. Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- MELLO-SILVA, R.; MENEZES. N.L. Two new Brazilian *Velloziaceae*, *Vellozia auriculata* and *Vellozia gigantea*, and a key to the related dracenoid species of *Vellozia*. *Novon* V9: P536–541, 1999.
- 30 MELO, A. S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade. *Biota Neotropica*, 8(3), 21-27, 2008.

- MENEZES, N.L.; MELLO-SILVA. R.; MAYO, S.J. Cladistic analysis of the *Velloziaceae*. Kew Bull, v49: p71–92, 1994.
- METZ, A.M.; HADDAD, A.; WORAPONG, J.; LONG, D.M.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. Microbiology, v. 146, p. 2079-2089, 2000.
- 5 MICHEL, A.; JOHNSON, R.D.; DUKE, S.O.; SCHEFFLER. Dose-response relationships between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: An improved exotoxicological method. *Environ. Toxicol. Chem.*, 232, 1074-1079. 2004.
- 10 MORALES, M., GARCIA, Q. S., SIQUEIRA-SILVA, A. I., SILVA, M. C., & MUNNÉ-BOSCH, S. Tocotrienols in *Vellozia gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. *Planta*, v240(2), p437-446, 2014.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*. v98: p380–386, 2008.
- 15 NAG RAJ, T. R. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications, 1993.
- NALINI, M. S., MAHESH, B., TEJESVI, M. V., PRAKASH, H. S., SUBBAIAH, V., KINI, K. R., & SHETTY, H. S. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) DC.(Capparidaceae). *Mycopathologia*, 159(2), 245-249,
- 20 2005.
- NCCLS, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Seventh Edition M7-A7. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 26(2), 2006.
- NCCLS, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of
- 25 Yeasts; Approved Standard M27-A2. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 22 (15), 2002.
- NCCLS, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, M38-A. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 22(16), 2002.
- 30 NCCLS, Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Tentative Standard—Approved Standard, M24-A. National Committee on Clinical Laboratory Standards, 23(18), 2003.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NILSSON, R. H.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K.; KVIST, E. S.; KRISTIANSOON, E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol Lett.* V296, P97–101, 2009.
- 5 OKI, Y., GOTO, B. T., JOBIM, K., ROSA, L. H., FERREIRA, M. C., COUTINHO, E. S., ... & BERBARA, R. L. L. Arbuscular Mycorrhiza and Endophytic Fungi in Ruspian Grasslands. In *Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil* (pp. 157-179). Springer International Publishing, 2016.
- 10 PINTO, A. C., & BORGES, C. Six diterpenes from *Vellozia compacta*. *Phytochemistry*, 22(9), 2011-2015, 1983.
- PINTO, Â. C., REZENDE, C. M., ANTUNES, O. A., & CORREIA, C. R. D. Three isomeric diterpenes from *Vellozia flavicans*. *Phytochemistry*, 42(3), 767-769, 1996.
- PINTO, Angelo C. Diterpenes from *Vellozia bicolor*. *Mass spectrometry*, v. 1, p. 3, 1991.
- 15 POHL C.H., KOCK J.L.F., THIBANE V.S. Antifungal free fatty acids: a review, in: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Microbiology Book Series - Number 3 A. Méndez-Vilas, pp. 61–71, 2011.
- RADIC, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 2012.
- 20 R-Development-Core-Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.2.3 Edn. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2015
- REDECKER, D., KODNER, R., GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. v289, p1920–1921, 2000.
- 25 REDMAN R. S.; SHEEHAN K. B.; STOUT T. G.; RODRIGUEZ R. J.; HENSON J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298:1581, 2002.
- RIBEIRO, P.K.T. *Algumas Características Das Plantas Sobre As Rochas*, 2009.
- RIEHL, C. AS; PINTO, A. C. A cleistanthane diterpene lactone from *Vellozia compacta*. *Phytochemistry*, v. 53, n. 8, p. 917-919, 2000.
- 30 ROBERTI, R., VERONESI, A., CESARI, A., CASCONI, A., DI BERARDINO, I., BERTINI, L., & CARUSO, C. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*, 175(3), 339-347, 2008.

- RODRIGUES, K.F.; & DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* and *B. humidicola*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 31, p. 905-909, 1996.
- RODRIGUES, R. L. Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. F.(Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins, 2010.
- RODRÍGUEZ, M. A., CABRERA, G., GOZZO, F. C., EBERLIN, M. N., & GODEAS, A. Clonostachys rosea BAF3874 as a Sclerotinia sclerotiorum antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. Journal of applied microbiology, 110(5), 1177-1186, 2011.
- 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. J Exp Bot v59: p1109–1114, 2008.
- RODRIGUEZ. R. J.; WHITE JR. J. F.; ARNOLD. A. E.; REDMAN R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist, v. 182, p. 314–330, 2009.
- ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with Theobroma cacao and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. Mycologia, v102, p. 1318–1338, 2010.
- ROMERO, A., CARRION, G., & RICO-GRAY, V. Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of Parthenium hysterophorus (Asteraceae). Fungal Divers, 7, 81-87, 2001.
- ROSA, L. H., QUEIROZ, S. C., MORAES, R. M., WANG, X., TECHEN, N., PAN, Z., ... & WEDGE, D. E. Coniochaeta ligniaria: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae). Symbiosis, 60(3), 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 *Smallanthus* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. Canadian journal of microbiology. 58, 1202-1211, 2012.

- ROSA, L. H.; VAZ A. B. M.; CALIGIORNE, R.L. B.; CAMPOLINA, SA.; ROSA C. A.  
Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.  
(*Poaceae*). *Polar Biology*, v.32, p.161–167, 2009.
- 5 SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; sullivan, t. j. Fungal endophytes: A  
Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and  
Systematic*, v. 29, p. 319-343, 1998.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning, a laboratory*  
SANTOS, J. M.; CORREIA, V. G.; PHILLIPS, A. J. L. Primers for mating-type diagnosis  
in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological  
10 species definition. *Fungal Biology*, v114, p255–270, 2010.
- SAPPAPAN, R., SOMMIT, D., NGAMROJANAVANICH, N., PENGPREECHA, S.,  
WIYAKRUTTA, S., SRIUBOLMAS, N., & PUDHOM, K. 11-Hydroxymonocerin  
from the plant endophytic fungus *Exserohilum rostratum*. *Journal of natural products*,  
71(9), 1657-1659, 2008.
- 15 SCHROERS, H. J., SAMUELS, G. J., SEIFERT, K. A., & GAMS, W. Classification of  
the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship  
to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*,  
365-385, 1999.
- SCHULZ, B & BOYLE, C. What are endophytes? En: B. Schulz, C. J . Boyle and T. N.  
20 Sieber. (eds.). *Microbial root endophytes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 9.1 – 13,  
2006.
- SCHULZ, B., HAAS, S., JUNKER, C., ANDRÉE, N., & SCHOBERT, M. Fungal  
endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Curr Sci*, 109, 39-45,  
20015.
- 25 SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Reserch*, v.109,  
p.661- 686, 2005.
- SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.K.; DAMMANN, U.; AUST, H.J; STRACK,D. The  
endophytehost interaction: a balanced antagonism? *Mycology Research*, v.103,  
p.1275-1283, 1999.
- 30 SIEBER, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev*.  
v21, p75–89, 2007.
- SILVA, Gilson Cruz da et al. Cleistanthane diterpenoids from *Vellozia* aff. *carunculares*  
*martius ex seubert* (Velloziaceae). *Química Nova*, v. 24, n. 5, p. 619-625, 2001.

- SILVA, T. M. RNA dupla fita em *Guignardia citricarpa* e estimativa do número de cromossomos em *G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*. 2008.
- SILVA-HUGHES, A.F., WEDGE, D.E., CANTRELL, C.L., CARVALHO, C.R., PAN, Z., MORAES, R.M., MADDOXX, V.L., ROSA, L.H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United State. *Microbiological research*. 175, 67-77, 2015.
- SILVEIRA, F.O.; NEGREIROS, D.; BARBOSA, N.P.U.; BUISSON, E.; CARMO, F.F.; CARSTENSEN, D.W.; CONCEIÇÃO, A.A., CORNELISSEN, T.G.; ECHTERNACHT, L.; FERNANDES, G.W.; GARCIA, Q.S.; GUERRA, T.J.; JACOBI, C.M.; LEMOS-FILHO, J.P.; STRADIC, S.L.; MORELLATO, L.P.C.; NEVES, F.S.; OLIVEIRA, R.S.; SCHAEFER, C.E.; VIANA, P.L.; LAMBERS, H. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*. p1-24, 2016.
- SMITH, S. A.; TANK, D. C.; BOULANGER, L-A.; BASCOM-SLACK, C. A.; EISENMAN, K.; KINGERY, D.; BABBS, B.; FENN, K.; GREENE, J. S.; HANN, B. D.; KEEHNER, J.; KELLEY-SWIFT, E. G., KEMBAIYAN, V.; LEE, S. J.; LI, P.; LIGHT, D. Y.; LIN, E. H.; CONGMA; MOORE, E.; SCHORN, M. A.; VEKHTER, D.; NUNEZ, P. V.; STROBEL, G. A. DONOGHUE, M. J.; STROBEL, S. A. Bioactive Endophytes Warrant Intensified Exploration and Conservation. *PLoS ONE*, v3, 2008.
- SOPALUN, K., STROBEL, G. A., HESS, W. M. & WORAPONG, J. A record of *Muscodora albus*, an endophyte from *Myristica fragrans*, in Thailand. *Mycotaxon* 88, 239–247, 2003.
- SOUSA, E.C. Avaliação da atividade in vitro de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra *Candida* spp. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) 2007 Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 2007.
- STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C.W. BACON & J.F. WHITE (Ed.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker.pp. 3-30, 2000.
- STOPPA, M.A.; CASEMIRO, L.A.; VINHOLIS, H.C.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparative entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova*, v. 32, p. 498-502, 2009.

- STROBEL, G. A., KLUCK, K., HESS, W. M., SEARS, J., EZRA, D., & VARGAS, P. N. *Muscodor albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. *Microbiology*, 153(8), 2613-2620, 2007.
- 5 STROBEL, G. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol.* v. 22, p315-33, 2002.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, p. 491-502, 2003.
- 10 STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, 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 Divers* 47:85–95, 2011.
- SUTTON, J. C., LI, D. W., PENG, G., YU, H., ZHANG, P., & VALDEBENITO-  
15 SANHUEZA, R. M. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, 81(4), 316-328, 1997.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30, 2725-2729, 2013.
- 20 TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, p. 448-459, 2001.
- TANSUWAN, S., PORNPAKAKUL, S., ROENGSUMRAN, S., PETSOM, A., MUANGSIN, N., SIHANONTA, P., & CHAICHIT, N. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. *Journal of natural products*, 70(10), 1620-  
25 1623, 2007.
- TELLEZ, M. R., KOBASISY, M., DUKE, S. O., SCHRADER, K. K., DAYAN, F. E., & ROMAGNI, J. Terpenoid-based defense in plants and other organisms. *Lipid Technology*, 354, 2002.
- THANABALASINGAM, D., KUMAR, N. S., JAYASINGHE, L., & FUJIMOTO, Y.  
30 Endophytic Fungus *Nigrospora oryzae* from a Medicinal plant *Coccinia grandis*, a High Yielding New Source of Phenazine-1-carboxamide. *Natural product communications*, 10(10), 1659-1660, 2015.



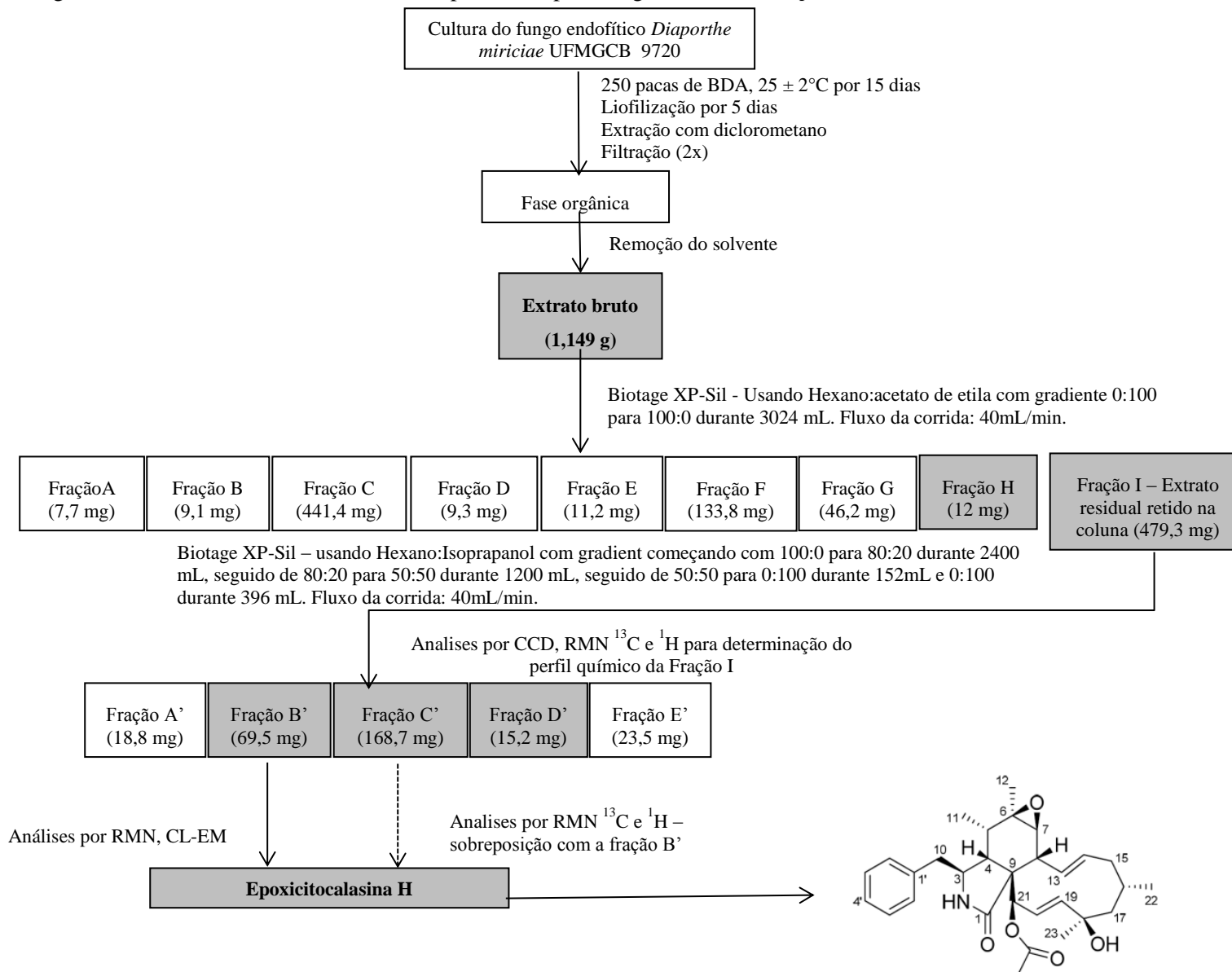
- THONGKANTHA, S., JEEWON, R., VIJAYKRISHNA, D., LUMYONG, S., MCKENZIE, E.H.C. AND HYDE, K.D. Molecular phylogeny of *Magnaporthaceae* (*Sordariomycetes*) with a new species, *Ophioceras chiangdaoense* from *Dracaena loureiroi* in Thailand. *Fungal Diversity* 34: 157-173, 2009.
- 5 TORRES MS, SINGH AP, SHAH S, HERRERA-CARRILLO Z, GIANFAGNA T, WHITE JF JR, VORSA N. Identification and quantification of phenolics in symbiotic tall fescue. *Proceedings of the 18th Annual Rutgers Turfgrass Symposium*. Rutgers University, New Brunswick, p 54, 2009.
- 10 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. *Mycol Progress*. v6, p201–212, 2007.
- 15 VERKLEY, G. J., DA SILVA, M., WICKLOW, D. T., & CROUS, P. W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*, 50(2), 323-336, 2004.
- VIEIRA, M. L., JOHANN, S., HUGHES, F. M., ROSA, C. A., ROSA, L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Canadian journal of microbiology*. 6012, 847-856, 2014.
- 20 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*). *Can. J. Microbiol*. v58: p54–66, 2012.
- 25 WAGENAAR, M. M., CORWIN, J., STROBEL, G., CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. *J. Nat. Prod*. 63, 1692–1695, 2000.
- 30 WALSH, J. L.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C. Y.; SANGALANG, A. E.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; PETROVIC, T. *Fusarium*: Two Endophytic Novel Species from Tropical Grasses of Northern Australia. *Fungal Diversity* v44, p149–159, 2010.
- WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained

- from *Cladosporium* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.23, p. 79-83, 2006.
- 5 WANG, L. W., ZHANG, Y. L., LIN, F. C., HU, Y. Z., & ZHANG, C. L. Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. Mini reviews in medicinal chemistry, 11(12), 1056-1074, 2011.
- WANG, Z., JOHNSTON, P. R., TAKAMATSU, S., SPATAFORA, J. W., & HIBBETT, D. S. Toward a phylogenetic classification of the *Leotiomyces* based on rDNA data. Mycologia, 98(6), 1065-1075, 2006.
- 10 WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI S; VANGRONSVELD, J. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. Curr Opin Biotechnol 20:248–254, 2009.
- WHALLEY, A. J. S. The xylariaceous way of life. Mycological Research, 100(8), 897-922, 1996.
- WHITE, J. F. JR, TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? Physiol Plant v138: p440– 446, 2010.
- 15 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, p. 315-322, 1990.
- 20 XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. Fungal Diversity v4, p15– 31, 2010.
- XUE, A. G. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. Phytopathology, 93(3), 329-335, 2003.
- 25 YU, H., ZHANG, L., LI, L., ZHENG, C., GUO, L., LI, W., ... & QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiological research, 165(6), 437-449, 2010
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. Nat Prod Rep 23:753–771, 2006.
- 30 ZHANG, Q., LI, H. Q., ZONG, S. C., GAO, J. M., ZHANG, A. L. Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites. Mini-Rev. Med. Chem. 12, 127–148, 2012.

