

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

Dissertação de Mestrado

DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS
À *Carapa guianensis* Aublet (ANDIROBA)

Mariana Costa Ferreira

Belo Horizonte
2013

Mariana Costa Ferreira

DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS
À *Carapa guianensis* Aublet (ANDIROBA)

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Luiz Henrique Rosa.

Co-orientador: Carlos Augusto Rosa.

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos. ICB/UFMG.

Belo Horizonte
2013

Colaboradores:

Dr. Carlos Leomar Zani

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

Laboratório de Química de Produtos Naturais

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MS

Dra Mariana de Lourdes Almeida Vieira

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Jerri Edson Zilli

Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro

Dr. Marcos José Salgado Vital

Departamento de Biologia

Universidade Federal de Roraima

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre ao lado me dando força e carinho em todos os momentos de minha vida.

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

Ao Prof. Carlos Rosa, agradeço por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pela orientação.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Aristóteles Góes-Neto e Prof. Daniel de Assis Santos, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que certamente serão muito importantes para a melhoria e continuidade dos nossos estudos.

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

Ao Dr. Carlos Zani, Dr^a Tânia Maria Alves e demais do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), pela colaboração e permissão para utilizar a infra-estrutura do laboratório.

Ao Dr. Jerri Edson Zilli (Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro) e ao Dr. Marcos José Salgado Vital (UFRR) pela colaboração, disponibilização do acesso a área de coleta das amostras e permissão para utilizar a infra-estrutura do laboratório.

Ao Jamil, Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, muito obrigada pela disponibilidade e ajuda na liofilização do material e secagem dos extratos.

Ao pessoal do NAGE por disponibilizarem a infra-estrutura necessária para a realização dos sequenciamentos.

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

A Mari Vieira, quem me adotou dentro do laboratório, obrigada não apenas pela colaboração, mas também pela amizade e carinho, que levarei para sempre comigo.

Um agradecimento especial também para Camila Carvalho, Barbara e Larissa, que foram mais do que colegas de trabalho, foram companheiras e amigas durante toda esta trajetória. Obrigada por fazerem parte da minha história!

A meu pai, obrigada pelo apoio e confiança durante toda esta trajetória. Obrigada por estar sempre me apoiando nas minhas decisões. A minha mãe, pelo apoio e força espiritual, dedico a você a conclusão desta etapa.

Aos meus irmãos Maria Clara e Rodrigo, e minha cunhada Adriana, obrigada pelo apoio e paciência nos momentos de ausência.

A minha tia Sônia e meu tio Márcio, obrigada por cuidarem de mim durante todos estes anos, obrigada pelo apoio e carinho.

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

Sumário

Lista de Figuras	vi
Listas de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Resumo	xiii
Abstract.....	xv
1 Justificativa e Relevância	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Micro-organismos endofíticos	3
2.2 Fungos endofíticos: interação micro-organismo/planta hospedeira	4
2.3 Diversidade de fungos endofíticos.....	8
2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos	11
2.5 <i>Carapa guianensis</i> Aubl. (Andiroba)	17
3 Objetivos.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 Material e Métodos.....	22
4.1 Área de coleta	22
4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos	23
4.3 Identificação dos fungos endofíticos isolados	24
4.3.1 Extração do DNA Total.....	24
4.3.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG) ₅	25
4.3.3 Amplificação da região ITS.....	25
4.3.4 Amplificação parcial do gene da β -tubulina.....	26
4.3.5 Amplificação parcial do Fator de Elongação – 1 alpha.....	27
4.3.6 Purificação dos amplicons	27
4.3.7 Reações de sequenciamento	28
4.3.8 Análise computacional das sequências.....	29
4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância.....	29
4.5 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos.....	31
4.5.1 Fungos filamentosos	31
4.5.2 Folhas de <i>C. guianensis</i>	31