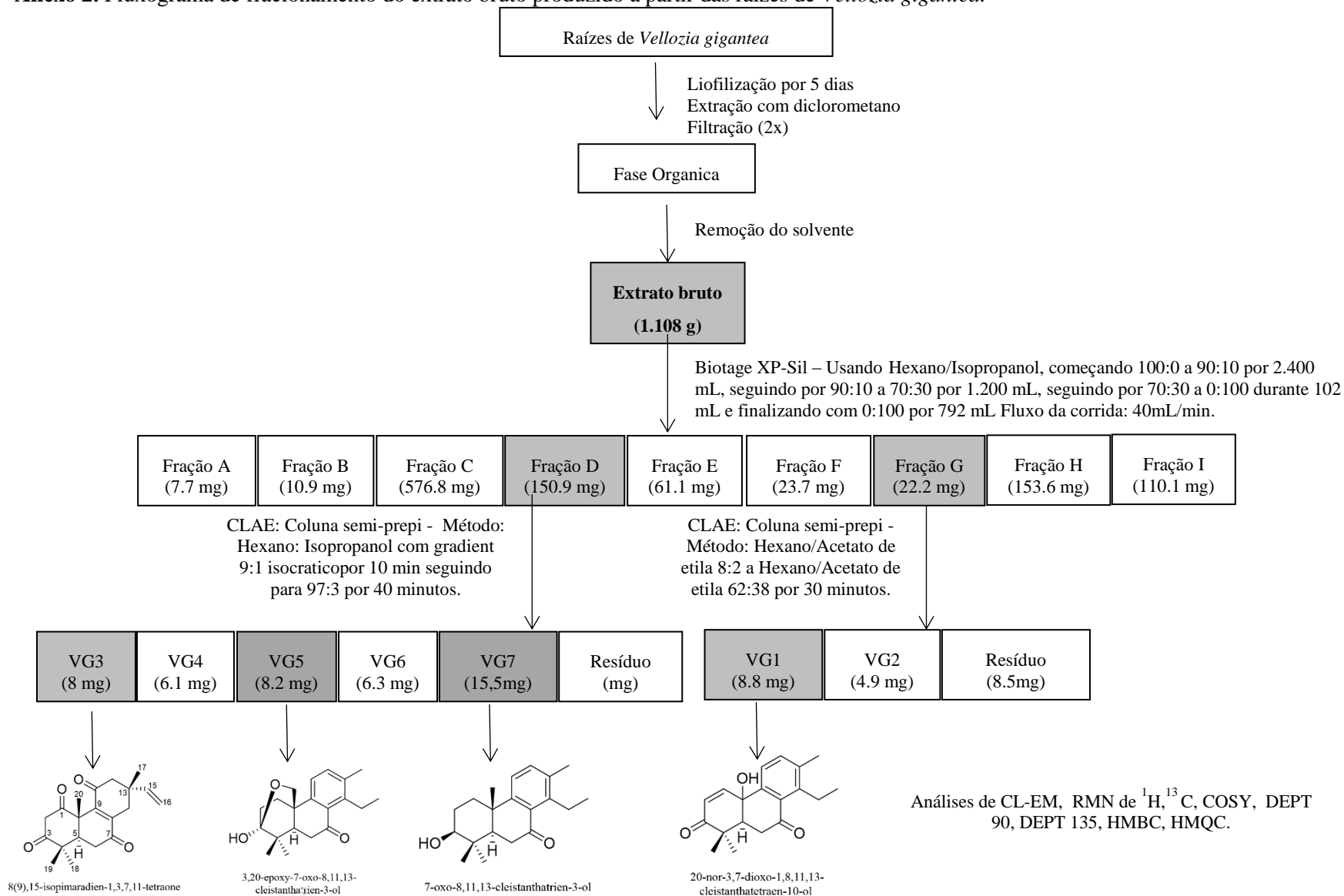
ZHANG, Q., XIAO, J., SUN, Q.Q., QIN, J.C., PESCIPELLI, G., GAO, J.M.  
Characterization of cytochalasins from the endophytic *Xylaria* sp. and their  
biological functions. *J Agric Food Chem.* 62,10962-10969, 2014.

5 ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. Endophytic  
fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current  
Research, Tecnology and Education Topics in Applied Microbiology an Microbial  
Biotechnology.* 2010.

**Anexo 1.** Fluxograma de fracionamento do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720.



**Anexo 2.** Fluxograma de fracionamento do extrato bruto produzido a partir das raízes de *Vellozia gigantea*.



### **Anexo 3. Apresentações em congressos e artigos produzidos**

#### **Apresentações em Congressos**

Ferreira, M. C., Cantrell, C. L., Wedge, D. E., & Rosa, L. H. (2014). Characterization of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with *Vellozia gigantea*, an endemic Brazilian plant. *Planta Medica*, 80(10), PC25. *14th American Society of pharmacognosy Mettinh*, Oxford, MS, USA.

#### **Artigos Publicados**

Lopes, M.R., Ferreira, M.C., Carvalho, T.F.C., Pagnocca, F.C., Chagas, R.A., Morais, P.B., Rosa, L.H., Lachance, M.A., Rosa, C.A. *Yamadazyma riverae* sp. nov., a yeast species isolated from plant materials. *Int J Syst Evol Microbiol*. v65, p4469-447, 2015.

#### **Artigos Submetidos**

Mariana C. Ferreira, Charles L. Cantrell, David E. Wedge, Vívian N. Gonçalves, Melissa R. Jacob, Shabana Khan, Carlos A. Rosa, Luiz H. Rosa. Endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic Neotropical plant *Vellozia gigantea* from endangered Brazilian biome Rupestrian Grasslands. Submetido para a revista *Biochemical Systematics and Ecology*, em 30/12/2016.

Mariana C. Ferreira, Charles L. Cantrell, Stephen O. Duke, Abbas Ali and Luiz H. Rosa. New phytotoxic diterpenoids from *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an endemic neotropical plant living in the endangered Brazilian biome Rupestrian grasslands. Submetido para a revista *Molecule*, em 7/12/2016.

## *Yamadazyma riverae* sp. nov., a yeast species isolated from plant materials

Mariana R. Lopes,<sup>1</sup> Mariana C. Ferreira,<sup>1</sup> Tatiana F. C. Carvalho,<sup>2</sup> Fernando C. Pagnocca,<sup>2</sup> Rafaella A. Chagas,<sup>3</sup> Paula B. Morais,<sup>3</sup> Luiz H. Rosa,<sup>1</sup> Marc-André Lachance<sup>4</sup> and Carlos A. Rosa<sup>1</sup>

Correspondence  
Carlos A. Rosa  
carlosa@icb.ufmg.br

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, ICB, C.P. 486, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil

<sup>2</sup>Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências, UNESP – Univ Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 13506-900, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO 77020-220, Brazil

<sup>4</sup>Department of Biology, University of Western Ontario, N6A 5B7, London, Ontario, Canada

Nine strains of a novel yeast species were isolated from rotting wood, tree bark, ant nests or living as endophytes in leaves of *Vellozia gigantea*. Analysis of the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region and the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene showed that this species was related to *Candida insectorum* in the *Yamadazyma* clade. The novel species differed from closely related species by 10 and 11 substitutions in the ITS region and the D1/D2 domains of the large subunit of the rRNA gene, respectively. The species is heterothallic and forms asci with one to two hat-shaped ascospores. The name *Yamadazyma riverae* sp. nov. is proposed for the novel species. The type strain is UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> (=CBS 14121<sup>T</sup>) and the allotype strain is TT12 (=CBS 14098=UFMG-CM-Y577). The Mycobank number is MB 813221.

The genus *Yamadazyma* was described by Billon-Grand (1989) to accommodate species that had previously been assigned to the genus *Pichia*. These species formed hat-shaped ascospores, produced pseudohyphae, fermented sugars, required an exogenous source of vitamins for growth and had coenzyme Q-9 (CoQ-9) as their major ubiquinone (Billon-Grand, 1989; Kurtzman, 2011). Analysis of the D1/D2 domains of the large subunit (LSU) rRNA gene by Kurtzman & Robnett (1998) showed the polyphyletic nature of the genus *Yamadazyma*, and the genus was not generally accepted as initially proposed. Kurtzman & Suzuki (2010) examined phylogenetic relationships among species of the genus *Pichia* that form CoQ-9 and proposed a new circumscription for the genus *Yamadazyma*, with six ascosporegenous species and 11 asexual species assigned to the genus *Candida*. Other species of the genus *Yamadazyma* were described recently as

*Y. terventina*, *Y. siamensis*, *Y. phyllophila*, *Y. paraphyllophila*, *Y. ubonensis*, *Y. insecticola* and *Y. epiphylla* (Ciafardini *et al.*, 2013; Kaewwichian *et al.*, 2013; Junyapate *et al.*, 2014; Jindamorakot *et al.*, 2015). The recently described species *Candida khao-thaluensis*, *Candida oceani*, *Candida vaughaniae* and *Candida tallmaniae* also belong to the *Yamadazyma* clade (Nakase *et al.*, 2008; Burgaud *et al.*, 2011; Groenewald *et al.*, 2011). Daniel *et al.* (2014) suggested, based on sequence analysis, that approximately 40 species of the genus *Candida* belong to the *Yamadazyma* clade and the genus *Yamadazyma* could represent one of the larger genera of Debaryomycetaceae.

Independent yeast surveys in the Brazilian states of Minas Gerais, São Paulo and Tocantins yielded nine strains with similar physiological profiles. Analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region and D1/D2 variable domain of the LSU rRNA gene indicated that these isolates belonged to a novel species of the genus *Yamadazyma*, with *Candida insectorum* as the closest asexual relative and *Yamadazyma mexicana* as the closest sexual relative. In this work, we describe the species as *Yamadazyma riverae* sp. nov.

Strains UFMG-CM-Y442, UFMG-CM-Y443, UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> and UFMG-CM-Y445 were isolated from decaying wood. Samples were collected aseptically in October 2011

Abbreviations: CoQ-9, coenzyme Q-9; ITS, internal transcribed spacer; LSU, large subunit.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences of the ITS region and D1/D2 domain of the large subunit of the rRNA gene determined in this study are KP900044 and KP900043, respectively.

in Canguçu Research Center, Tocantins State. Isolation of strains UFMG-CM-Y442 and UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> was performed in cellobiose medium (yeast nitrogen base 0.67 %, cellobiose 0.5 %, chloramphenicol 0.02 % and ethanol 2 %). Strains UFMG-CM-Y443 and UFMG-CM-Y445 were isolated in CMC medium (yeast nitrogen base 0.67 %, carboxymethyl-cellulose 1 %, cellobiose 0.05 %, chloramphenicol 0.02 % and ethanol 2 %). These media were incubated at 25 °C for 3–15 days. Strains UFMG-CM-Y389 and UFMG-CM-Y390 were isolated from the bark of *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae), collected respectively in the municipalities of Aurora do Tocantins and Taguatinga, Tocantins state. The samples were incubated without shaking in raffinose medium (yeast nitrogen base 0.67 %, raffinose 1 % and ethanol 8 %) at 30 °C (for the isolation of UFMG-CM-Y389) or 10 °C (for strain UFMG-CM-Y390) until detection of growth (up to 30 days), as described by Sampaio & Gonçalves (2008); the strains were isolated from two different bark samples. Strains UFMG-CM-Y575 and UFMG-CM-Y576 were isolated from leaves of *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) collected at the Serra do Cipó National Park, Minas Gerais State, in May 2013. Fragments of each leaf were cut, surface-sterilized and plated into Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA; Difco) supplemented with 100 mg ml<sup>-1</sup> chloramphenicol and incubated at 25 °C, as described by Ferreira *et al.* (2015). Strain TT12 (=UFMG-CM-Y577) was isolated from the fungus garden of the attine ant *Mycocepurus goeldii* (Hymenoptera: Formicidae: Attini), collected at Lageado Farm, Botucatu, São Paulo State in March 2008. Isolation was performed in yeast malt broth (malt extract 0.3 %, yeast extract 0.3 %, peptone 0.5 %, glucose 1 % and chloramphenicol 0.01 %) at 22 °C for 5 days. All yeast isolates were purified by repeated streaking on YM agar plates and preserved at -80 °C. The yeasts were morphologically and physiologically characterized using standard methods (Kurtzman *et al.*, 2011).

The ribosomal cluster region spanning the ITS, including the 5.8S rRNA gene, and the D1/D2 domains of the large subunit rRNA gene was amplified by PCR directly from whole yeast cells as described previously (Lachance *et al.*, 1999). Sequencing was performed using an ABI3130 capillary electrophoresis apparatus, with BigDye version 3.1 and POP7 polymer. Sequences were assembled, edited and aligned with MEGA6 software (Tamura *et al.*, 2013). The obtained sequences were compared with those included in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul *et al.*, 1990). Phylogenetic trees were reconstructed from programs provided within the MEGA6 software package. Phylogenetic placement of the novel species was based on a maximum-likelihood analysis of combined ITS and D1/D2 sequences. Substitutions were fitted to the General Time Reversible model (Nei & Kumar, 2000), which is the model that gave the highest log-likelihood (-8291). Rate differences among sites

followed a gamma distribution with five categories. The analysis used 989 aligned positions. Bootstrap values were determined from 100 iterations.

Sequence comparisons of the ITS region and the D1/D2 domains of the LSU rRNA gene indicated that the isolated strains belong to a novel yeast species within the genus *Yamadazyma* (Fig. 1) The novel species is closely related to *C. insectorum*; the two species differ by 11 and 10 substitutions in the ITS and D1/D2 regions, respectively. The novel species is also related to *Candida aaseri*, *Candida pseudoaaseri*, *Candida andamanensis*, *Candida conglobata* and *Candida trypodendroni*. The closest sexual relatives of the novel species are *Y. mexicana* and *Y. terventina*. Sequences of the ITS region and D1/D2 domains of the nine strains of the novel species were identical. The name *Yamadazyma riverae* sp. nov. is proposed to accommodate these yeast strains.

The association of the strains of the novel species with plant materials suggests that *Y. riverae* sp. nov. is an inhabitant of these substrates. Several species of the *Yamadazyma* clade have been described in association with plant materials, for example *C. kanchanaburiensis*, *C. khao-thaluensis*, *C. vaughaniae*, *C. tallmaniae*, *C. oceani*, *Y. siamensis*, *Y. phyllophila* and *Y. paraphyllophila*, *Y. ubonensis*, *Y. insecticola* and *Y. epiphylla* (Nakase *et al.*, 2008; Burgaud *et al.*, 2011; Groenewald *et al.*, 2011; Kaewwichian *et al.*, 2013; Junyapate *et al.*, 2014; Jindamorakot *et al.*, 2015). Insects visiting these substrates could act as vectors of the species. Association with insects has previously been reported for other species of the *Yamadazyma* clade such as *Y. akitaensis*, *Y. nakazawae*, *Y. scolyti*, *C. amphixiae*, *C. cerambycidarum*, *C. dendronema*, *C. diddensiae*, *C. endomychidarum*, *C. gorgasii*, *C. lessepsii*, *C. michaeli* and *C. naeodendra* (Kurtzman, 2011; Lachance *et al.*, 2011).

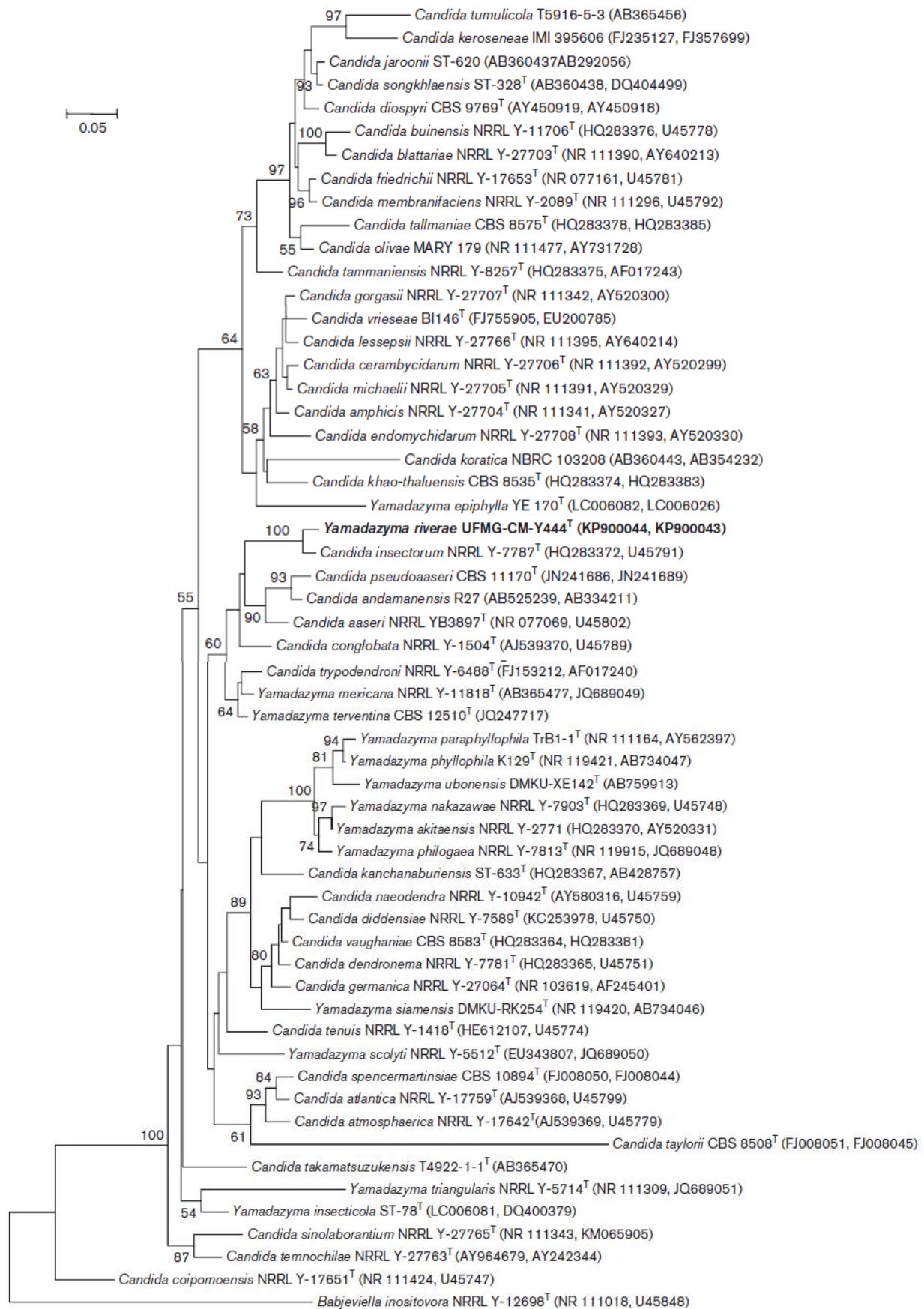
Phenotype-based separation of *Y. riverae* sp. nov. from its close relatives is shown in Table 1. *Y. riverae* sp. nov. is not easily distinguished from other subclade members, in particular *Y. terventina*, which has identical growth responses. Identification should rely on sequence data.

*Y. riverae* sp. nov. is heterothallic and ascus formation is preceded by conjugation between independent cells. Strains UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> (*h*<sup>+</sup>) and UFMG-CM-Y577<sup>A</sup> (*h*<sup>-</sup>), when mixed in pairs on 2 % malt extract agar, after 3 days produce asci with one or two hat-shaped ascospores (Fig. 2). Strains UFMG-CM-Y576, UFMG-CM-Y575, UFMG-CM-Y443, UFMG-CM-Y445 and UFMG-CM-Y389 produced ascospores when mixed with the type strain (*h*<sup>+</sup>) and strains UFMG-CM-Y442 and UFMG-CM-Y390 produced ascospores when mixed with the allotype (*h*<sup>-</sup>).

**Description of *Yamadazyma riverae* M. R. Lopes, M. C. Ferreira, F. C. Pagnocca, P. B. Morais, L. H. Rosa, M. A. Lachance & C. A. Rosa sp. nov.**

*Yamadazyma riverae* (ri.ve'rae. NL. gen. sing. f. n. *riverae* pertaining to Rivera, in honour of Irma Nelly Gutierrez





**Fig. 1.** Phylogenetic placement of *Yamadazyma riverae* sp. nov. among species of the *Yamadazyma* clade based on a maximum-likelihood analysis of combined ITS and D1/D2 sequences. The analysis is based on 989 aligned positions. GenBank accession numbers for the ITS, D1/D2 sequences are shown in parentheses. Bar, 0.05 substitutions per site.

4

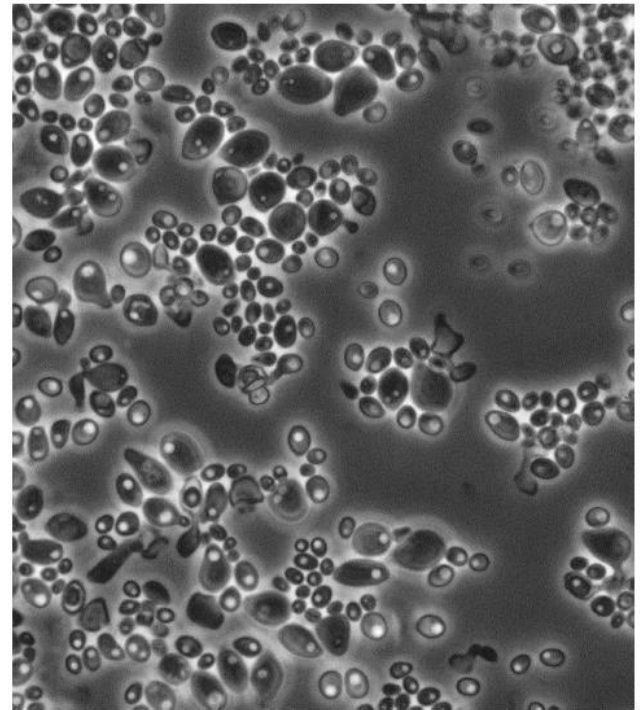
**Table 1.** Comparison of selected phenotypic properties of *Yamadazyma riverae* sp. nov. and phylogenetically closely related species

Species: 1, *Yamadazyma riverae* sp. nov. (data from this study); 2, *C. insectorum* (Lachance *et al.*, 2011); 3, *Y. Mexicana* (Miranda *et al.*, 1982; Kurtzman, 2011); 4, *C. conglobata* (Lachance *et al.*, 2011); 5, *C. andamanensis* (Am-In *et al.*, 2011); 6, *C. pseudoaaseri* (Pfüller *et al.*, 2011); 7, *C. aaseri* (Lachance *et al.*, 2011); 8, *Y. terventina* (Ciafardini *et al.*, 2013). +, Positive; -, negative; v, variable; s, slow; ND, not determined.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8
Assimilation of:								
Sucrose	+	+	+	-	+	+	+	+
Raffinose	-	s	+	-	-	-	-	-
Lactose	-	v	+	-	-	-	v	-
Maltose	+	+	+	-	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	-	+	+	s	+
L-Sorbose	+	s	-	+	+	-	s	+
L-Rhamnose	+	+	+	-	-	+	-	+
D-Arabinose	-	v	v	s	+	ND	v	-
Growth on/in:								
0.01% Cycloheximide	-	v	-	-	+	-	-	-
50% glucose	-	-	-	s	+	ND	-	-

Rivera, in recognition of her contribution to the studies on environmental microbiology in Brazil).

After 3 days on YM agar at 25 °C, cells are ovoid to ellipsoid (1.5–3.0 × 2.0–4.5 µm) and occur singly or in pairs without formation of pseudohyphae or septate hyphae. Colonies are smooth, glistening, cream-coloured and convex. The species is heterothallic. Asci develop from conjugation of complementary mating types. When mixed in pairs on 2 % malt extract agar, after 3 days at 25 °C, strains UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> (*h*<sup>+</sup>) and TT12 (=UFMG-CM-Y577) (*h*<sup>-</sup>) produce asci with one or two hat-shaped ascospores (Fig. 2). Fermentation of D-glucose is positive. Glucose, sucrose, galactose, trehalose, maltose, melezitose, cellobiose, salicin, L-sorbose, L-rhamnose, D-xylose, L-arabinose, D-ribose (variable), ethanol, glycerol, erythritol (variable), ribitol, D-mannitol, D-glucitol, xylitol, DL-lactate (weak), succinic acid, citrate (weak), D-gluconate, N-acetyl-D-glucosamine and hexadecane (slow) are assimilated. No growth occurs on inulin, raffinose, melibiose, lactose, soluble starch, D-arabinose, methanol, galactitol, *myo*-inositol, acetone and 2-propanol. Lysine is utilized as a sole nitrogen source, but no growth is observed on nitrate or nitrite. Growth on amino acid-free medium is positive. Growth in vitamin-free medium is negative. Growth at 30 °C is positive, at 37 °C is variable and at 40 °C is negative.



**Fig. 2.** Budding cells, conjugated cells, asci and hat-shaped ascospores of *Yamadazyma riverae* sp. nov. UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> (*h*<sup>+</sup>) and UFMG-CM-Y577 (*h*<sup>-</sup>) on 2 % malt extract agar culture, after 3 days at 25 °C. Bar, 5 µm.

5

No growth is observed on 0.01 % cycloheximide, 1 % acetic acid or 50 % (w/w) glucose. Growth on 10 % (w/v) sodium chloride/5 % (w/v) glucose is positive. Starch-like compounds are not produced. Acid production is variable among the isolates. The habitat is plant materials in Brazil.

The type strain UFMG-CM-Y444<sup>T</sup> (*h*<sup>+</sup>) was isolated from rotting wood in Canguçu Research Center, Tocantins State, Brazil. The type strain has been deposited in the Collection of Microorganisms and Cells of Federal University of Minas Gerais (Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, as strain UFMG-CM-Y444<sup>T</sup>, and is permanently preserved in a metabolically inactive state. Ex-type culture has been deposited in the collection of the Yeast Division of the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands, as strain CBS 14121<sup>T</sup>. The designated allotype, TT12 (*h*<sup>-</sup>) (=CBS14098=UFMG-CM-Y577) was isolated from fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) in Brazil. The Mycobank number is MB 813221.

## Acknowledgements

This work was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (processes numbers 141563/2011-7 and 45443/2012-0-PPBio/GEOMA), the Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (RDP-00094-10), the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), (process 2084/07) and the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (M. A. L.).

## References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Am-In, S., Limtong, S., Yongmanitchai, W. & Jindamorakot, S. (2011). *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov. and *Candida ranongensis* sp. nov., anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 454–461.
- Billon-Grand, G. (1989). A new ascosporeogenous yeast genus: *Yamadazyma* gen. nov. *Mycotaxon* 35, 201–204.
- Burgaud, G., Arzur, D., Sampaio, J. P. & Barbier, G. (2011). *Candida oceani* sp. nov., a novel yeast isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent (–2300 meters). *Antonie van Leeuwenhoek* 100, 75–82.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., Antonielli, L., Corte, L., Roscini, L. & Cardinali, G. (2013). *Yamadazyma terventina* sp. nov., a yeast species of the *Yamadazyma* clade from Italian olive oils. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 372–376.
- Daniel, H. M., Lachance, M. A. & Kurtzman, C. P. (2014). On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuwenhoek* 106, 67–84.
- Ferreira, M. C., Vieira, M. L. A., Zani, C. L., Alves, T. M. A., Sales, P. A. Jr, Murta, S. M. F., Romanha, A. J., Gil, L. H. V. G., Carvalho, A. G. O. & other authors (2015). Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochem Syst Ecol* 59, 36–44.
- Groenewald, M., Robert, V. & Smith, M. T. (2011). The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia* 26, 40–46.
- Jindamorakot, S., Am-In, S., Kaewwichian, R. & Limtong, S. (2015). *Yamadazyma insecticola* f.a., sp. nov. and *Yamadazyma epiphylla* f.a., sp. nov., two novel yeast species. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 1290–1296.
- Junyapate, K., Jindamorakot, S. & Limtong, S. (2014). *Yamadazyma ubonensis* f.a., sp. nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek* 105, 471–480.
- Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H., Wang, P. H., Yang, S. H. & Limtong, S. (2013). *Yamadazyma siamensis* sp. nov., *Yamadazyma phyllophila* sp. nov. and *Yamadazyma paraphyllophila* sp. nov., three novel yeast species isolated from phylloplane in Thailand and Taiwan. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 777–788.
- Kurtzman, C. P. (2011). *Yamadazyma* Billon-Grand (1989). In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, pp. 919–925. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout. 5th edn., Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331–371.
- Kurtzman, C. P. & Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleroyzyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 51, 2–14.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, pp. 87–107. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout. 5th edn., Amsterdam: Elsevier.
- Lachance, M. A., Bowles, J. M., Starmer, W. T. & Barker, J. S. F. (1999). *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Can J Microbiol* 45, 172–177.
- Lachance, M. A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J. W. & Kurtzman, C. P. (2011). *Candida* Berkhout (1923). In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, pp. 987–1278. Edited by C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout. 5th edn., Amsterdam: Elsevier.
- Miranda, M., Holzschu, D. L., Phaff, H. J. & Starmer, W. T. (1982). *Pichia mexicana*, a new heterothallic yeast from cereoid cacti in the North American Sonoran desert. *Int J Syst Bacteriol* 32, 101–107.
- Nakase, T., Jindamorakot, S., Ninomiya, S., Imanishi, Y., Kawasaki, H. & Potacharoen, W. (2008). *Candida kanchanaburiensis* sp. nov., a new ascomycetous yeast species related to *Pichia nakazawae* isolated in Thailand. *J Gen Appl Microbiol* 54, 259–265.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*, New York: Oxford University Press.
- Pfüller, R., Gräser, Y., Erhard, M. & Groenewald, M. (2011). A novel flucytosine-resistant yeast species, *Candida pseudoaaseri*, causes disease in a cancer patient. *J Clin Microbiol* 49, 4195–4202.
- Sampaio, J. P. & Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microbiol* 74, 2144–2152.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725–2729.

1 **Endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia***  
2 ***gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands**

3

4 Mariana C. Ferreira<sup>1</sup>, Charles L. Cantrell<sup>2\*</sup>, David E. Wedge<sup>2</sup>, Vívian N. Gonçalves<sup>1</sup>, Melissa R. Jacob<sup>3</sup>,  
5 Shabana Khan<sup>3</sup>, Carlos A. Rosa<sup>1</sup>, Luiz H. Rosa<sup>1\*\*</sup>

6

7 <sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

8 <sup>2</sup>United States Department of Agriculture, USDA-ARS, Natural Products Utilization Research Unit,  
9 Mississippi, USA

10 <sup>3</sup>The University of Mississippi, National Center for Natural Products Research, Mississippi, USA

11

12 **Running Head:** Endophytic fungi from *Vellozia gigantea*

13

14 \*Corresponding author. United States Department of Agriculture, USDA-ARS, Natural Products  
15 Utilization Research Unit, MS 38677, +1-662-915-1137, Mississippi, USA. Email: clcantr1@olemiss.edu

16 \*\*Corresponding author. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo  
17 Horizonte, MG, CEP 31270-901. Tel.: +55-31-3409 2749; Fax: +55-31-3409 2730, Brazil. E-mail:

18 [lhrosa@icb.ufmg.br](mailto:lhrosa@icb.ufmg.br)

19

20

21 **Abstract**

22 Endophytic fungi represent an important microbial group of the worldwide fungal diversity. This study  
23 focused on the taxonomy and diversity, as well as bioprospecting of bioactive compounds, of the  
24 endophytic fungi associated with *Vellozia gigantea*, an endemic, ancient, and endangered plant species  
25 that occurs only in the rupestrian grasslands of Brazil. Of the 87 taxa classified for the 285 fungal isolates  
26 studied, 19 taxa were identified to the genus and family levels or to an unknown status, which may  
27 represent new species. The diversity indices displayed high values, showing that *V. gigantea* shelters a  
28 diverse and rich mycobiota. Among all the taxa identified, 62 occurred as singlets, which included those  
29 able to produce antimicrobial and antimalarial compounds. The *Diaporthe miriciae* extract showed the  
30 presence of highly functionalised secondary metabolites, yielding the compound epoxychochalin H  
31 with high antimalarial activity against the chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*, with an  
32 IC<sub>50</sub> of about 3.5-fold lower than that with chloroquine. Our results indicate that *V. gigantea* shelters in its  
33 tissues a highly diverse and cryptic mycobiota not previously reported as endophytes, including taxa  
34 reported to have different ecological functions as well as the capability to produce bioactive compounds.  
35 These endophytic fungi might be an important biological component contributing to the fitness of the  
36 plants living in the Brazilian rupestrian grasslands.

37

38 **Keywords:** Ancient plant; diversity; fungi; natural products; taxonomy

39

## 40 **1. Introduction**

41 Different definitions of endophytes have been proposed since their discovery in the nineteenth century  
42 (Schulz and Boyle, 2005). Compant et al. (2016) describe endophytes as being any neutral, commensal,  
43 and/or beneficial microorganisms, as well as dormant saprobes and pathogens in the latent phase of their  
44 life cycle, which can be isolated from asymptomatic plant tissue. Additionally, endophytes seem to be  
45 closely associated with different parts of their host plants (Hardoim et al., 2015). Although many  
46 endophytic microbes have been regarded as symbionts that promote some benefit to their host, several  
47 endophytic species have been reported to be decomposers or parasites (Schulz and Boyle, 2005).  
48 According to Rosa et al. (2011), endophytic fungi include a high diversity of species, mainly in the phyla  
49 Ascomycota and Basidiomycota, which are associated with different plants around the world and  
50 represent an important group of the worldwide fungal diversity.

51 Additionally, endophytic fungi are an important source of bioactive metabolites, with a wide range of  
52 different biological activities (Strobel et al., 2004; Rosa et al., 2010). According to Strobel et al. (2004),  
53 plants from unique environmental settings, endemic species, and those with unusual longevity can be  
54 interesting targets for the recovery of unique endophytic species able to produce bioactive compounds.

55 Among the typical biomes in Brazil, the Espinhaço Mountain Range has the rupestrian grasslands  
56 ('campo rupestre') which include valleys, canyons, ranges, and rock outcrops at high elevations that  
57 shelter a high richness of different endemic plant species (Joly, 1970; Giuliatti and Pirani, 1988; Lousada  
58 et al., 2011). The Espinhaço Mountain Range is located in eastern Brazil in the states of Minas Gerais and  
59 Bahia, and extends approximately 1,000 km in a North-South direction (UNESCO, 2005). According to  
60 Silveira et al. (2015), the diversification of plant lineages present in the rupestrian grasslands occurred  
61 before the diversification of the Brazilian lowland savannas ('cerrado'), suggesting it is the most ancient  
62 open vegetation in eastern South America. In addition, the Brazilian rocky fields comprise more than  
63 5,000 plant species (about 15% of Brazilian plant diversity) in an area corresponding to 0.78% of its  
64 surface.

65 Brazil has a rich biodiversity of plant species, including those reported as being endemic. Among the  
66 endemic plants of the rupestrian grasslands, those of Velloziaceae occur at a high frequency and comprise  
67 about 240 predominately neotropical and several other species (Menezes et al., 1994; Lousada et al.,  
68 2011). *Vellozia*, known locally as 'cana-de-ema', is the largest genus in the family and includes about  
69 105 species (Menezes et al., 1994). Different *Vellozia* species are important phorophytes for many plant

70 taxa, such as species of the family Orchidaceae, which represent epiphytes occurring exclusively on the  
71 stems of *Vellozia* (Barros and Lourenço, 2004). *Vellozia gigantea* N. L. Menezes & Mello-Silva  
72 (*Velloziaceae*), a recently described species, is the tallest in the family, reaching more than 6 m, and is  
73 considered to be threatened by extinction (Lousada et al., 2011). There is little information about the  
74 biology of *V. gigantea*, including the age of its population. According to Alves (1994), the dracenoid  
75 species of *Vellozia*, like *V. gigantea*, may represent an ancient plant that could be hundreds of thousands  
76 of years old. Furthermore, *V. gigantea* has been classified as vulnerable owing to its small population size  
77 and very restricted distribution, being considered endemic to the rocky field vegetation in the rupestrian  
78 grasslands in eastern Brazil, specifically present in Serra do Cipó National Park (Mello-Silva and  
79 Menezes, 1999). In the present study, we focused on the taxonomy, diversity, community structure,  
80 ecology, and phylogenetic inferences of endophytic fungal communities associated with *V. gigantea*, as  
81 well as bioprospecting of their ability to produce antimicrobial, antimalarial, and other bioactive  
82 compounds.

83

## 84 **2. Materials and methods**

### 85 *2.1. Plant collection and isolation of fungal endophytes*

86 Specimens of *V. gigantea* were collected in May 2013, at Serra do Cipó National Park (19°14'874"S;  
87 043°30'574"W), a protected area in the state of Minas Gerais, Brazil. Identification of *V. gigantea* was  
88 based on comparisons with the voucher specimen deposited at the herbarium of the Institute of Biological  
89 Science (BHCB) of the Federal University of Minas Gerais, Brazil  
90 (<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>) under the code BHCB 102620. The collection of  
91 the plant material was carried out according to the Brazilian biological diversity rules.

92 A total of 32 *V. gigantea* specimens were sampled, of which roots were obtained from 18 specimens  
93 and leaves from 32 specimens. Three leaves and 3 roots were obtained from each individual plant, placed  
94 in sterile plastic bags, and stored for less than 24 h at 10 °C until the isolation of endophytic fungi. Five  
95 fragments (approximately 0.5 cm long and 0.5 cm wide) of each leaf and root were cut using a flame-  
96 sterilised blade in a laminar flow hood. The tissue fragments were surface disinfected by immersing in  
97 70% ethanol (1 min) and 2% sodium hypochlorite (3 min), followed by washing with sterile distilled  
98 water (2 min) (Collado et al., 1996). The fragments were plated onto Petri dishes containing potato  
99 dextrose agar (PDA; Difco, USA) supplemented with 200 mg L<sup>-1</sup> chloramphenicol. The plates were

100 incubated at 25 °C for 60 days. To test the effectiveness of the surface sterilisation, 100 µL of the final  
101 rinsing water was plated on PDA medium and incubated under the same conditions. Hyphal growth was  
102 monitored over an 8-week period. Using an aseptic technique, endophytes were transferred to PDA  
103 contained in 60-mm Petri plates and photographed after growth completion. The long-term preservation  
104 of filamentous fungal colonies was carried out in cryotubes containing 15% sterile glycerol at –80 °C, and  
105 in sterile distilled water at room temperature. All pure cultures of the endophytic fungal isolates were  
106 deposited in the Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University of Minas  
107 Gerais.