4.6	Ensaio Biológicos.....	31
4.6.1	Determinação da atividade antimicrobiana	31
4.6.1.1	Padronização dos inóculos	32
4.6.1.2	Ensaio antimicrobiano.....	32
4.6.2	Ensaio antimicrobiano contra <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	34
4.6.3	Cálculo da Concentração Inibitória Mínima	35
4.6.4	Re-cultivo, extração e certificação da atividade antimicrobiana.....	36
4.6.5	Ensaio com a forma tripomastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i>	36
4.7	Processos fermentativos do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. UFMGCB 4991 para determinação das condições ótimas de cultivo e obtenção de metabólitos bioativos	37
5	Resultados e discussão	39
5.1	Coleta e isolamento dos fungos endofíticos	39
5.2	Identificação dos fungos endofíticos isolados	40
5.3	Composição da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas de <i>Carapa guianensis</i>	42
5.4	Diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas de <i>Carapa guianensis</i>	57
5.5	Cultivo e preparo dos extratos	61
5.6	Detecção dos extratos ativos	62
5.6.1	Determinação da atividade tripanosomicida.....	65
5.7	Re-cultivo, extração e certificação da atividade antimicrobiana	66
5.8	Processos fermentativos do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. UFMGCB 4991 para determinação das condições ótimas de cultivo e obtenção de metabólitos bioativos	66
6	Conclusões.....	73
7	Referências Bibliográficas.....	75

Lista de Figuras

- Figura 1** - Esquema da interação fungo endofítico/planta hospedeira. (A) Hipótese do antagonismo balanceado. (B) Condição de doença causada por fatores de virulência do fungo. (C) Reciprocidade endófito – patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que o fenômeno mostrado pode não ser universal. (D) Estratégia de sobrevivência do endófito. (E) Equilíbrio sinérgico. (KUSARI *et al.*, 2012)..... 7
- Figura 2** – Representação esquemática de interação interespecífica endófito – endófito. (A) Interação fungo – fungo. (B) Interação fungo – bactéria endossimbionte. (C) Interação fungo – bactéria (KUSARI *et al.*, 2012)..... 12
- Figura 3** - Moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos. (a) Criptocandina A, (b) Taxol, (c) Pestalosídeo, (d) Substâncias L-783,281, (e) Pestacina, (f) Isopestacina, (g) Altenusin, (h) Cochlioquinona A, (i) Isocochlioquinana A, (j) Citrinin..... 16
- Figura 4** - *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*): árvore (a), folhas (b) e sementes(c).
..... 20
- Figura 5** - Localização da área de coleta – Município de São João da Baliza, Roraima, Brasil..... 22
- Figura 6** - Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios realizados..... 34
- Figura 7** - Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios de CIM realizados. 35
- Figura 8** – Frequência de isolamento dos fungos filamentosos obtidos a partir de cada espécime de *carapa guianensis*. A: Espécime de *Carapa guianensis* (Andiroba) amostrado. 40
- Figura 9** – Porcentagem dos fungos endofíticos classificados em nível de classe associados às folhas de *Carapa guianensis*..... 41

Figura 10 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Colletotrichum* associados à *Carapa guianensis*. a) Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. b) Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*.
^RSequência de referência. ^TSequência Tipo..... 44

Figura 11 - Árvores filogenéticas dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* associados à *carapa guianensis*. a) Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. b) Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina. c) Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene do EF 1- α , utilizando o método *Neighbour-joining*.
^RSequência de referência. ^TSequência Tipo..... 50

Figura 12 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Pestalotiopsis* associados à *carapa guianensis*. a) Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. b) Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*.
^RSequência de referência. ^TSequência Tipo..... 51

Figura 13 - Árvores filogenéticas dos isolados da família *Xylariaceae* associados à *carapa guianensis*, construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA., utilizando o método *Neighbour-joining*.
^RSequência de referência. ^TSequência Tipo..... 52

Figura 14 - Árvores filogenéticas construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA., utilizando o método *Neighbour-joining*.
^RSequência de referência. ^TSequência Tipo..... 53

Figura 15 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Penicillium* associados à *carapa guianensis*. a) Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. b) Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*.
^RSequência de referência. ^TSequência Tipo..... 56