108

## 109 *2.2. Fungal identification*

110 The protocol for DNA extraction was described previously by Rosa et al. (2009). The internal transcribed  
111 spacer (ITS) region was amplified with the universal primers ITS1 and ITS4 (White et al., 1990).  
112 Amplification of the ITS region was performed as described by Rosa et al. (2009). Amplification of the β-  
113 tubulin (Glass and Donaldson, 1995) and ribosomal polymerase II genes (RPB2) (Houbraken et al., 2012)  
114 were performed with the Bt2a/Bt2b and RPB2-5F-Pc/RPB2-7CR-Pc 7CR primers, respectively,  
115 according to protocols established by Godinho et al. (2013). The obtained sequences were analyzed with  
116 SeqMan P with Lasergene software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA), and a consensus sequence  
117 was obtained using Bioedit v. 7.0.5.3 software (Carlsbad, ON, Canada). Representative consensus  
118 sequences of fungal taxa were deposited into GenBank (Suppl. Table 1). To achieve species-rank  
119 identification based on ITS, β-tubulin data and ribosomal polymerase B2, the consensus sequence was  
120 aligned with all sequences from related species retrieved from the NCBI GenBank database using BLAST  
121 (Altschul et al., 1997). Taxa that displayed query coverage and identities ≤98% or an inconclusive  
122 taxonomic position were subjected to phylogenetic ITS, β-tubulin and ribosomal polymerase B2-based  
123 analysis in comparison with sequences of type species deposited in the GenBank database, with  
124 estimations conducted using MEGA Version 6.0 (Tamura et al., 2013). The maximum composite  
125 likelihood method was employed to estimate evolutionary distances with bootstrap values calculated from  
126 1,000 replicate runs. The information about fungal classification generally follows Kirk et al. (2008),  
127 MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) databases.

128

## 129 *2.3. Ecological analysis*



130 To quantify species diversity, richness and dominance, we used Fisher's  $\alpha$ , Margalef's and Simpson's  
131 indices, respectively. All diversity and similarity indices were performed using the computer program  
132 PAST, version 1.90 (Hammer et al., 2001).

133

#### 134 2.4. Fungal cultivation and preparation of extracts for biological assays

135 All fungal isolates were cultivated according to protocols established by Rosa et al. (2013). In brief, a  
136 5-mm-diameter plug of each isolate was placed on 20 mL of PDA medium at the centre of the Petri dishes  
137 (90 mm diameter) and cultured for 15 days at  $25 \pm 2$  °C (time enough for fungi to produce secondary  
138 metabolites). These fungal cultures were lyophilised for 72 h, cut into small pieces, and transferred to 50-  
139 mL glass centrifuge tubes, to which 50 mL of dichloromethane (DCM; Fisher Scientific, USA) was then  
140 added. After 72 h at room temperature, the organic phase was filtered and the solvent was removed under  
141 rotary evaporation at 40 °C. An aliquot of each dried extract was dissolved in dimethyl sulphoxide  
142 (Merck, USA) to prepare a 100 mg mL<sup>-1</sup> stock solution, which was stored at -20 °C. Sterile PDA medium  
143 was extracted under the same procedure and used as the control in the screening tests.

144

#### 145 2.5. Assays for antimicrobial activity

146 Susceptibility testing of the fungal extracts, fractions and compounds from purification of extracts were  
147 performed against *Candida albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258,  
148 *Cryptococcus neoformans* ATCC 90113, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Staphylococcus aureus*  
149 ATCC 29213, methicillin-resistant *S. aureus* ATCC 33591 (MRS), *Escherichia coli* ATCC 35218,  
150 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Mycobacterium intracellulare* ATCC 23068. All  
151 microorganisms were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and tested  
152 using modified versions of the CLSI (formerly NCCLS) methods (NCCLS M27 – A2, vol. 22 n° 15;  
153 NCCLS M7 – A7, vol. 26 n° 2; NCCLS M24 – A, vol. 23 n° 18; NCCLS M38 – A, vol. 22 n° 16). The  
154 bioassay test on *Mycobacterium intracellulare* was done using a modified method (Franzblau et al. 1998).  
155 Samples were serially-diluted in 20% DMSO/saline and transferred in duplicate to 96-well flat bottom  
156 microplates. Microbial inocula were prepared by correcting the OD<sub>630</sub> of microbe suspensions in  
157 incubation broth to afford final target inocula. Ciprofloxacin (ICN Biomedicals, Ohio) at 1 µg mL<sup>-1</sup> for  
158 bacteria and amphotericin B (ICN Biomedicals, Ohio) at 5 µg mL<sup>-1</sup> for fungi are included as positive  
159 controls in each assay. All organisms were read at either 530 nm using the Biotek Powerwave XS plate

160 reader (Bio-Tek Instruments, Vermont) or 544ex/590em (*M. intracellulare*, *A. fumigatus*) using the  
161 Polarstar Galaxy Plate Reader (BMG LabTechnologies, Germany) prior to and after incubation. Percent  
162 growth was plotted versus test concentration to afford the IC<sub>50</sub>.

163

#### 164 2.6. Assay for screening antimalarial activity and cytotoxicity

165 The antimalarial activity was determined against chloroquine sensitive (D6) and chloroquine resistant  
166 (W2) strains of *Plasmodium falciparum* by measuring plasmodial LDH activity according to the  
167 procedure of Makler et al. (1993). A suspension of red blood cells infected with D6 or W2 strain of *P.*  
168 *falciparum* (200 µL, with 2% parasitemia and 2% hematocrit in RPMI 1640 medium supplemented with  
169 10% human serum and 60 µg/mL Amikacin) was added to the wells of a 96- well plate containing 10 µL  
170 of serially diluted samples (plant extracts, column fractions or pure compounds). The plate is incubated at  
171 37 °C, for 72 h in a modular incubation chamber with 90% N<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub>. Parasitic LDH  
172 activity was determined by mixing 20 µL of the incubation mixture with 100 µL of the Malstat reagent  
173 and incubating at room temperature for 30 min. Twenty microliters of a 1:1 mixture of NBT/PES (Sigma,  
174 St. Louis, MO) is then added and the plate is further incubated in the dark for 1 h. The reaction is then  
175 stopped by adding 100 µL of a 5% acetic acid solution and the absorbance was read at 650 nm.  
176 Artemisinin and chloroquine are included as the drug controls. IC<sub>50</sub> values are computed from the dose  
177 response curves of growth inhibition using XLfit 4.2. The in vitro cytotoxicity of samples to mammalian  
178 cells were also tested in order to determine the selectivity index of the antimalarial activity. The assay  
179 was performed in 96-well tissue culture-treated plates. Vero cells (monkey kidney fibroblasts) were  
180 seeded to the wells of 96-well plate at a density of 25,000 cells well<sup>-1</sup> and grown for 24 h. Samples at  
181 different concentrations are added and cells are further incubated for 48 h. Cell viability was determined  
182 by Neutral Red method (Borenfreund, et al., 1990). IC<sub>50</sub> values are obtained from dose response curves.  
183 Doxorubicin was included as drug control.

184

#### 185 2.7. NMR spectroscopy

186 Bioactive fungal extracts, fractions and pure compounds were analysed by NMR spectroscopy on a  
187 Bruker UXNMR 500 MHz spectrometer (Billerica, MA, USA). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra recorded in  
188 either CDCl<sub>3</sub> or DMSO-d using a standard <sup>1</sup>H NMR pulse program.

189

190 2.8. Crude extract preparation for bioassay-directed purification

191 Five-millimetre-diameter plugs of each fungal isolate were placed onto 20 mL of PDA medium at the  
192 centre of 350 Petri dishes (90 mm diameter) and cultured for 15 days at  $25 \pm 2$  °C. The fungal cultures  
193 were lyophilised for 72 h, cut into small pieces, and transferred to 50-mL glass centrifuge tubes, to which  
194 50 mL of DCM was then added. After 72 h at room temperature, the organic phase was filtered and the  
195 solvent was removed under rotary evaporation at 40 °C. Initially, 1.149 g of *Diaporthe miricidae*  
196 UFMGCB 9720 extract was adsorbed to silica gel and applied to a silica gel chromatography column  
197 (40–63  $\mu\text{m}$ ,  $40 \times 150$  mm, 60 Å). The column was eluted at a flow rate of 40 mL  $\text{min}^{-1}$  using  
198 hexane/EtOAc mixtures with the following gradient: 100% hexane:0% EtOAc to 0% hexane:100%  
199 EtOAc over 3,024 mL, and finishing with a 350 mL MeOH wash. The column eluate was collected in 27-  
200 mL fractions and, on the basis of TLC similarities, recombined into 9 fractions [(A) 1–16, 7.7 mg; (B)  
201 17–20, 9.1 mg; (C) 21–29, 441.4 mg; (D) 30–40, 9.3 mg; (E) 41–43, 11.2 mg; (F) 44–55, 133.8 mg; (G)  
202 56–87, 46.2 mg; (H) 87–112, 12 mg; and (I) wash column, 479.3 mg]. Fractions H and I were selected for  
203 further investigation based on their activities in the antimalarial assays against *Plasmodium falciparum*.  
204 TLC and  $^1\text{H}$  NMR analyses displayed the same chemical profile for fractions H and I. Fraction I was  
205 selected and adsorbed to silica gel and applied to the silica gel chromatography column. Elution of the  
206 column was performed using increasing polarity mixtures of hexane: isopropyl alcohol in a series of 4  
207 linear steps as follows: (step 1) 100:0 to 80:20 over 2,400 mL, (step 2) 80:20 to 50:50 over 1,200 mL,  
208 (step 3) 50:50 to 0:100 over 152 mL, and (step 4) 0:100 over 396 mL. The column eluate was collected  
209 into 27 mL portions and, on the basis of TLC similarities, recombined into 6 fractions [(A') 1–54, 18.8  
210 mg; (B') 55–59, 69.5 mg; (C') 60–70, 168.7 mg; (D') 71–77, 15.2 mg; and (E') 78–169, 23.5 mg].  
211 Fractions B' and C' were selected for further investigation based on their activities in the antimalarial  
212 assays.

213

214 2.9. Identification of epoxychochalsin H

215  $^{13}\text{C}$  NMR (120 MHz in DMSO- $d_6$ )  $\delta$  174.27, 170.04, 138.67, 137.11, 134.13, 129.58, 128.49, 128.36,  
216 126.52, 124.49, 75.39, 72.22, 62.34, 56.74, 53.68, 53.52, 53.23, 48.52, 44.80, 44.67, 42.56, 35.89, 30.45,  
217 27.58, 26.05, 20.44, 19.21, 11.95.  $^{13}\text{C}$  NMR data for fraction B' indicated complete agreement with that  
218 previously reported (Izawa et al., 1989) providing structural confirmation as epoxychochalsin H.

219

## 220 3. Results

### 221 3.1. Taxonomic and diversity analyses

222 Two hundred eighty-five fungal isolates were recovered as endophytes of *V. gigantea*, and were  
223 identified into 27 genera and 87 taxa (Supplementary Table S1). *Xylaria berteri*, *Diaporthe* sp. 1,  
224 *Nigrospora oryzae*, *Muscodor* sp. 1, *Colletotrichum aeshynomene*, and *Trichoderma viride* occurred in  
225 the highest frequency in both the leaf and root. Additionally, *Diaporthe* was the most abundant genus,  
226 with 70 endophytic isolates recovered from the leaves and roots. The taxa distribution in *V. gigantea*  
227 tissue was as follows: 24 taxa occurred in both leaf and root tissues, 36 were obtained only in the leaves,  
228 and 27 were only in the roots (Table S1). Among the total taxa identified, 62 (70%) occurred as singlets  
229 (occurrence  $\leq 2$  isolates), which displayed a phylogenetic relationship with fungi obtained from different  
230 environments. Additionally, the diversity indices displayed high values: Fisher  $\alpha = 42.68$  (diversity),  
231 Margalef = 15.21 (richness), and Simpson = 0.96 (dominance). Fifty-four taxa displayed low molecular  
232 taxonomic identities with sequences of fungi deposited in GenBank, and were identified on the genera,  
233 family, class, or order levels and may represent new species.

234

### 235 3.2. Biological activities

236 Among all fungal extracts screened, 5 displayed at least one biological activity against the different  
237 targets (Table 1). Among them, the extracts of *D. miriciae* UFMGCB 9720 showed antifungal,  
238 antibacterial, and antimalarial activities. *Trichoderma effusum* displayed selective antibacterial activity  
239 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium intracellulare*. Three *Penicillium*  
240 species (*P. herquei*, *P. adametzii*, and *P. quebecense*) showed antibacterial activity.

241 All bioactive extracts were examined using  $^1\text{H}$  NMR analysis for the presence of secondary  
242 metabolites with interesting chemical shifts. The extracts of *T. effusum*, *P. herquei*, *P. adametzii*, and  
243 *Diaporthe* sp. showed only the presence of fatty acids and, for this reason, they were not subjected only to  
244 bioassay-directed purification. In contrast, the *D. miriciae* UFMGCB 9720 extract showed the presence of  
245 highly functionalized secondary metabolites due to the presence of protons in the aromatic and olefinic  
246 regions. Therefore, the extract of *D. miriciae* was fractioned, yielding the compound epoxychochalsin H  
247 (Fig. 1) which displayed high antimalarial activity against both chloroquine-sensitive and chloroquine-  
248 resistant strains of *Plasmodium falciparum*, with  $\text{IC}_{50}$  values of 52 and 39 ng/mL, respectively, without  
249 any cytotoxicity towards mammalian kidney (Vero) cells (Table 2). The  $\text{IC}_{50}$  of epoxychochalsin H in

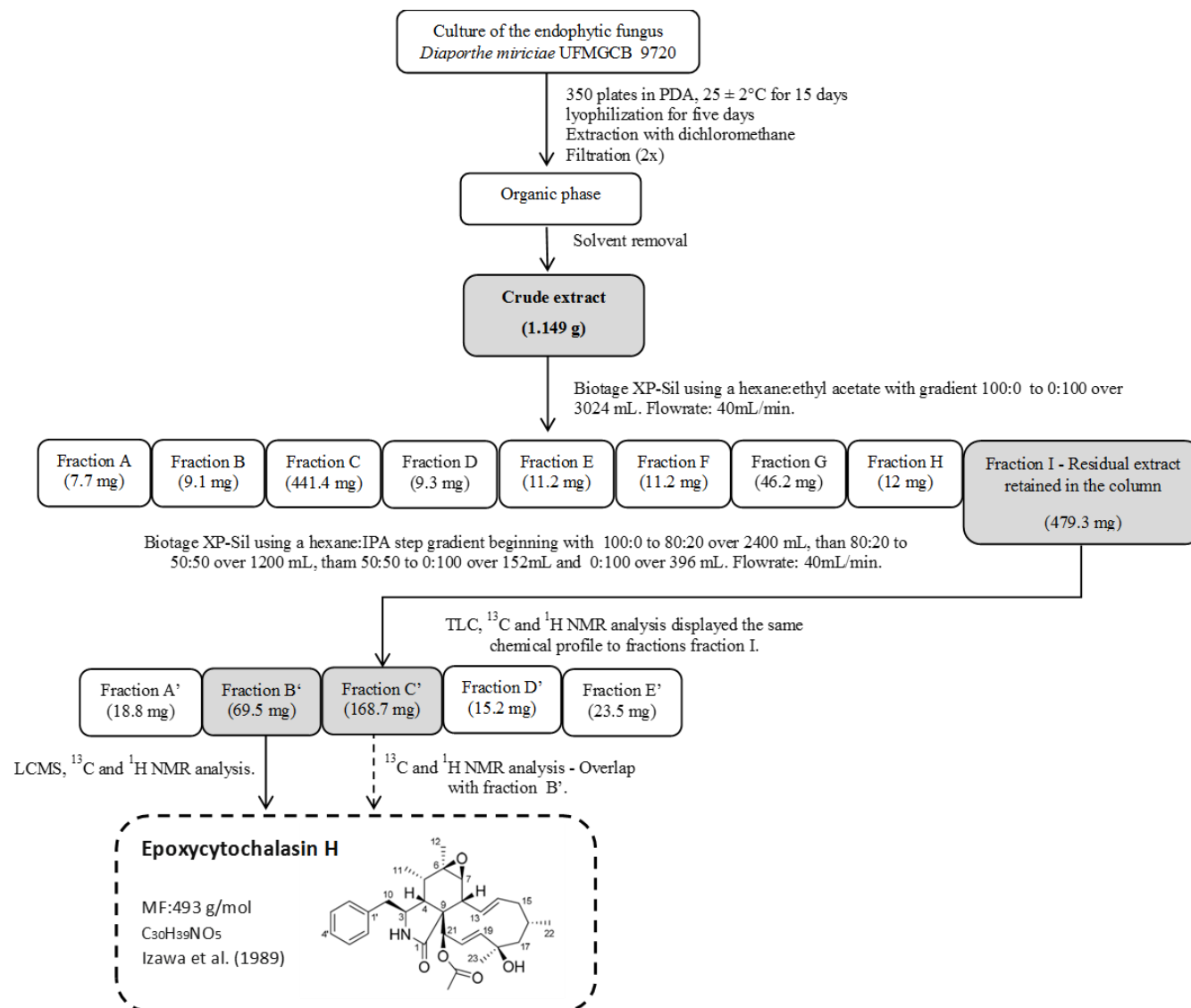
250 the chloroquine-resistant strain was about 3.5-fold lower than that of the control drug chloroquine (Table  
251 2).  
252

**Table 1.** Antifungal, antibacterial and antimalarial activities of endophytic fungal extracts associated with the plant *Vellozia gigantea*.

<sup>a</sup>UFMGCB = Culture of Microorganisms and Cells of the Universidade Federal of Minas Gerais. <sup>b</sup>Concentration which the extract displayed activity against yeasts, filamentous

Fungal species	UFMGCB <sup>a</sup>	Yeasts				Filamentous fungi			Bacteria			Actinobacteria	Malaria <sup>c</sup>
		CA	CG	CK	CN	AF	SA	SA MRS	EC	PA	MI	PC (D6)	
<i>Diaporthe miricidae</i>	9720	<b>148.79<sup>b</sup></b>	<b>11.4</b>	<b>40.83</b>	>200	>200	>200	<b>65.8</b>	>200	>200	>200	<b>94<sup>d</sup></b>	
<i>Trichoderma effusum</i>	9736	>200	>200	>200	>200	>200	>200	<b>64.6</b>	>200	>200	<b>31.98</b>	24	
<i>Penicillium herquei</i>	9829	>200	>200	>200	>200	>200	<b>24.4</b>	<b>9.98</b>	>200	>200	>200	17	
<i>Penicillium adametzii</i>	9894	>200	>200	>200	>200	>200	>200	<b>23.24</b>	>200	>200	>200	36	
<i>Penicillium quebecense</i>	9928	<b>10.81</b>	<b>18.81</b>	<b>14.89</b>	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	39	
Control drugs	Amphotericin B	<b>0.28</b>	<b>0.29</b>	<b>0.63</b>	<b>0.31</b>	<b>1.43</b>	-	-	-	-	-	-	
	Ciprofloxacin	-	-	-	-	-	<b>0.13</b>	<b>0.11</b>	<b>0.01</b>	<b>0.09</b>	<b>0.4</b>	-	

fungi, bacteria and actinobacteria. <sup>c</sup>Against *P. falciparum* the extract was assayed at 15.866 µg/mL and the results showed in <sup>d</sup>Percentage of inhibition. CA = *Candida albicans*; CG = *Candida glabrata*; CK = *Candida krusei*; CN = *Cryptococcus neformans*; AF = *Aspergillus fumigatus*; SA = *Staphylococcus aureus*; SA MRS = *Staphylococcus aureus methicillin resistant*; EC = *Escherichia coli*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; MI = *Mycobacterium intracellulare*; PC (D6) *Plasmodium falciparum* chloroquine sensitive.



**Figure 1.** Flowcharts illustrating the process of chemical isolation of the compound Epoxycytochalasin H obtained from the endophytic fungus *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720.

**Table 2.** Antimalarial activity of the compound Epoxycytochalasin H isolated from the endophytic fungus *Diaporthe miriciae* UFMGCB 9720.

Compound	<i>Plasmodium falciparum</i>				
	D6 <sup>a</sup> - IC <sub>50</sub>	D6 <sup>a</sup> - SI	W2 <sup>b</sup> - IC <sub>50</sub>	W2 <sup>b</sup> - SI	VERO <sup>c</sup> IC <sub>50</sub>
Epoxycytochalasin H	51.7	>92.1	39.4	>120.7	>4760
Chloroquine <sup>d</sup>	10.33	>23	137.65	>1.7	>238
Artemisinin <sup>d</sup>	2.87	>83	3.21	>74	>238

<sup>a</sup>*Plasmodium falciparum* chloroquine sensitive (D6), <sup>b</sup>*Plasmodium falciparum* chloroquine resistant (W2),

<sup>c</sup>Cell VERO, <sup>d</sup>Control drug, IC<sub>50</sub> = Inhibitory Concentration of 50%. SI = Selectivity Index. Values calculated at ng/mL.

253

## 254 4. Discussion

### 255 4.1. Taxonomic and diversity analyses

256 Our results showed that the diversity of the fungal species associated with *V. gigantea* was high when  
 257 compared with other studies of endophyte communities from other plant hosts. The abundant  
 258 cosmopolitan fungal genera (*Xylaria*, *Diaporthe*, *Nigrospora*, *Muscodor*, *Colletotrichum*, and  
 259 *Trichoderma*) obtained as endophytes of *V. gigantea* represent widely seen common taxa reported in  
 260 different plants from tropical environments (Carvalho et al., 2012; Rosa et al., 2012; Vieira et al., 2014;  
 261 Ferreira et al., 2015).

262 Additionally, several endophytes of *V. gigantea* displayed low molecular taxonomic identities with  
 263 sequences of fungi deposited in GenBank, and were identified on the genera, family, class, or order levels  
 264 and may represent new species. As an example, the endophytic yeast *Yamadazyma riverae* UFMGCB  
 265 Vg11F10 recovered from the leaves of *V. gigantea* was recently described as a new species (Lopes et al.,  
 266 2015). However, more detailed taxonomic (polyphasic taxonomy) studies will be necessary to describe  
 267 these endophytic taxa.

268 We detected several minority taxa (singlets) within the fungal community, including those of the  
 269 genera *Clonostachys*, *Coccomyces*, *Crucellisporiopsis*, *Daldinia*, *Myxotrichum*, *Pallidocercospora*,  
 270 *Pezicula*, *Peyronellaea*, and *Pseudocercospora*, which seem to be rare or unreported as endophytic  
 271 species. *Clonostachys rosea*, described as *Gliocladium roseum*, is the anamorph stage of *Bionectria*  
 272 *ochroleuca* (Bionectriaceae) (Schroers et al., 1999), which is a common soil saprobic fungus that occurs  
 273 in different habitats (Sutton et al., 1997). Vega et al. (2008) reported the endophytic *Clonostachys rosea*,



274 recovered from coffee leaves in Colombia, as an entomopathogenic species with pathogenic activity  
275 against the Coleoptera *Hypothenemus hampei*, the most devastating pest of coffee worldwide.  
276 Additionally, *Clonostachys rosea* was described as an endophyte of cucumber (Chatterton et al., 2008)  
277 and able to induce expression of defence genes in wheat and canola (Roberti et al., 2008; Lahlali and  
278 Peng, 2013). This same fungal species was found to be a mycoparasite that produces chitinase and  
279 glucanase enzymes and peptides against known phytopathogenic fungi (Xue, 2003; Pisi et al., 2006;  
280 Roberti et al., 2008; Rodríguez et al., 2011). The genus *Coccoomyces* (Rhytismataceae) comprises about  
281 116 species of ligninolytic fungi (Kirk et al., 2008). Hirose et al. (2013) recovered *Coccoomyces sinensis*  
282 as a decomposer endophyte of *Camellia japonica*. The genus *Crucellisporiopsis* includes only 3  
283 recognised species (Nag Raj, 1993). *Crucellisporiopsis marquesiae* was recently described as a new  
284 species that occurs on the twigs of *Marquesia acuminata* (Dipterocarpaceae) in Zambia, Africa (Crous et  
285 al., 2014). *Daldinia* (Xylariaceae) comprises about 20 species of wood-inhabiting fungi (Ju et al., 1997),  
286 including taxa reported as endophytes (Whalley, 1996). We recovered *Daldinia loculata* as an endophyte  
287 of *V. gigantea*, and since the plant is an endemic species adapted to arid conditions, it suggests that  
288 *Daldinia* species are adapted ecologically and physiologically to xerophytic conditions (Ingold, 1965).  
289 Additionally, *Daldinia loculata* is able to colonise burned substrates (Ju et al., 1997). *Myxotrichum* sp.  
290 was recovered from the root tissue of *V. gigantea*. The genus *Myxotrichum* (Myxotrichaceae) includes  
291 many cellulolytic and mycorrhizal species associated with members of the Ericaceae and Epacridaceae  
292 (Cannon and Kirk, 2007). The cosmopolitan genus *Pseudocercospora* (teleomorph *Mycosphaerella*) is a  
293 recognised plant pathogen fungal group which is commonly associated with leaves and fruits of different  
294 host plants of arid, cool temperate, sub-tropical, and tropical regions (Crous et al., 2013). In addition,  
295 *Pseudocercospora* includes endophytic and saprobic species, and is used as a biological control agent of  
296 weeds (Den Breeÿen et al., 2006). *Pezicula* (Dermateaceae) includes species growing endophytically,  
297 such as *Pezicula sporulosa*, which is associated with shrubs and trees, whereas other species are parasitic  
298 (Abeln et al., 2000).

299 Endophytes have been reported to be able to increase the fitness of their host plants, conferring abiotic  
300 and biotic stress tolerance through the production of metabolites, such as hormones, pigments, natural  
301 products, and polysaccharides, which are beneficial to the plant's survival in extreme environments. In  
302 this study, the endophytic fungal community of *V. gigantea* was found to be rich, diverse, and complex,  
303 and included taxa that are mutualistic, saprobic, and parasitic, as well as those with the ability to control

304 phytopathogens (mycoparasitic) and insects (entomopathogenic), those that are xerophytic (fire-adapted),  
305 and those with endophyte-mycorrhizal fungi interactions. According to Alves (1994), the populations of  
306 *V. gigantea* are restricted to the rupestrian grasslands, which may be hundreds of years old, showing a  
307 high adaptation for survival in the Brazilian Rocky Fields. We suggest that their natural endophytic  
308 fungal microbiota might contribute directly to the plant's fitness and, consequently, its millennial age.  
309 However, our study only allows speculation on the natural interaction between the endophytic fungi and  
310 their host, and further studies will be necessary to elucidate the details of their symbiosis.

311 An interesting result was the detection of bioactivity in the extracts obtained from the rare (singlets)  
312 taxa (*T. effusum*, *P. herquei*, *P. adametzi*, *P. quebecense*, and *D. miriciae*). Despite representing a great  
313 proportion of the fungal communities, these rare species have usually been ignored as an important  
314 portion of the world fungal diversity that can produce bioactive molecules.

315

#### 316 4.2. Biological activity

317 *Diaporthe* was the most abundant genus of endophytes recovered in association with *V. gigantea*.  
318 Additionally, the extract of *D. miriciae* UFMGCB 9720 showed antifungal, antibacterial, and antimalarial  
319 activities. The genera *Diaporthe* and *Phomopsis* form an anamorph/teleomorph complex, which has been  
320 characterised as a known producer of different bioactive compounds (Agusta et al., 2006; Yu et al., 2008;  
321 Carvalho et al., 2012; Silva-Hughes et al., 2015). According to Thompson et al. (2015), *Diaporthe* species  
322 are known to be saprobic and pathogenic fungi, but have also been reported as endophytes in a wide range  
323 of host plants. *D. miriciae* is a recently described new species by Thompson et al. (2015); it was obtained  
324 from the plant species *Glycine max*, *Helianthus annuus*, and *Vigna radiata* in Australia. According to  
325 Thompson et al. (2015), *D. miriciae* forms clusters of *Diaporthe sojae*, a pathogen of *Glycine* species,  
326 suggesting that it may also be a pathogen.

327 The Eendophyte *D. miriciae* UFMGCB 9720 produced epoxychochalsin H, which displayed high  
328 antimalarial activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. The cytochalasins are  
329 structurally complex secondary metabolites, with more than 80 molecules described, and have been  
330 isolated from fungi of the genera *Aspergillus*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Penicillium*, *Zygosporium*,  
331 *Chaetomium*, *Phoma*, *Xylaria*, *Hypoxylon*, and *Rhinoctadiella* (Dagne et al., 1994; Wagennar et al., 2000;  
332 Zhang et al., 2012; Zhang et al., 2014). Cytochalasins are a class of metabolites produced by fungi with  
333 antimicrobial, antitumor, anti-HIV, and herbicidal activities (Cimmino et al., 2008; Lin et al., 2009; Xu et

334 al., 2009). Epoxycytochalasin H was reported to be produced by the soybean pathogen *Phomopsis sojae*  
335 (Cole et al., 1982), and by a *Phoma* sp. obtained from a soil sample (Kakeya et al., 1997). To the best of  
336 our knowledge, the unique activity of epoxycytochalasin H is its ability to function as a cell-cycle  
337 inhibitor in mammals (Kakeya et al., 1997).

338

## 339 **5. Conclusions**

340 In conclusion, our study reports and describes the complex endophytic community associated with the  
341 leaves and roots of the ancient, unique, endangered, and narrowly endemic neotropical plant *V. gigantea*  
342 present in the rupestrian grasslands of Brazil. According to Silveira et al. (2016), the rupestrian grasslands  
343 may be the most ancient open vegetation in eastern South America, representing a hotspot biome with  
344 more than 5,000 plant species, which is nearly 15% of the plant diversity in Brazil but in an area  
345 corresponding to 0.78% of its surface. Among the unique plants inhabiting the rupestrian grasslands, the  
346 ancient species *V. gigantea* is reported to live specifically in this biome. Our results indicate that *V.*  
347 *gigantea* shelters in its tissues a highly diverse and cryptic mycobiota, including several rare fungal  
348 species which were previously unreported as endophytes but that are reported to have different ecological  
349 functions (saprobic, parasitic, mutualistic) and able to produce bioactive compounds. According to  
350 Compant et al. (2016), the interaction with endophytes may be beneficial to the plant's fitness, because  
351 recent studies of plant–soil–microbe interactions revealed the potential of some endophytic fungi to be  
352 used as fertilisers, being able to produce pesticidal compounds against plant pathogens. Our results  
353 suggest that endophytic fungal communities might be an important biological component contributing to  
354 the fitness of the plants living in the rupestrian grassland, and that those plants may represent a  
355 microhabitat repository hotspot of microbial biodiversity. Additionally, we call attention to rare taxa  
356 present cryptically in the endophytic fungal communities of *V. gigantea*, which can be masked by the  
357 presence of the few dominant species but represent an important portion of unreported fungal diversity  
358 and potential producers of bioactive compounds.

359

## 360 **Acknowledge**

361 We acknowledge the financial support from FAPEMIG (0050-13), CAPES (23038.003478/2013-92),  
362 FINEP (2084/07), NIH, NIAID, Division of AIDS, Grant N°. AI 27094 and the USDA Agricultural  
363 Research Service Specific Cooperative Agreement No. 58-6408-1-603. There is no conflict of interest

364 among the authors. The authors thank Solomon Green III, Ms. J.L. Robertson, Mrs. R. Pace and Mrs.  
365 Amber Reichley for technical assistance.

366

367 **References**

- 368 Abeln, E. C., de Pagter, M. A., Verkley, G. J., 2000. Phylogeny of *Pezicula*, *Dermea* and *Neofabraea*  
369 inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. *Mycologia*. 92, 685-693. doi:  
370 10.2307/3761426
- 371 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997.  
372 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids*  
373 *Research*. 25, 3389-3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389b
- 374 Agusta, A., Ohashi, K., Shibuya, H., 2006. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic  
375 fungus *Diaporthe* sp. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 579-582. doi: 10.1248/cpb.54.579
- 376 Alves, R.J.V., 1994. Morphological age determination and longevity in some *Vellozia* populations in  
377 Brazil. *Folia Geobotanica Phytotaxa Praha*, 29, 55-59. doi. 10.1007/BF02807775
- 378 Barros, F., Lourenço, R.A., 2004. Synopsis of the Brazilian orchid genus *Grobya*, with the description of  
379 two new species. *Bot J Linn Soc* 145:119–127. doi: 10.1111/j.1095-8339.2003.00277.x
- 380 Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1990. Rapid chemosensitivity assay with human normal  
381 and tumor cells in vitro. *In vitro cellular & developmental biology*. 26, 1030-1034. doi  
382 10.1007/BF02624436
- 383 Cannon, P., Kirk, P., 2007. *Fungal Families of the World*. CABI, United Kingdom.
- 384 Cantrell, C.L., Case, B.P., Mena, E.E., Kniffin, T.M., Duke, S.O., Wedge, D., 2008. Isolation and  
385 identification of antifungal fatty acids from the basidiomycete *Gomphus floccosus*. *J. Agric. Food Chem.*  
386 56, 5062-5068. doi: 10.1021/jf8008662
- 387 Carvalho, C.R., Gonçalves, V.N., Pereira, C.B., Johann, S., Galliza, I.V., Alves, T.M.A. Rabello, A.,  
388 Sobral, M.E.G., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2012. The diversity, antimicrobial and anticancer  
389 activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)  
390 Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*. 57, 95-107. doi 10.1007/s13199-012-0182-2
- 391 Chatterton, S., Jayaraman, J. & Punja, Z.K., 2008. Colonization of cucumber plants by the biocontrol  
392 fungus *Clonostachys rosea* f. *catenulata*. *Biological Control*. 46, 267–278.  
393 doi:10.1016/j.biocontrol.2008.02.007

394 Cimmino, A., Andolfi, A., Berestetskiy, A., Evidente, A.. 2008. Production of phytotoxins by *Phoma*  
395 *exigua* var. *exigua*, A potential mycoherbicide against perennial thistles. J. Agric. Food Chem. 56,  
396 6304–6309. doi: 10.1021/jf8004178

397 Cole, R. J., Wilson, D. M., Harper, J. L., Cox, R. H., Cochran, T. W., Cutler, H. G., Bell, D. K., 1982.  
398 Isolation and identification of two new [11] cytochalasins from *Phomopsis sojae*. Journal of Agricultural  
399 and Food Chemistry. 30, 301-304. doi: 10.1021/jf00110a021

400 Collado, J., Platas, G., Pelaez, F., 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from  
401 Central Spain. Nova Hedwig. 63, 347-360.

402 Compant, S., Saikkonen, K., Mitter, B., Campisano, A., Mercado-Blanco, J., 2016, Editorial special issue:  
403 soil, plants and endophytes. Plant Soil 405:1–11. doi: 10.1007/s11104-016-2927-9

404 Crous, P.W., Braun, U., Hunter, G.C., Wingfield, M.J., Verkley, G.J.M., Shin, H.D., Nakashima, C.,  
405 Groenewald, J.Z., 2013. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. Stud Mycol. 75, 37–114.  
406 doi:10.3114/sim0005

407 Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Shivas, R.G., Edwards, J., Seifert, K.A., Alfenas, A.C., Alfenas, R.F.,  
408 Burgess, T.I., Carnegie, A.J., Hardy, G.E.St.J., Hiscock, N., Hüberli, D., Jung, T., Louis-Seize, G.,  
409 Okada, G., Pereira, O.L., Stukely, M.J.C., Wang, W., White, G.P., Young, A.J., McTaggart, A.R., Pascoe,  
410 I.G., Porter, I.J., Quaedvlieg, W., 2014. Fungal Planet description sheets: 281– 319. Persoonia 33, 212–  
411 289. doi: 10.3767/003158514X685680

412 Dagne, E., Gunatilaka, A. A. L., Asmellash, S., Abate, D., Kingston, D. G. I., Hofmann, G. A., Johnson,  
413 R. K., 1994. Two new cytotoxic cytochalasins from *Xylaria obovata*. Tetrahedron. 50, 5615–5620.

414 Den Breeÿen, A., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Crous, P.W., 2006. Morphological and molecular  
415 characterisation of *Mycosphaerellaceae* associated with the invasive weed, *Chromolaena odorata*. Fungal  
416 Diversity 23: 89–110. doi:10.1016/S0040-4020(01)85632-5

417 Ferreira, M.C., Vieira, M.L.A., Zani, C.L., Alves, T.M.A., Sales, P.A., Silvane, M.F. , Romanha, A.J., Gil,  
418 L.H.V.G., Carvalho, A.G.O., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2015. Molecular phylogeny,  
419 diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the  
420 medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*). Biochemical Systematics and Ecology.  
421 59, 36-44. doi:10.1016/j.bse.2014.12.017

422 Franzblau, S.G., Witzig, R. S., McLaughlin, J. C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M. T.,  
423 Cook, M. B., Quenzer, V.K., Ferguson, R. M., Gilman, R. H., 1998. Rapid, low-technology MIC

424 determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay.  
425 J. Clin. Microbiol. 36, 362-366.

426 Giulietti, A.M., Pirani, J.R., 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the  
427 Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini PE, Heyer WR (eds) Proceedings of a  
428 workshop on Neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 60, 39–  
429 69.

430 Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify  
431 conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol. 61, 1323-1330.

432 Godinho, V.M., Furbino, L.E., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Yokoya, N.S., Pupo, D., Alves, T.M.A.,  
433 Junior, P.A.S., Romanha, A.J., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H., 2013. Diversity and  
434 bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in  
435 Antarctica. ISME. 7, 1434-1451. doi:10.1038/ismej.2013.77

436 Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for  
437 Education and Data Analysis. Paleontologia Electronica. 4, 1-9.

438 Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirtillä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M.,  
439 Sessitsch, A., 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for  
440 defining functioning of microbial endophytes. Microbiol Mol Biol Rev 79:293–320.  
441 doi:10.1128/MMBR.00050-14

442 Hirose, D., Matsuoka, S., Osono, T., 2013. Assessment of the fungal diversity and succession of  
443 ligninolytic endophytes in *Camellia japonica* leaves using clone library analysis. Mycologia. 105, 837–  
444 843. doi: 10.3852/12-385

445 Houbraeken, J., Frisvad, J.C., Seifert, K.A., Overy, D.P., Tuthill, D.M., Valdez, J.G., Samson, R.A., 2012.  
446 New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. Persoonia. 29, 78-  
447 100. doi: 10.3767/003158512X660571

448 Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., Sun, M., 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated  
449 with 29 traditional Chinese medicinal plants. Fungal Div. 33, 61–75.