Figura 16 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon <i>Aspergillus</i> associados à <i>carapa guianensis</i> . A) Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. B) Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método <i>Neighbour-joining</i> . ^R Sequência de referência. ^T Sequência Tipo.....	56
Figura 17 – Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tou) dos fungos endofíticos associados às folhas de <i>Carapa guianensis</i> Aublet (<i>Meliaceae</i>), construída com intervalo de 95% de confiança.....	61
Figura 18 – Desempenho dos extratos dos endofíticos associados à <i>Carapa guianensis</i> contra os micro-organismos alvos.	63
Figura 19 – Espectro de ação dos extratos obtidos a partir do teste fermentativo realizado com o fungo UFMGCB 4991.	68
Figura 20 – Rendimento dos extratos produzidos no teste de fermentação realizado com o isolado UFMGCB 4991.....	70

Listas de Tabelas

Tabela 1 - Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *Carapa guianensis*. 46

Tabela 2 - Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a *Carapa guianensis*. 59

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir do teste fermentativo realizado com fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991..... 71

Lista de Abreviaturas

% - por cento
AAG – Ágar-água-glicose
AAGL - Ágar-água-glicose-extrato de levedura
Act – Actina
AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC - American Type Culture Collection
BDA - Ágar Dextrose Batata
BDAG - Ágar Dextrose Batata com glicose
BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool
Calm – Calmodulina
CBS – Centro de Biodiversidade de fungos
CCT - Coleção de Cultura Tropicais
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
cm - Centímetro
CTAB - Brometo de cetil trimetilamonio
d - dias
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
EF-1 α - Fator de Elgção 1 alpha
ERO – Espécie reativa de oxigênio
EUA - Estados Unidos da América
g - gramas
GPS - Sistema de Posicionamento Global
h - horas
HCl - Ácido Clorídrico

Hist - Histona
IC₅₀ - Concentração inibitória de 50%
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
N - norte
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
r.p.m. - rotações por minuto
rDNA - DNA ribossomal
SDS - sódio dodecil sulfato
TBE - Tris borato
TNTP - tetranortriterpenóides
UFC/mL - Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UFRR – Universidade Federal de Roraima
V - volt

W - oeste

X - vezes

β -Tub - Beta-tubulina

$\mu\text{g}/\text{mL}$ - Microgramas por mililitro

μL - microlitro

μM - Micromolar

μmol - micromol

Resumo

Os micro-organismos endofíticos, aqueles que residem assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais, por pelo menos um período do seu ciclo de vida, são capazes de produzir diferentes metabólitos bioativos de interesse na medicina e agricultura. A espécie *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*), popularmente conhecida como Andiroba, é amplamente utilizada na medicina popular. Entretanto, apesar da sua ampla utilização etnobotânica, poucos estudos foram realizados com o objetivo de conhecer a comunidade de fungos endofíticos associados às folhas de *C. guianensis*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados à *C. guianensis* e avaliá-la como fonte de metabólitos bioativos. Fragmentos das folhas foram desinfestados superficialmente e inoculados em meio de cultura Ágar Dextrose Batata (BDA) e Agar Extrato de Malte e Extrato de Levedura (YM) para isolamento dos fungos endofíticos. As placas foram incubadas por até 60 dias e os fungos obtidos isolados e purificados em BDA. Todos os fungos obtidos foram preservados e depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Após purificação foram obtidos 209 isolados de fungos filamentosos, os quais foram agrupados utilizando suas características morfológicas e moleculares em 42 morfoespécies. A identificação dos fungos foi realizada por meio do sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA e sequenciamento parcial do gene da β -tubulina e/ou do Fator de alongação 1 alpha (EF-1 α). Todos os táxons identificados foram classificados como pertencentes ao filo *Ascomycota*. A classe *Sordariomycetes* foi predominante, representando 91% dos táxons obtidos. As classes *Dothideomycetes* (6%) e *Eurotiomycetes* (3%) também foram encontradas. Dentro da classe dos *Sordariomycetes* foram encontradas espécies dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Entonaema*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Hypocrea*, *Menisporopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pilidiella* e *Xylaria*. Entre os *Dothideomycetes* foram identificadas espécies dos gêneros *Botryosphaeria*, *Endomelanconiopsis* e *Guignardia*. Os gêneros pertencentes à classe *Eurotiomycetes* incluíram espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Em comparação com outras comunidades de fungos endofíticos, a comunidade associada a *C. guianensis* apresentou elevada diversidade (Fisher- α = 17,23) e baixa dominância (Simpson = 0,93), indicando que os táxons encontrados estão distribuídos de forma homogênea dentro da comunidade. Por outro lado, a comunidade de fungos apresentou moderada riqueza de espécies (Margalef = 7,9). Todos os fungos endofíticos obtidos foram cultivados em BDA