450 Ingold, C.T., 1965. Spore liberation. Clarendon Press, Oxford.

451 Izawa, Y., Hirose, T., Shimizu, T., Koyama, K., Natori, S., 1989. Six new 10-5 pheynl-[11] cytochalasans,  
452 cytochalasins N-S from *Phomopsis* sp. Tetrahedron. 45, 2323-2335. Joly, A,B, 1970. Conheça a vegetação  
453 brasileira. EDUSP, São Paulo. doi:10.1016/S0040-4020(01)83434-7

454 Ju, Y-M., Rogers, J.D., San Martin, F., 1997. A revision of the genus *Daldinia*. Mycotaxon. 61, 1243-  
455 293.

456 Kakeya, H., Morishita, M., Onozawa, C., Usami, R., Horikoshi, K., Kimura, K., M Y, Osada, H., 1997.  
457 RKS-1778, a New Mammalian Cell-Cycle Inhibitor and a Key Intermediate of the Cytochalasin Group. J,  
458 Nat. Prod. 60, 669-672. doi: 10.1021/np970151o

459 Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. Dictionary of the Fungi, 10th ed. CAB  
460 International: Wallingford, U.K.

461 Lahlali, R., Peng, G., 2013. Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced  
462 host resistance. Plant Pathology, 63,447–455. doi: 10.1111/ppa.12112

463 Lin, Z., Zhang, G., Zhu, T., Liu, R., Wei, H., Gu, Q., 2009. Bioactive cytochalasins from *Aspergillus*  
464 *flavipes*, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. Helv. Chim. Acta.  
465 92, 1538–1544. doi: 10.1002/hlca.200800455

466 Lopes, M.R., Ferreira, M.C., Carvalho, T.F.C., Pagnocca, F.C., Chagas, R.A., Morais, P.B., Rosa, L.H.,  
467 Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2015. Yamadazyma riverae sp. nov., a yeast species isolated from plant  
468 materials. Int J Syst Evol Microbiol. 65, 4469-447. doi: 10.1099/ijsem.0.000597

469 Lousada, J.M., Borba, E.L., Ribeiro, K.T., Ribeiro, L.C., Lovato, M.B., 2011. Genetic structure and  
470 variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape  
471 in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. Genetica. 139, 431–440.  
472 doi 10.1007/s10709-011-9561-5

473 Makler, M. T., Hinrichs, D. J., 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium*  
474 *falciparum* as an assessment of parasitemia. The American journal of tropical medicine and hygiene. 48,  
475 205-210.

476 Mello-Silva, R., Menezes, N.L., 1999. Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia*  
477 *gigantea*, and a key to related dracenoid species of Vellozia. Novon. 9, 536-541. doi: 10.2307/3392159

478 Nag Raj, T.R., 1993. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue  
479 Publications, Waterloo, Ontario.

480 NCCLS, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard  
481 M27-A2., 2002. National Committee on Clinical Laboratory Standards 22: 15.

482 NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved  
483 standard, Seventh Edition M7-A7., 2006. National Committee on Clinical Laboratory Standards 26: 2.

484 NCCLS, Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; Tentative  
485 Standard; approved standard, M24-A., 2003. National Committee on Clinical Laboratory Standards 23: 18.  
486 NCCLS, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi;  
487 approved standard, M38-A., 2002. National Committee on Clinical Laboratory Standards 22:16.  
488 Pisi, A., Cesari, A., Zakrisson, E., 2006. SEM investigation about hyphal relationships between some  
489 antagonistic fungi against *Fusarium* spp. foot rot pathogen of wheat. *Phytopathologia Mediterranea*, 40,  
490 37–44.  
491 Roberti, R., Veronesi, A.R., Cesari, A., Cascone, A., Di Berardina, I., Bertini, L. & Caruso, C., 2008.  
492 Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants  
493 infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science*, 175, 339–347. doi:10.1016/j.plantsci.2008.05.003  
494 Rodríguez, M. A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N., Godeas, A., 2011. *Clonostachys rosea*  
495 BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol  
496 agent. *Journal of Applied Microbiology*. 110, 1177–1186. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x  
497 Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E. and Redman, R. S., 2009. Fungal endophytes: diversity and  
498 functional roles. *New Phytol.* 182, 314–330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x  
499 Rosa, L.H., Gonçalves, V.N., Caligiorne, R.B., Alves, T.M.A., Rabello, A., Sales, P.A., Romanha, A.J.,  
500 Sobral, M.E.G., Rosa, C.A., Zani, C.L., 2010. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of  
501 endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Braz J Microbiol.* 41, 114–122.  
502 doi.org/10.1590/S1517-83822010000200024  
503 Rosa, L.H., Queiroz, S.C.N., Moraes, R.M., Wang, X., Techen, N., Pan, Z., Cantrell, C.L., Wedge, D.E.,  
504 2013. *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with  
505 autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smilax sonchifolius* (Asteraceae). *Symbiosis*. 60,  
506 133-142. doi 10.1007/s13199-013-0249-8  
507 Rosa, L. H., Tabanca, N., Techen, N., Pan, Z., Wedge, D. E., Moraes, R. M., 2012. Antifungal activity of  
508 extracts from endophytic fungi associated with *Smilax* maintained in vitro as autotrophic cultures  
509 and as pot plants in the greenhouse. *Canadian journal of microbiology*. 58, 1202-1211. doi:  
510 10.1139/w2012-088  
511 Rosa, L.H., Vaz, A.B.M., Caligiorne, R.B., Campolina, S., Rosa, C.A., 2009. Endophytic fungi associated  
512 with the Antarctic Grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). *Polar Biology*. 32, 161-167.  
513 doi:10.1007/s00300-008-0515-z



514 Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Cota, B.B., Johann, S., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Rosa, C.A., 2011.  
515 Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment  
516 of neglected diseases. In: Ekinici, D. (Eds.), Drug Development - a Case Study Based Insight into Modern  
517 Strategies. Intech, Croatia, 1-18.

518 Schroers, H.-J., Samuels, G., Seifert, K., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium*  
519 *roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other  
520 *Gliocladium*-like fungi. Mycologia. 91, 365–385. doi: 10.2307/3761383

521 Schulz, B., Boyle, C., 2005. The endophytic continuum. Mycol. Res. 109, 661–686.  
522 doi.org/10.1017/S095375620500273X

523 Silva-Hughes, A.F., Wedge, D.E., Cantrell, C.L., Carvalho, C.R., Pan, Z., Moraes, R.M., Madoxx, V.L.,  
524 Rosa, L.H., 2015. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native  
525 medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United State. Microbiological research. 175, 67-  
526 77. doi:10.1016/j.micres.2015.03.007

527 Silveira, F.A.O., Negreiros, D., Barbosa, N.P.U., Buisson, E., Carmo, F.F., Carstensen, D.W., Conceição,  
528 A.A., Cornelissen, T.G., Echternacht, L., Fernandes, G.W., Garcia, Q.S., Guerra, T.J., Jacobi, C. M.,  
529 Lemos-Filho, J.P., Stradic, S.L., Morellato, L.P.C., Neves, F.S., Oliveira, R.S., Schaefer, C.E., Viana,  
530 P.L., Lambers, H., 2015. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a  
531 neglected conservation priority. Plant and Soil. 1-24. doi 10.1007/s11104-015-2637-8

532 Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J., 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms.  
533 Journal of Natural Products. 67, 257-268. doi: 10.1021/np030397v

534 Sutton, J., Li, D.-W., Peng, G., Yu, H., Zhang, P., 1997. *Gliocladium roseuma* versatile adversary of  
535 *Botrytis cinerea* in crops. Plant Disease. 81, 316–328. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.4.316

536 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary  
537 genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 30, 2725-2729.

538 Thompson, S.M., Tan, Y.P., Shivas, R.G., Neate, S.M., Morin, L., Bissett, A., Aitken, E.A.B., 2015.  
539 Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia.  
540 Persoonia. 35, 39-49. doi: 10.3767/003158515X687506

541 UNESCO (2005) MAB Biosphere reserves directory.  
542 <http://www.brasilia.unesco.org/noticias/releases/2005/biosferaespinhaco> (accessed 29.09.14).

543 Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S. A., 2008.  
544 Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*. 46, 72-82.  
545 doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.008

546 Vieira, M. L., Johann, S., Hughes, F. M., Rosa, C. A., Rosa, L. H., 2014. The diversity and antimicrobial  
547 activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the  
548 Brazilian savannah. *Canadian journal of microbiology*. 60(12), 847-856. doi: 10.1139/cjm-2014-0449

549 Wagenaar, M. M., Corwin, J., Strobel, G., Clardy, J., 2000. Three new cytochalasins produced by an  
550 endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. *J. Nat. Prod.* 63, 1692–1695. doi: 10.1021/np0002942

551 Whalley, A.J.S., 1996. The Xylariaceous way of life. *Mycological Research*. 100, 897- 922.  
552 doi:10.1016/S0953-7562(96)80042-6

553 White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA  
554 genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (Eds). San Diego, CA,  
555 USA: Academic Press. 18, 315–322.

556 Xu, S., Ge, H.M., Song, Y.C., Shen, Y., Ding, H., Tan, R.X., 2009. Cytotoxic cytochalasin metabolites of  
557 endophytic *Endothia gyrosa*. *Chem. Biodivers.* 6, 739–745. Xue, A.G., 2003. Biological control of  
558 pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941.  
559 *Phytopathology*. 93, 329–335. doi: 10.1002/cbdv.200800034

560 Zhang, Q., Li, H. Q., Zong, S. C., Gao, J. M., Zhang, A. L., 2012. Chemical and bioactive diversities of  
561 the genus *Chaetomium* secondary metabolites. *Mini-Rev. Med. Chem.* 12, 127–148.  
562 doi:https://doi.org/10.2174/138955712798995066

563 Zhang, G.H., Du, Z.Z., Zheng, Y.T., Xu, J.C., Luo, X.D., 2008. Phomoeuphorbins A and D, azaphilones  
564 from the fungus *Phomopsis euphorbiae*. *Phytochemistry* 69:2523-2526.

565 Zhang, Q., Xiao, J., Sun, Q.Q., Qin, J.C., Pescitelli, G., Gao, J.M., 2014. Characterization of  
566 cytochalasins from the endophytic *Xylaria* sp. and their biological functions. *J Agric Food Chem.*  
567 62,10962-10969. doi: 10.1021/jf503846z

1 **New pesticidal diterpenoids from *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an endemic neotropical plant**  
2 **living in the endangered Brazilian biome Rupestrian grasslands**

3 **Running Head: New pesticidal diterpenes from *Vellozia gigantea***

4 **Mariana C. Ferreira<sup>1</sup>, Charles L. Cantrell<sup>2\*</sup>, Stephen O. Duke<sup>2</sup>, Abbas Ali<sup>3</sup> and Luiz H. Rosa<sup>1</sup>**

5 <sup>1</sup>Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

6 <sup>2</sup>United States Department of Agriculture, USDA-ARS, Natural Products Utilization Research Unit,  
7 Mississippi, USA

8 <sup>3</sup>National Center for Natural Products Research, The University of Mississippi, University, MS 38677,  
9 USA

10 \* Correspondence: [clcantr1@olemiss.edu](mailto:clcantr1@olemiss.edu) ; +1-662-915-5898

11 Academic Editor: Derek J. McPhee

12 Received: date; Accepted: date; Published: date

13 **Abstract:** *Vellozia gigantea* is a rare, ancient and endemic neotropical plant present in the Brazilian  
14 Rupestrian grasslands. The dichloromethane extract of *V. gigantea* adventitious roots was phytotoxic  
15 against *Lactuca sativa*, *Agrostis stolonifera* and *Lemna paucicostata*, and showed larvicidal activity  
16 against *Aedes aegypti*. Phytotoxicity bioassay-directed fractionation of the extract revealed one new  
17 isopimaradiene, 8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone, and three new cleistanthane diterpenoids, 7-  
18 oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol, 3,20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol, and 20-nor-3,7-dioxo-  
19 1,8,11,13-cleistanthatetraen-10-ol. These new structures are proposed based on interpretation of <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C,  
20 COSY, NOESY, HSQC, and HMBC NMR data. 8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone was especially  
21 phytotoxic with an IC<sub>50</sub> value (30 μM) comparable to those of commercial herbicides clomazone,  
22 EPTC and naptalam. In addition, 7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol provided 100% mortality at a  
23 concentration of 125 ppm against 1-day-old *Ae. aegypti* larvae. Our results show that ancient and unique  
24 plants, like the endangered narrowly endemic neotropical species *V. gigantea* present in the Rupestrian  
25 grasslands, should also be protected because they can be sources of new bioactive compounds.

26 **Keywords:** diterpene; herbicide; natural products; Velloziaceae

27

---

28 **1. Introduction**

29 Brazil has a rich biodiversity of plant species, which includes rare and endemic taxa. Among the  
30 typical biomes from Brazil, the Espinhaço mountain range has the Rupestrian grasslands (“campo  
31 rupestre”) that shelter different plant species with a high richness of endemism [1-3]. The Espinhaço  
32 mountain range is located in eastern Brazil (in the states of Minas Gerais and Bahia), extending  
33 approximately 1.000 km in a north-south direction and it is part of the Biosphere Reserve [4]. The  
34 diversification of plant lineages present in the Rupestrian grasslands occurred before the diversification of  
35 lowland Brazilian savanna (“cerrado”), suggesting it may be the most ancient open vegetation in eastern

36 South America [5]. In addition, Brazilian Rupestrian grasslands comprise more than 5,000 plant species  
37 (about 15% of Brazilian plant diversity), in an area corresponding to 0.78% of its national territory.

38 Among the endemic plants of the Espinhaço mountain range, the members of the family Velloziaceae  
39 occur with high frequency. About 240 predominantly neotropical species of Velloziaceae occur in the  
40 eastern mountains of Brazil, especially in the Rupestrian grasslands [1, 6]. *Vellozia gigantea* N. L. Menezes  
41 & Mello-Silva, known as “cana de ema”, is a rupicolous monocot species that is at least 6 m tall and  
42 endemic to the Rupestrian grasslands in Brazil, specifically present in the Serra do Cipó National Park in  
43 Minas Gerais state [6]. There are only nine known populations in the region, and they are considered  
44 endangered because of disturbance and habitat loss from anthropogenic causes [7].

45 There is a great need for discovery of natural product-based biopesticides [8]. In the present study, we  
46 focus on the chemical fractionation of the adventitious root extract of *V. gigantea* to isolate the pure  
47 compounds with herbicidal and larvicidal activity.

## 48 **2. Materials And Methods**

### 49 *2.1. Study area*

50 Fragments of adventitious roots of 18 specimens of *V. gigantea*, without damage to the natural plant  
51 populations, were collected in May of 2013, at Serra do Cipó National Park (19°14'874”S; 043°30'574”W),  
52 a protected area in Minas Gerais state, Brazil. Identification of *V. gigantea* was done by comparisons with  
53 the voucher specimen deposited at the herbarium of Institute of Biological Science (BHCB) of the Federal  
54 University of Minas Gerais, Brazil (<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>) under the code  
55 BHCB 102620. Access to the plants used was according to the Brazilian biological diversity rules.

### 56 *2.2. Adventitious roots extract production*

57 Fresh adventitious roots of *V. gigantea* of 18 individual plants (approximately 10g / individual) were  
58 dried by lyophilization for 3 days to remove residual water. The lyophilized adventitious root material was  
59 extracted in a beaker with 2 L of dichloromethane (DCM, Fisher, USA) for 5 days. The DCM was removed  
60 in a rotary evaporator (IKA®RV 10) under partial vacuum at temperatures below 35 °C. The residual solvent  
61 was eliminated overnight in a vacuum centrifugal concentrator (Thermo Savant) at 35 °C. This process  
62 yielded 4 g of crude extract, which was stored at -20 °C until the chemical fractionation guided by  
63 phytotoxicity assays could be completed.

### 64 *2.3. Adventitious roots extract fractionation*

65 The adventitious root crude extract fractionation was performed by column chromatography, using  
66 the Biotage system, Inc. Isolera™ pump (Charlotte, North Carolina) equipped with an Isolera™ flash  
67 collector and variable wavelength detector. Initially, 1.108 g of root crude extract was adsorbed to silica  
68 gel and applied to a silica gel chromatography column (40-63 µm, 40 × 150 mm, 60 Å), running at 40  
69 ml/min using a hexane/Isopropanol with gradient of 100% hexane - 0% IPA to 90% hexane – 10% IPA  
70 over 2400 mL, then 90% hexane – 10% IPA to 70% hexane – 30% IPA over 1200 mL, then 70% hexane  
71 – 30% IPA to 0% hexane – 100% IPA over 102 mL and finishing with a 100% IPA for wash over 792 mL.  
72 Portions of 27 mL fractions were collected and recombined based on TLC similarities into nine fractions

73 [A (7.7 mg), B (10.9 mg), C (576.8 mg), D (150.9 mg), E (61.1mg), F (23.7 mg), G (22.2 mg), H (153.6  
74 mg), and I (110.1 mg)].

75

#### 76 2.4.NMR spectroscopy

77 The root crude extract, fractions, and pure compounds were analyzed by NMR spectroscopy on a  
78 Varian INOVA 500 MHz spectrometer (Palo Alto, CA, USA). NMR spectra recorded in CDCl<sub>3</sub>.

79

#### 80 2.5.HPLC Analysis

81 Fractions D and G, which are phytotoxic, were purified by HPLC. An Agilent 1200 system equipped  
82 with a quaternary pump, autosampler, diode-array detector, and vacuum degasser was used with a Zorbax  
83 RX-SIL (Agilent) 5 μm 9.4 x 250 nm HPLC column. A total of 150.9 mg of fraction D was dissolved in  
84 methanol and purified. The manual injection for each sample was 20 μl. The method was isocratic 99%  
85 hexane: 1% IPA for 10 min ramp to gradient 97% hexane: 3% IPA over 40 min. After running two samples,  
86 the column was washed with hexane:IPA for 5 min and re-equilibrated. Analytes were detected at 254 and  
87 280 nm by diode array detector. Five major peaks were detected and collected [A' (8 mg), B' (6.1 mg), C'  
88 (8.2 mg), D' (6.3 mg), E' (15.5 mg)]. However, only the A' (**1**), C' (**2**) and E' (**3**) peaks were characterized  
89 and identified.

90 A total of 22 mg of fraction G was dissolved in methanol and purified by normal phase HPLC System.  
91 The manual injection for each sample was 20 μL. The method was 80% hexane:20% EtOAc to 62%  
92 hexane:38% EtOAc over 30 minutes. For each running the column was re-equilibrated. Analytes was  
93 detected at 254 and 280 nm by diode array detector. Two major peaks were detected and collected [A'' (8.8  
94 mg), B'' (4.9 mg)]. However, only the A'' peak (**4**) was characterized and identified.

#### 95 8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone (**1**)

96 High-resolution ESI-MS:  $m/z$  327.1597 [M - H]<sup>-</sup>; calculated for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>, 327.1596. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +33.5 (c  
97 0.275, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 5.79 (1H, dd, J=17.5, 10.7 Hz, H-15), 5.04 (2H, dd, J=14.1,  
98 3.2 Hz, H-16), 3.70 (1H, d, J=19.9 Hz, H-2), 3.39 (1H, d, J=19.9 Hz, H-2), 2.76 (1H, d, J=15.7 Hz, H-12),  
99 2.67 (1H, d, J=18.5 Hz, H-14), 2.61 – 2.54 (2H, m, H-6), 2.40 (1H, d, J=18.5 Hz, H-14), 2.33 (1H, d,  
100 J=15.8 Hz, H-12), 2.15 (1H, dd, J=13.3, 5.0 Hz, H-5), 1.61 (3H, s, H-20), 1.26 (3H, s, H-19), 1.12 (3H, s,  
101 H-18), 1.07 (3H, s, H-17). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 208.98 (C-3), 202.51 (C-1), 199.69 (C-11),  
102 198.87 (C-7), 147.11 (C-9), 144.18 (C-15), 143.28 (C-8), 113.06 (C-16), 53.46 (C-10), 50.60 (C-2), 49.68  
103 (C-12), 47.00 (C-4), 45.33 (C-5), 38.08 (C-13), 34.75 (C-14), 34.55 (C-6), 28.52 (C-18), 25.79 (C-17),  
104 21.55 (C-19), 15.59 (C-20).

#### 105 7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol (**2**)

106 High-resolution ESI-MS:  $m/z$  301.2173 [M + H]<sup>+</sup>; calculated for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>, 301.2168. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +9.7 (c  
107 0.33, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.24 (1H, d, J=8.0 Hz, H-12), 7.05 (1H, d, J=8.0 Hz, H-11),  
108 3.31 (1H, dd, J=10.8, 4.5 Hz, H-3), 3.00 – 2.89 (1H, m, H15a), 2.87 – 2.79 (1H, m, H-15b), 2.72 – 2.66

109 (2H, m, H-6), 2.31 (3H, s, H-17), 2.26 (1H, dt, J=12.7, 3.0 Hz, H-1a), 1.88 (1H, m, H-2), 1.83 (1H, m, H-  
110 5), 1.75 (1H, m, H-1b), 1.19 (3H, t, J=7.4 Hz, H-16), 1.14 (3H, s, H-20), 1.04 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s,  
111 H-19). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 201.83 (C-7), 153.89 (C-9), 144.38 (C-14), 135.60 (C-13), 134.83  
112 (C-12), 131.00 (C-8), 120.68 (C-11), 78.44 (C-3), 47.32 (C-5), 39.04 (C-4), 38.11 (C-6), 37.98 (C-10),  
113 36.77 (C-1), 27.74 (C-2), 27.39 (C-18), 23.71 (C-15), 23.36 (C-20), 19.29 (C-17), 14.91 (C-19), 14.64 (C-  
114 16).

115 3,20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol (**3**)

116 High-resolution ESI-MS:  $m/z$  337.1797 [M + Na]<sup>+</sup>; calculated for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>Na, 337.1779. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 28.9  
117 (c 0.56, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.25 (1H, d, J=7.9 Hz, H-12), 7.09 (1H, d, J=8.2 Hz, H-  
118 11), 4.21 (1H, dd, J=9.5, 2.9 Hz, H-20a), 3.99 (1H, d, J=9.4 Hz, H-20b), 3.02 – 2.82 (2H, m, H-15), 2.78  
119 (1H, dd, J=15.0, 13.2 Hz, H-6a), 2.51 (1H, dd, J=13.1, 3.5 Hz, H-6b), 2.49 – 2.42 (1H, m, H-1a), 2.30  
120 (3H, s, H-17), 2.25 (1H, ddd, J=13.4, 11.7, 5.5 Hz, H-2), 2.20 – 2.11 (1H, m, H-5), 1.94 (1H, ddd, J=13.4,  
121 11.8, 3.7 Hz, H-2b), 1.15 (3H, t, J=7.4 Hz, H-16), 1.10 (3H, s, H-18), 1.02 (3H, s, H-19). <sup>13</sup>C NMR (126  
122 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 201.87 (C-7), 144.28 (C-14), 142.96 (C-9), 136.48 (C-13), 134.83 (C-12), 131.80 (C-8),  
123 124.40 (C-11), 99.02 (C-3), 71.14 (C-20), 47.30 (C-5), 40.55 (C-4), 39.27 (C-6), 37.11 (C-10), 34.80 (C-  
124 1), 29.46 (C-2), 26.76 (C-19), 23.52 (C-15), 19.42 (C-17), 18.14 (C-18), 14.51 (C-16).

125

126 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistanthatetraen-10-ol (**4**)

127 High-resolution ESI-MS:  $m/z$  299.1669 [M + H]<sup>+</sup>; calculated for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, 299.1647. [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -216.9 (c  
128 0.065, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.34 (1H, d, J=7.9 Hz, H-12), 7.24 (1H, d, J=8.0 Hz, H-  
129 11), 7.17 (1H, d, J=10.3 Hz, H-1), 6.07 (1H, d, J=10.2 Hz, H-2), 3.09 (1H, m, H-6a), 3.07 (1H, m, H-  
130 15a), 2.86 (1H, m, H-15b), 2.73 (1H, dd, J=7.6, 4.8 Hz, H-5), 2.50 (1H, dd, J=16.8, 4.9 Hz, H-6b), 2.38  
131 (3H, s, H-17), 1.24 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, t, J=7.4 Hz, H-16), 0.63 (3H, s, H-18). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz,  
132 CDCl<sub>3</sub>) δ 203.12 (C-3), 199.77 (C-7), 150.04 (C-1), 144.46 (C-14), 143.48 (C-9), 138.76 (C-13), 135.00  
133 (C-12), 131.75 (C-8), 127.44 (C-2), 123.41 (C-11), 70.17 (C-10), 49.93 (C-5), 45.54 (C-4), 39.09 (C-6),  
134 24.67 (C-19), 23.11 (C-15), 21.28 (C-18), 19.61 (C-17), 14.47 (C-16).

135

## 136 2.6. High-resolution LC-MS Analysis

137 High-resolution mass spectra (ESI-MS) were obtained using an Agilent 1100 HPLC coupled to a  
138 JEOL AccuTOF (JMS-T100LC) (Peabody, MA). All isolated compounds were prepared in MeOH and  
139 injected directly into a 0.3 mL/min stream of either MeOH or 80% MeOH/20% DI H<sub>2</sub>O. Twenty μL of  
140 sample (approximately 0.1 mg/mL) was injected manually at 0.5 minutes while mass drift compensation  
141 standards [*L*-tryptophan (negative ion), PEG (positive ion)] were injected at 1.5 minutes over the course of  
142 a 2 minute run.

## 143 2.7. Bioassays with Lettuce and Bentgrass

144 Seeds of lettuce (*Lactuca sativa* - Iceberg A Crisphead cultivar from Burpee Seeds, Warminster, PA)  
145 and bentgrass (*Agrostis stolonifera* - Penncross variety obtained from Turf-Seed, Inc of Hubbard, Oregon)  
146 were surface sterilized with a 0.5% to 1% (v/v) sodium hypochlorite solution for approximately 10 min,  
147 rinsed with deionized water and dried in a sterile environment. The DCM crude extract of the adventitious  
148 roots of *V. gigantea*, column chromatography fractions and pure compounds were tested for phytotoxicity  
149 on the monocot bentgrass and dicot lettuce according to published methods [9]. A filter paper disk  
150 (Whatman Grade 1, 1.5 cm) was placed in each well of a 24-well plate. The control wells contained 200  
151  $\mu\text{L}$  of deionized water. The control + solvent well contained 180  $\mu\text{L}$  of water and 20  $\mu\text{L}$  of the solvent. All  
152 sample wells contained 180  $\mu\text{L}$  of water and 20  $\mu\text{L}$  of the appropriate dilution of the sample. Water was  
153 pipetted into the well before the sample or solvent. Test samples were dissolved in acetone and final  
154 concentrations of acetone in the wells was 10%. For the bioassay five lettuce seeds or 10 mg of bentgrass  
155 seeds were placed in each well before sealing the plate with Parafilm. The plates were incubated either for  
156 5 days (lettuce) or 12 days (bentgrass) in a Percival Scientific CU-36L5 incubator under continuous light  
157 conditions at 26°C and 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  average photosynthetically active radiation (PAR). A qualitative  
158 estimate of phytotoxicity was made by assigning a rating of 0 for no effect (sample well plants looked  
159 identical to the control + solvent well plants; seeds had germinated and resulting seedlings had grown  
160 normally), 2 for less than 50% germination inhibition, 3 for about 50% germination inhibition, 4 for more  
161 than 50% germination inhibition, and 5 for no germination of the seeds. Each experiment was repeated  
162 three times.

#### 163 2.8. Bioassay with *Lemna paucicostata* (duckweed)

164 The bioassay with *Lemna paucicostata* (duckweed) was carried out with the method of Michel et al  
165 [10]. Duckweed stocks were grown from a single colony consisting of a mother and two daughter fronds  
166 in 100 ml of Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture (Sigma H2395) (1.6 g L<sup>-1</sup>) with added iron (1 mL of  
167 1000X Fe-EDTA solution to 1 L of Hoagland media, pH adjusted to 5.5) in sterile jars with vented lids in  
168 a Percival Scientific CU-36L5 incubator under continuous light conditions at 26 °C and 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$   
169 average PAR. The iron solution (1000X) contained 18.36 g L<sup>-1</sup> of Fe-EDTA. Media were changed every 2  
170 to 3 days or new stocks were prepared in fresh media. Plant doubling time was approximately 24 to 36  
171 hours. Both screening and replicate series tests were conducted using non-pyrogenic polystyrene, sterile  
172 six-well plates (CoStar 3506, Corning Incorporated). Each well contained 4950  $\mu\text{L}$  of the Hoagland's media  
173 plus 50  $\mu\text{L}$  of water, or the solvent, or the compound dissolved in the appropriate solvent (at a concentration  
174 of 100X). Final concentration of the solvent was therefore approximately 1% by volume. A graphic  
175 template of the six-well plates was used for LemnaTec (LemnaTec, Würselen, Germany) image analysis  
176 software. Each well was inoculated with two 3-frond plants of the same age (4 to 5 day old) and  
177 approximate size and incubated in the Percival incubator as described above. Each treatment was replicated  
178 three times. IC<sub>50</sub> (concentration inhibiting growth by 50%) values were determined with R statistics  
179 software [11]. Plant frond areas were measured at time intervals (0 - 7 days) using LemnaTec image analysis  
180 methodology that records frond number, total frond area, as well as color classes that indicate chlorotic or  
181 necrotic effect.

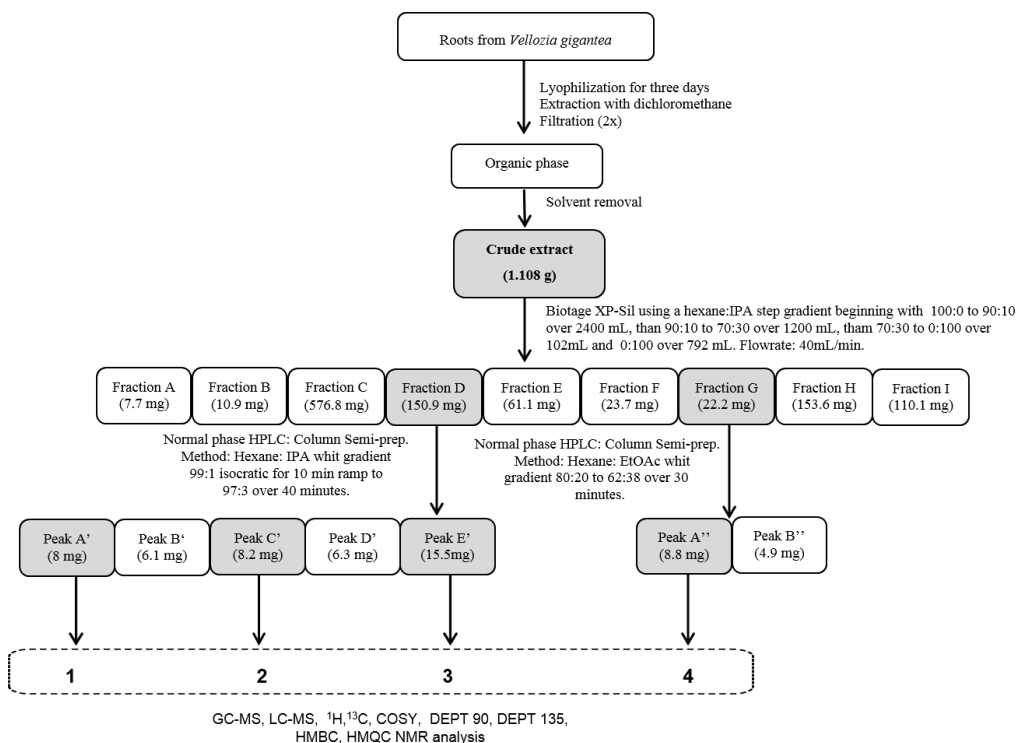
#### 182 2.9. Mosquito Larvae bioassays

183 Bioassays were conducted by using the bioassay system described by Ali et al. [12] to determine the  
 184 larvicidal activity of the pure compounds isolated from *V. gigantea* against *Aedes aegypti*. Five 1-day-old  
 185 larvae were transferred to each well of 24-well tissue culture plates in a 30-40  $\mu$ L droplet of water. An  
 186 aliquot of 50  $\mu$ L of larval diet (2% slurry of 3:2 Beef Liver powder and Brewer's yeast and 1 mL of  
 187 deionized water were added to each well by using a Finnpiptette stepper (Thermo Fisher, Vantaa, Finland).  
 188 All the compounds were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). Larval mortality was recorded 24-h post  
 189 treatment. Larvae that showed no movement in the well after manual disturbance were recorded as dead.  
 190 Larval mortality was converted into percentage.

### 191 3.Results

#### 192 3.1.Bioassay-Guided Fractionation

193 In a preliminary study, the adventitious roots of *Vellozia gigantea* were extracted using DCM,  
 194 providing extract which was subjected to phytotoxicity screening against *L. sativa* and *A. stolonifera*. The  
 195 crude extract was phytotoxic at 1 mg mL<sup>-1</sup> with effect 2 and 4, respectively. The phytotoxic bioassay-  
 196 directed fractionation of the DCM extract was performed (Figure 1). The fractions A to I obtained from the  
 197 fractionation of adventitious roots extract were submitted to phytotoxicity assay and fractions D and G  
 198 displayed activity. Fraction D was phytotoxic at 1 mg mL<sup>-1</sup> with effect 2 (*L. sativa*) and 4 (*A. stolonifera*)  
 199 and fraction G showed the highest phytotoxicity activities at 1 mg mL<sup>-1</sup> with effect 4 and 5, respectively.  
 200 The other fractions showed no significant activity. Based on these results, fractions D and G were selected  
 201 for isolation of the phytotoxic compounds. From fraction D we isolated three new pure compounds: **1**, **2**  
 202 and **3**. In addition, from the fraction G, compound **4** was obtained. NMR, GC-MS and LC-MS analysis  
 203 afforded the identification of the compounds as described below.

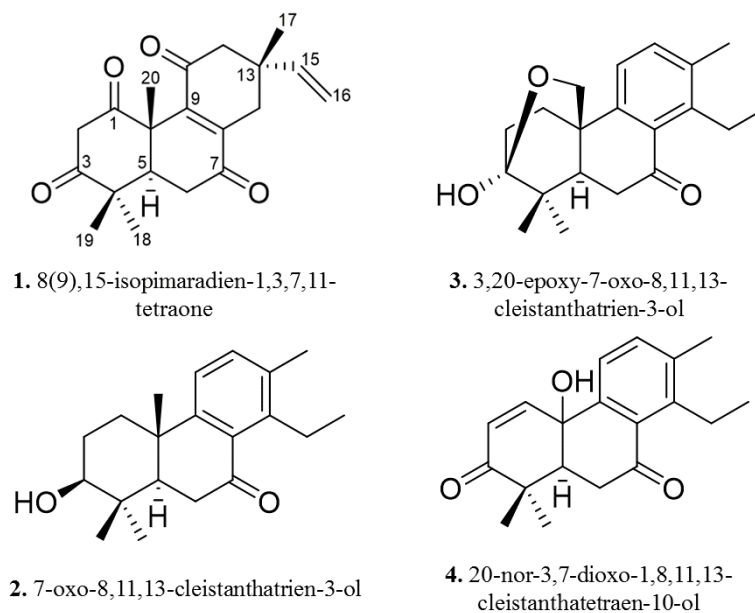




205 **Figure 1.** Flowchart illustrating the process of chemical isolation of four phytotoxic compounds  
206 produced by *Vellozia gigantea*, which was guided by phytotoxicity bioassays. All bioactive  
207 fractions and compounds are shaded.

### 208 3.2. Identification of phytotoxic compounds

209 Peak A' from HPLC purification of fraction D provided compound **1** which was identified as 8(9),15-  
210 isopimaradien-1,3,7,11-tetraone (**1**) on the basis of its spectroscopic data. Its molecular formula was  
211  $C_{20}H_{24}O_4$ , as revealed by the pseudomolecular ion at  $m/z$  327.1597  $[M - H]^-$  acquired in negative ion mode.  
212 The presence of four methyl singlets ( $\delta$  1.61, 1.26, 1.12, and 1.07) a two proton olefinic signal at  $\delta$  5.04 and  
213 an olefinic signal at  $\delta$  5.79 in the  $^1H$  NMR spectrum combined with olefinic carbons at  $\delta$  147.11, 144.18,  
214 and 143.28 in the  $^{13}C$  NMR spectrum indicated compound **1** possesses an isopimaradiene skeleton. Four  
215  $^{13}C$  NMR spectral shifts at  $\delta$  208.98, 202.51, 199.69, and 198.87 suggested a tetraone configuration.  
216 Inspection of the literature revealed similar isopimaradiene diones [13]. Positioning of C-1, C-3, C-7, and  
217 C-11 ketones was established by HSQC, HMBC and COSY spectroscopic data. NOESY correlations  
218 established the relative configuration as that drawn in Figure 2.



219

220

**Figure 2.** Chemical structures for compounds **1-4**.

221 Peak C' from the HPLC purification of fraction D provided compound **2** which was identified as 7-  
222 oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol (**2**) on the basis of its spectroscopic data. Its molecular formula was  
223  $C_{20}H_{28}O_2$ , as revealed by the pseudomolecular ion at  $m/z$  301.2173  $[M + H]^+$  acquired in positive ion mode.  
224 The presence of a methyl triplet ( $\delta$  1.19), four methyl singlets ( $\delta$  2.31, 1.14, 1.04, and 1.01), and two  
225 aromatic proton doublets ( $\delta$  7.24, 7.05) in the  $^1H$  NMR spectrum combined with information from the  $^{13}C$   
226 NMR spectrum (six  $sp^2$  hybridized olefinic carbons at  $\delta$  153.89, 144.38, 135.60, 134.83, 131.00, and  
227 120.68) indicated compound **2** possesses a cleistanthatriene skeleton. Inspection of the literature indicated  
228 similarities to 7-oxo-8,11,13-cleistanthatriene with differences in the A ring carbon shifts [14]. In  
229 particular, compound **2** had an additional  $sp^3$  oxygenated carbon at  $\delta$  78.44 and an oxymethine proton at  $\delta$

230 3.31. Positioning at C-3 was established by HSQC, HMBC and COSY spectroscopic data. NOESY  
231 correlations between H-3 and H-5 as well as between H-20 and H-19 established the relative configuration  
232 as that drawn in Figure 2.