por 15 dias e seus metabólitos extraídos com etanol PA. Os extratos obtidos foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana e tripanosomicida pelo método de microdiluição em placa. Os extratos dos fungos *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 e 4872, e *Pilidiella* cf. *quercicola* UFMGCB 4904 apresentaram atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* com porcentagens de inibição de 95, 98 e 99% na concentração de 250 µg/mL, respectivamente. Os extratos dos fungos UFMGCB 4865, *Endomelanconiopsis endophytica* UFMGCB 4995 e *Phomopsis* sp. UFMGCB 4830 apresentaram atividade tripanosomicida a 20 µg/mL com percentual de inibição de 77,8, 85,9 e 100%, respectivamente. Entre os fungos que exibiram atividade antimicrobiana o isolado *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 foi selecionado para realização de testes fermentativos, com o intuito de aperfeiçoar sua produção de metabólitos bioativos. Diferenças nutricionais (tipo de meio de cultura) e variação de temperatura e tempo de crescimento foram avaliadas, totalizando 64 diferentes condições de cultivo. Os extratos de *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 foram submetidos à triagem contra todos os micro-organismos alvos. Entre as diferentes condições analisadas, 27 (42,18%) extratos apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos alvos. Além disso, o extrato de *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 que inicialmente foi capaz de inibir apenas *Escherichia coli*, após as variações nos parâmetros de cultivo, demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cladosporium sphaerosperum*. Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para ampliar o conhecimento a respeito da comunidade de fungos endofíticos associados a plantas medicinais brasileiras. Apesar das folhas de *C. guianensis* não apresentarem um grande reservatório de fungos endofíticos promissores para estudos de bioprospecção, foi possível detectar duas espécies (*Pilidiella* cf. *quercicola* e *Endomelanconiopsis endophytica*) relatadas pela primeira vez como produtoras de metabólitos bioativos. Os extratos produzidos por estes fungos e aqueles obtidos por meio do teste fermentativo demonstraram-se promissores e estes podem conter moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas.

Abstract

Endophytic microorganisms, those that asymptotically reside within the plant tissue for at least one period of its life cycle, are capable of producing different bioactive metabolites of interest in medicine and agriculture. The species *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*), popularly known as Andiroba, is widely used in folk medicine. However, despite its ethnobotany use, few studies have been conducted in order to know the community of endophytic fungi associated with leaves of *C. guianensis*. The objective of this study was to characterize the diversity of the community of endophytic fungi associated with *C. guianensis* and evaluate it as a source of bioactive metabolites. Fragments of leaves were superficially disinfected and inoculated in Potato Dextrose Agar culture (BDA), Malt Extract Agar and Yeast Extract (YM) for isolation of endophytic fungi. The plates were incubated for 60 days and the obtained fungi were isolated and purified in PDA. All fungi obtained were preserved and deposited in the Collection of Micro-organisms and cells of the Federal University of Minas Gerais. After purification, 209 isolates of filamentous fungi were obtained, which were grouped using morphological and molecular characteristics into 42 morphospecies. The identification of the fungi was performed by sequencing the internal transcribed region (ITS1, ITS2-5.8S) rRNA gene and partial sequencing of the gene for β -tubulin and / or elongation factor 1 alpha (EF-1 α). All taxa identified were classified as belonging to the phylum *Ascomycota*. The class *Sordariomycetes* was predominant, representing 91% of taxa obtained. Classes *Dothideomycetes* (6%) and *Eurotiomycetes* (3%) were also found. In the class *Sordariomycetes* were found species of the genera *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Entonaema*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Hypocrea*, *Menisporopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pilidiella* and *Xylaria*. Among *Dothideomycetes* were identified species of the genera *Botryosphaeria*, *Endomelanconiopsis* and *Guignardia*. The genera belonging to the class *Eurotiomycetes* included species of *Aspergillus* and *Penicillium*. In comparison to other communities of endophytic fungi, the community associated with *C. guianensis* showed high diversity (Fisher- α = 17.23) and low dominance (Simpson = 0.93), indicating that the taxa found are homogeneously distributed in the community. Moreover, the fungal community showed moderate species richness (Margalef = 7.9). All endophytes obtained were cultured in PDA for 15 days and had its metabolites extracted with ethanol PA. The extracts were evaluated for antimicrobial activity and trypanocidal method microdilution plate. Extracts of the fungus *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991