233 Peak E' from the HPLC purification of fraction D provided compound **3** which was identified as 3,20-  
234 epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol on the basis of its spectroscopic data. Its molecular formula was  
235 C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>, as revealed by the pseudomolecular ion at *m/z* 337.1797 [M+Na]<sup>+</sup> acquired in positive ion mode.  
236 The presence of a methyl triplet (δ 1.15), three methyl singlets (δ 2.30, 1.10, 1.02), and two aromatic proton  
237 doublets (δ 7.25, 7.09) in the <sup>1</sup>H NMR spectrum combined with information from the <sup>13</sup>C NMR spectrum  
238 (six sp<sup>2</sup> hybridized olefinic carbons at δ 144.28, 142.96, 136.48, 134.83, 131.80, 124.40) indicated  
239 compound **3** possesses a cleistanthatriene skeleton. COSY, HSQC, and HMBC data established the  
240 positions of the C-7 ketone and the hydroxy carbon at C-20. Analysis of the degree of unsaturation for **3**  
241 indicated the presence of an additional ring and a hemiketal methine carbon at δ 99.02. HMBC correlations  
242 between the two oxymethylene protons at δ 4.21 (1H, dd, J=9.5, 2.9 Hz, H-20a) and δ 3.99 (1H, d, J=9.4  
243 Hz, H-20b) and the C-3 hemiketal carbon firmly established the location of the additional ring in the form  
244 of an epoxide between C-3 and C-20. Such epoxides in the cleistanthatriene skeleton have been reported  
245 previously [15]. NOESY spectrum analysis indicated correlations between oxymethines at C-20 and the  
246 beta methyl at C-19 as well as the C-6 beta methylene proton at δ 2.51. This and other correlations helped  
247 establish the relative configuration for **3** and establish it as a new compound.

248 Peak A'' from the HPLC purification of fraction G provided compound **4** which was identified as 20-  
249 nor-3,7-oxo-1,8,11,13-cleistanthetraen-10-ol on the basis of its spectroscopic data. Its molecular formula  
250 was C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>, as revealed by the pseudomolecular ion at *m/z* 299.1669 [M + H]<sup>+</sup> acquired in positive ion  
251 mode. The presence of a methyl triplet (δ 1.16), three methyl singlets (δ 2.38, 1.24, 0.63), and two aromatic  
252 proton doublets (δ 7.24, 7.34) in the <sup>1</sup>H NMR spectrum combined with information from the <sup>13</sup>C NMR  
253 spectrum (eight sp<sup>2</sup> hybridized olefinic carbons at δ 150.04, 144.46, 143.48, 138.76, 135.00, 131.75, 127.44,  
254 and 123.41) indicated compound **4** possesses a cleistanthetraene skeleton. C-3 and C-7 ketone positions  
255 were easily established using HMBC correlation data. Positioning of the hydroxyl at C-10 was  
256 unequivocally confirmed with HMBC correlations between H-11 and C-10, among others. NOESY  
257 correlation data was unable to establish the relative configuration of the hydroxyl at C-10 due to the lack  
258 of definitive correlation data. Complete structure determination was accomplished using COSY, HSQC,  
259 HMBC, and DEPT spectroscopic data unequivocally establishing the structure as drawn in Figure 2.

### 260 3.3. Phytotoxic activity of the pure compounds

261 The phytotoxic activities of the pure compounds against *L. sativa* and *A. stolonifera* are shown in  
262 Table 1. At 1000 µg mL<sup>-1</sup>, compounds 8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone (**1**), 7-oxo-8,11,13-  
263 cleistanthatrien-3-ol (**2**) and 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistanthetraen-10-ol (**4**) were moderately  
264 active (2-4 ranking) on both species, whereas 3,20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol (**3**) had no  
265 activity on lettuce at this concentration, but was moderately active on *A. stolonifera*. We can observe that  
266 after the fractionation of fraction **G** to obtain compound **4**, there was a reduction of the activity initially  
267 expressed. This fact may suggest that the initial activity of fraction **G** (4/5 effect) could be related not only  
268 to compound **4** (showed 2/3 effect), but to a synergism between this compound and some other compound

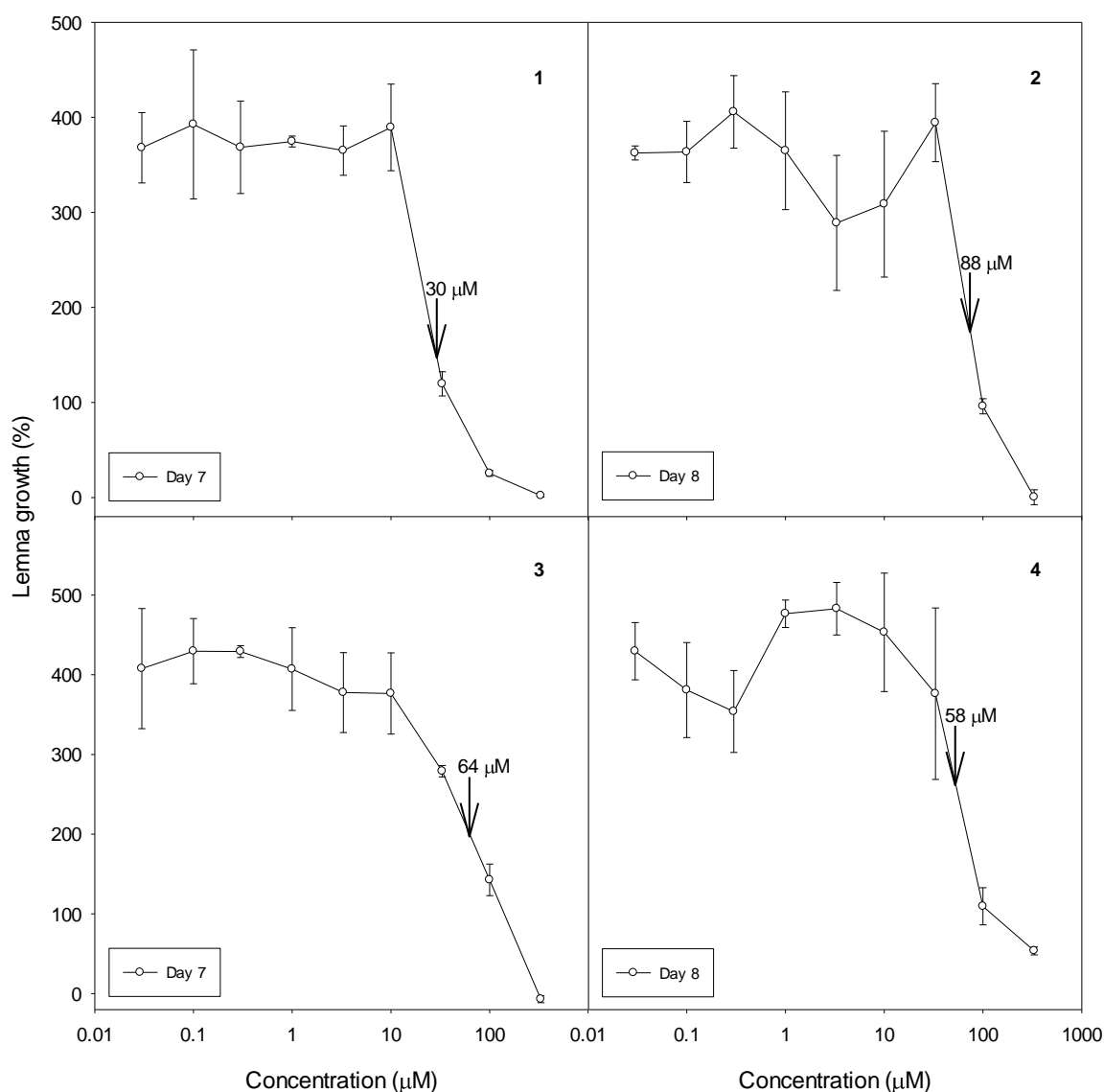
269 present in the fraction. Additionally, all four compounds were active as growth inhibitors of *L. paucicostata*  
 270 with the order of activity being **1** > **4** > **3** > **2** (Figure 3). With all four compounds, there was no significant  
 271 effect at 10 µM and complete cessation of growth at 333 µM, except for **4**, for which there was almost  
 272 complete growth inhibition. The IC<sub>50</sub> values are comparable to the commercial herbicides clomazone (126  
 273 µM), EPTC (62 µM) and naptalam (128 µM) in the same bioassay [10].

274 **Table 1.** Herbicidal activity of pure compounds isolated from adventitious roots of *Vellozia*  
 275 *gigantean*.

Compounds	Tested concentration (µg mL <sup>-1</sup> )	Phytotoxicity <sup>a</sup>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Agrostis stolonifera</i>
<b>1</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	1	0
	1000	2	3
<b>2</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	2	1
	1000	3	4
<b>3</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	0	0
	1000	0	3
<b>4</b>	1	0	0
	10	0	0
	100	0	0
	1000	2	3

276 <sup>a</sup>The qualitative estimate of phytotoxicity was evaluated by using a rating scale of 0-5, where 0  
 277 = no effect and 5 = no growth or no germination of the seeds.

278



279

280

**Figure 3.** Dose/response curves for the four isolated compounds in a *L. paucicostata* bioassay.

281

Error bars are  $\pm$  SE of the mean. Arrows with numbers denote the concentration that inhibits

282

growth by 50%.

283

### 3.4. Larval bioassays

284

In larvicide bioassays of the pure compounds against *Aedes aegypti*, 7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol (**2**) was most toxic against 1-day-old *Ae. aegypti* larvae at 24-h post treatment, with 100% mortality at the highest concentration of 125 ppm, followed by 40% and 10% at 62.5 and 31.25 ppm, respectively. Additionally, 3,20-epoxy-7-oxo-8,11,13-cleistanthatrien-3-ol (**3**) caused 50% mortality at all the above dosages. The compounds 20-nor-3,7-dioxo-1,8,11,13-cleistanthetraen-10-ol (**4**) and 8(9),15-isopimaradien-1,3,7,11-tetraone (**1**) had no activity against 1-day-old *Ae. aegypti* larvae at the highest dose of 125 ppm.

290

291

## 4. Discussion

292 *Vellozia gigantea* is a unique and endemic species living only the Rupestrian grasslands biome in  
293 Brazil. From the extract of adventitious roots of *V. gigantea*, we isolated four new diterpenes with  
294 phytotoxic and larvicidal activities. Other diterpenes from plants have been found to have pesticidal  
295 activities in the past [16-18]. Other diterpenes have been reported from roots of other Velloziaceae species:  
296 diterpenes with the isopimarane skeleton from *V. bilocor* [19], pimarane-type from *V. flavicans* [20] and  
297 19-hydroxy-8(9),15-abietadiene, 19-hydroxy-8(9), 13(16)-14S,17-cyclolabdadiene and 17-hydroxy-  
298 8(9),15-isopimaradien from *V. compacta* [21]. Few compounds have been described for *V. gigantea* until  
299 now. Morales et al. [22] described the antioxidant tocotrienols (tocopherols and tocotrienols) accumulated  
300 in leaves of *V. gigantea*.

301 In conclusion, our study proposes the structures of four new natural diterpene compounds produced  
302 by the adventitious root tissues of *V. gigantea*. These compounds might be used as scaffolds to develop  
303 new herbicides and other pesticides. Additionally, our results show that ancient and unique plants, like the  
304 endangered, narrowly endemic neotropical species *V. gigantea* present in the Rupestrian grasslands, should  
305 be protected because of their intrinsic value as sources of new, bioactive compounds. As *V. gigantea* is an  
306 endangered species, further studies will be necessary to obtain micropropagated plants and isolate these  
307 new pesticidal diterpenes which may be modified to increase their activities and modify their selectivity.

### 308 **Acknowledgments**

309 We acknowledge the financial support from FAPEMIG (0050-13), CAPES (23038.003478/2013-92),  
310 FINEP (2084/07), NIH, NIAID, Division of AIDS, Grant N°. AI 27094, USDA Agricultural Research  
311 Service Specific Cooperative Agreement No. 58-6408-1-603 and USDA-ARS grant No. 56-6402-1-612.  
312 There is no conflict of interest among the authors. The authors thank Robert Johnson, Solomon Green III  
313 and Mrs. Amber Reichley for technical assistance.

314

### 315 **References**

- 316 1. Lousada, J.M.; Borba, E.L.; Ribeiro, K.T.; Ribeiro, L.C.; Lovato, M.B. Genetic structure and variability of  
317 the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (*Velloziaceae*) associated with the landscape in the Espinhaço  
318 Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* **2011**, *139*, 431–440.  
319 DOI:10.1007/s10709-011-9561-5
- 320 2. Giulietti, A.M.; Pirani, J.R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço  
321 Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns*.  
322 *Academia Brasileira de Ciências*, Vanzolini PE, Heyer WR (Eds) Rio de Janeiro (Brazil). **1988**, 39-69.
- 323 3. Joly, A.B. *Conheça a vegetação brasileira*. Ed. USP, São Paulo. **1970**.
- 324 4. UNESCO. MAB Biosphere reserves directory.  
325 (<http://www.brasilia.unesco.org/noticias/releases/2005/biosferaespinhaco>) (29 september 2014).
- 326 5. Silveira, F. A. O.; Negreiros, D.; Barbosa N. P. U.; Buisson, E.; Carmo, F. F.; Carstensen, D. W.; Conceição,  
327 A. A.; Cornelissen, T. G.; Ecthernacht, L.; Fernandes, G. W.; Garcia, Q. S.; Guerra, T. J.; Jacobi, C. M.;  
328 Lemos-Filho, J. P.; Le Stradic, S.; Morellato, L. P. C.; Neves, F. S.; Oliveira, R. S.; Schaefer, C. E.; Viana,  
329 P. L.; Lambers, H. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected  
330 conservation priority. *Plant Soil*, **2016**, 1-24. DOI:10.1007/s11104-015-2637-8

3316. Mello-Silva, R.; Menezes, N. L. Two new Brazilian Velloziaceae, *Vellozia auriculata* and *Vellozia*  
332 *gigantea*, and a key to the related dracenoid species of *Vellozia*. *Novon*, **1999**, 536-541. DOI:  
333 10.2307/3392159
3347. Biodiversitas. Lista da flora brasileira ameaçada de extinção. *Fundação Biodiversitas*. Belo Horizonte,  
335 Minas Gerais, Brazil. **2005**.
3368. Duke, S. O.; Owens, D. K.; Dayan, F. E. The growing need for biochemical bioherbicides. *Amer. Chem.*  
337 *Soc. Symp. Ser.* **2014**, 1172, 31-43.
3389. Dayan, F.E.; Romagni, J.G.; Duke, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *J. Chem.*  
339 *Ecol.* **2000**, 26, 2079-2094. DOI:10.1023/A:1005512331061.
34010. Michel, A.; Johnson, R.D.; Duke, S.O.; Scheffler. Dose-response relationships between herbicides with  
341 different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: An improved exotoxicological method.  
342 *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 232, 1074-1079. DOI: 10.1897/03-256.
34311. R-Development-Core-Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.2.3 Edn. R  
344 *Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria. **2015**
34512. Ali, A.; Tabanca, N.; Demirci, B.; Baser, K.H.C.; Ellis, J.; Gray, S.; Lackey, B.R.; Murphy, C.; Khan, I.A.;  
346 Wedge, D.E. Composition, mosquito larvicidal, biting deterrent and antifungal activity of essential oils of  
347 different plant parts of *Cupressus arizonica* var. *glabra* (Sudw.) Little ('Carolina Sapphire'), *Natural Prod.*  
348 *Commun.* **2013**, 8, 257-260. PMID:23513743.
34913. Pinto, A.C.; Valente, L.M.M.; Da Silva, R.S. Norditerpenoids from *Vellozia pusilla*. *Phytochemistry*. **1988**,  
350 27, 3913-3915. DOI:10.1016/0031-9422(88)83043-7.
35114. Pinto, A.C.; Pereira, A.L.; Antunes, O.A.C. RMN <sup>13</sup>C de diterpenoids com esqueleto cleistantano. *Quimica*  
352 *Nova*. **1985**, 7-13.
35315. Cheng, L.; Ji, K.; Liao, S.; Gan, L.; Yang, L.; Cao, D.; Liu, Y.; Guo, J.; Zhang, P.; Lu, C.; Hu, H.; Xu, Y.  
354 Diterpenoids and Phenanthrenones from the Leaves and Stems of *Strophoblachia Fimbricalyx*.  
355 *Tetrahedron Lett.* **2016**, 21, 2262–2265. DOI.10.1016/j.tetlet.2016.04.034
35616. Duke, S.O.; Romagni, J.G.; Dayan, F.E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal  
357 action. *Crop Protect.* **2000**, 19, 583-589. DOI.10.1016/S0261-2194(00)00076-4
3587. Tellez, M.R.; Duke, S.O.; Schrader, K.K.; Dayan, F.E.; Romagni, J.G.; Kobaisy, M. 2002. Terpenoid-based  
359 defense in plants and other organisms. In *Lipid Biotechnology*, Kuo, T.M.; Gardner, H.W., Eds.; Marcel  
360 Dekker: New York, **2002**; pp. 319- 355.
3618. Duke, S.O.; Oliva, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In *Allelopathy: Chemistry and Mode of*  
362 *Action of Allelochemicals*. Macías, F.A., Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G., Eds.; CRC Press: Boca Raton,  
363 FL, **2004**; pp. 201-216.
36419. Pinto, A.C.; Queiroz, P.P.S.; Garcez, W.S. Diterpenes from *Vellozia bicolor*. *J. Brm. Chem. SOC.* **1991**, 2,  
365 35-30.
36620. Pinto, A.C.; Rezende, C.M.; Antunes, O.A.; Correia, C.R.D. Three isomeric diterpenes from *Vellozia*  
367 *flavicans*. *Phytochemistry*. **1996**, 42, 767-769. DOI:10.1016/0031-9422(95)00906-X.
36821. Pinto, A.C.; Borges, C. Six diterpenes from *Vellozia compacta*. *Phytochemistry*. **1983**, 22, 2011-2015.  
369 DOI:10.1016/0031-9422(83)80034-X.

37022. Morales, M.; Garcia, Q.S.; Siqueira-Silva, A.I.; Silva, M.C.; Munne-Bosch, S. Tocotrienols in *Vellozia*  
371 *gigantea* leaves: occurrence and modulation by seasonal and plant size effects. *Planta*. **2014**, 240, 437-446.  
372 DOI:10.1007/s00425-014-2104-4.