and 4872, and *Pilidiella cf. quercicola* UFMGCB 4904 showed antibacterial activity against *Escherichia coli* with percentages of inhibition of 95, 98 and 99% at a concentration of 250 mg/mL, respectively. The extracts of fungi UFMGCB 4865, *Endomelanconiopsis endophytica* UFMGCB 4995 and *Phomopsis* sp. UFMGCB 4830 showed trypanocidal activity at 20 mg/mL with inhibition percentage of 77.8, 85.9 and 100%, respectively. Among the fungi that exhibited antimicrobial activity, the isolate *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 was selected for testing fermentation, in order to improve its production of bioactive metabolites. Nutritional differences (type of culture medium) and temperature variation and growth time were assessed, totaling 64 different growing conditions. Extracts of *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 underwent screening against all micro-organisms targets. Among the different conditions analyzed, 27 (42.18%) extracts showed activity against at least one of the micro-organisms targets. Furthermore, the extract of *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 that initially was only able to inhibit *Escherichia coli*, following variations in the parameters of cultivation, demonstrated activity against *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cladosporium sphaerosperum*. The results obtained in this study contribute to the knowledge about the community of endophytic fungi associated with Brazilian medicinal plants. Although the leaves of *C. guianensis* not having a large reservoir of endophytic fungi promising for bioprospecting studies, it was possible to detect two species (*Pilidiella cf. quercicola* and *Endomelanconiopsis endophytica*) first reported as producers of bioactive metabolites. The extracts produced by these fungi and those obtained by the fermentation test proved to be promising, these molecules may contain prototype for the development of new drugs.

1 Justificativa e Relevância

A necessidade de novas e eficientes drogas capazes de auxiliar no tratamento de diferentes doenças cresce a cada ano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas e parasitárias representam a segunda principal causa de morte no mundo, com 15,6% de óbitos entre mulheres e 16,7% entre homens, enquanto o câncer ocupa o terceiro lugar na lista (OMS, Organização Mundial da Saúde, 2008).

Os micro-organismos endofíticos, aqueles que residem assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida, são capazes de produzir diferentes metabólitos bioativos e, em alguns casos, substâncias similares àqueles provenientes de suas plantas hospedeiras (WICKLOW et al. 2005, RADIC & STRUKELJ, 2012). Estima-se que existam cerca de 300 mil espécies de plantas em todo mundo e que cada planta pode abrigar um ou mais micro-organismos endofíticos; conseqüentemente, a probabilidade de se encontrar um endófito com capacidade de produzir metabólitos bioativos é alta (STROBEL & DAISY, 2003; SMITH et al., 2008). No entanto, apesar desta diversidade esperada, relativamente poucos destes micro-organismos têm sido caracterizados. Muitos endófitos produzem produtos naturais bioativos que inibem o crescimento de outros micro-organismos (SMITH et al., 2008), os quais apresentam potencial valor terapêutico e, por isso, representam interessantes moléculas protótipos para o desenvolvimento de drogas úteis na medicina, agricultura e indústria.

Metabólitos secundários ou produtos naturais são definidos como substâncias de baixo peso molecular que, a princípio, são dispensáveis a sobrevivência e desenvolvimento do organismo (DEMAIN, 1981). Diferentes trabalhos descrevem a importância dos metabólitos derivados de plantas e/ou micro-organismos no tratamento de diversas doenças. De acordo com Lam (2008), 60 e 75% dos novos medicamentos de combate ao câncer e doenças infecciosas, respectivamente, foram provenientes de produtos naturais entre os anos de 1981 e 2001; e vinte e três novas drogas derivadas de produtos naturais foram registradas entre os anos de 2001 e 2005. Um dos agentes antitumorais mais utilizados na clínica atualmente, o diterpeno paclitaxel (Taxol[®]), é produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (STROBEL, 2003), isolado do vegetal *Taxus brevifolia* (STIERLE et al., 1995). A partir da descoberta de que um endofítico foi capaz de produzir metabólitos bioativos e, às vezes, são os mesmos

produzidos pela sua planta hospedeira intensificaram os estudos sobre fungos endofíticos como fonte de metabólitos bioativos.

Plantas endêmicas de ecossistemas com elevada biodiversidade ou que apresentam histórico etnobotânico são conhecidas por produzir diferentes substâncias com propriedades terapêuticas. De acordo com Strobel et al. (2004), algumas propriedades medicinais atribuídas a algumas espécies vegetais também podem estar estreitamente relacionadas de alguma forma à produção de metabólitos secundários por sua comunidade de fungos endofíticos, indicativo que torna tais plantas hospedeiras promissoras para estudos de diversidade e bioprospecção de fungos. O Brasil possui cerca de 56 mil espécies de plantas distribuídas em todo seu território, representando quase 19% da biodiversidade vegetal do mundo, sendo a região amazônica um dos grandes centros de hiperdiversidade (GIULIETTI et al., 2005). Na Amazônia brasileira, a *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*), popularmente conhecida como Andiroba, Andirobasarubá, Carapá e Mandiroba é amplamente utilizada na medicina popular devido à sua ação anti-inflamatória, anti-reumática, inseticida, para o tratamento de doenças de pele, ferimentos, escoriações e combate a infecções microbianas (MORTON, 1981; HAMMER, 1993; TONINI, 2009). De acordo com Tonini (2009) o óleo extraído a partir das sementes da *C. guianensis* é um dos produtos medicinais mais utilizados na floresta amazônica. Além do óleo das sementes, folhas e cascas também são empregadas na medicina caseira, tanto pelos índios quanto pela população não-indígena local (LORENZI & MATOS, 2008, TONINI, 2009). A não ser pelo estudo de Cannon & Simmons (2002), pouco se conhece sobre a comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis*. Desta forma, este trabalho visa responder as seguintes questões:

1. Qual a composição e diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis*?
2. A comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis* é capaz de produzir metabólitos bioativos?

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Micro-organismos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos incluem fungos, bactérias e protozoários que, em pelo menos parte do seu ciclo de vida, habitam os espaços inter ou intracelulares de tecidos vivos de uma planta hospedeira, sem causar sintomas aparentes de doença ou efeitos negativos (TAN & ZOU, 2001; ANITHA et al., 2011). O “endofitismo” parece representar a única associação de custo-benefício entre micro-organismo/planta definida por “localização” e não por “função”, que é transitoriamente assintomática e estabelecida inteiramente no interior de tecidos vivos vegetais (KUSARI, 2012). Esta complexa interação micro-organismo/planta pode ser representada por relações de simbiose, parasitismo ou mesmo saprofitismo (ZUCCARO et al., 2011).

Evidências da associação micro-organismo/planta parecem ser antigas e já foram encontradas em tecidos fossilizados de folhas e caules, revelando 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). Strobel e colaboradores (2004) relatam que 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).

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).

2.2 Fungos endofíticos: interação micro-organismo/planta hospedeira

Diferentes trabalhos sugerem que muitas, se não todas, as plantas em ecossistemas naturais ocorrem em simbiose com fungos micorrízicos e/ou endofíticos (PETRINI, 1986). Estes fungos simbióticos podem desempenhar diferentes efeitos na ecologia da planta, no seu estado saudável e em sua evolução (BRUNDRERT, 2006). O estabelecimento desta interação 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 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). 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).

Apesar da natureza assintomática da colonização de um endófito poder induzir à classificação de um relacionamento simbiótico, 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 reforçaria essa hipótese, na medida em que tais micro-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 detectadas nos tecidos vegetais. Relações simbióticas requerem um sofisticado balanço entre as respostas de defesa da planta e a demanda de nutrientes pelo endofítico e segundo Kogel (2006) esta interação mutualística não significa ausência de defesa da planta. Fungos endofíticos representam um grupo altamente diversificado que podem desempenhar grande impacto sobre as comunidades vegetais, seja conferindo 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 contra 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).

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 (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*, conferindo aumento da tolerância ao calor e possibilitando seu crescimento em solos 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 costeiras demonstraram que apenas os isolados de plantas costeiras eram 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 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 contaminados.

Nesta 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).

De acordo com Azevedo e colaboradores (2000), a distinção entre endofíticos, epifíticos (espécies que vivem na superfície de plantas) e fitopatógenos (que causam doenças em plantas) é meramente didática. Porém, a relação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira é bem mais 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. Desse modo, 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 (Figura 1).

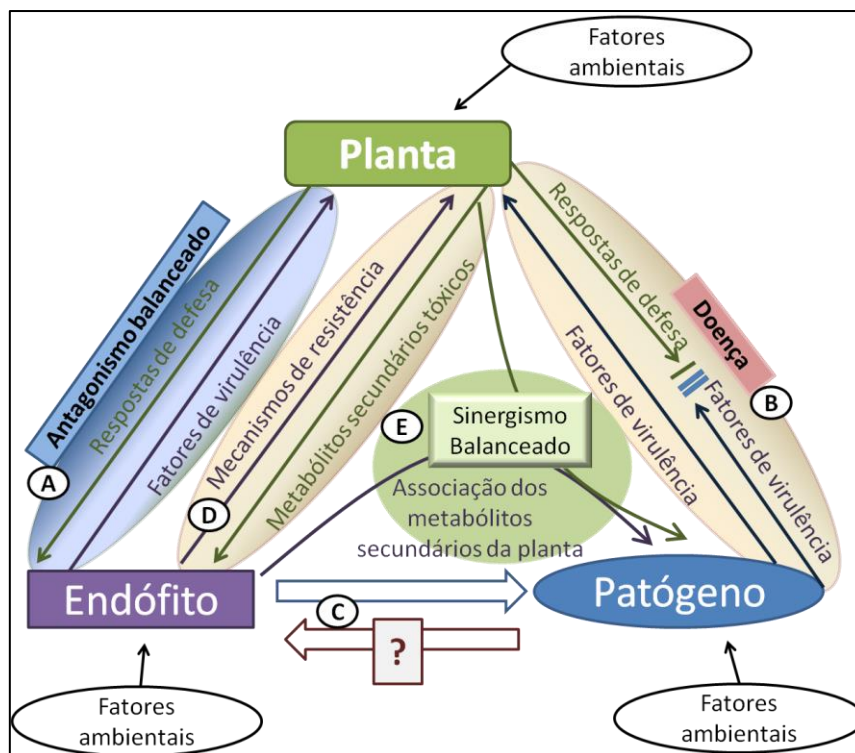


Figura 1 - Esquema da interação fungo endofítico/planta hospedeira. (A) Hipótese do antagonismo balanceado. (B) Condição de doença causada por fatores de virulência do fungo. (C) Reciprocidade endófito – patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que o fenômeno mostrado pode não ser universal. (D) Estratégia de sobrevivência do endófito. (E) Equilíbrio sinérgico. (KUSARI et al., 2012).

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 que se acredita existir (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 reservatório promissor 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; generalistas (que são encontrados em abundância e em diferentes espécies de plantas) e os 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 baseados em técnicas moleculares, como por exemplo, eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE), permitindo um avanço no conhecimento das unidades taxonômicas e identificação exata de morfotipos incapazes de produzir estruturas de reprodução e fungos não cultiváveis, o que vem permitindo expandir a profundidade da diversidade das comunidades de fungos endofíticos (ARNOLD et. al., 2007; TEJESVI et. al., 2011).

Diferentes estudos de taxonomia de fungos endofíticos vêm sendo realizados por meio do sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) 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). 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 sequencias 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 α), Histona (Hist H3), Beta-Tubulina (β -Tub) e Calmodulina (Calm)] ou até mesmo uma região de elevado polimorfismo, como a subunidade menor mitocondrial do rDNA.

Um estudo realizado por Wenzel et al. (2010) determinou a diversidade de fungos endofíticos associados a folhas de *Luehea divaricata*, uma planta medicinal encontrada em todo território brasileiro, conhecida por suas propriedades antirreumáticas, antitumoral, combate a diarreia e leucorréia. Neste trabalho foram isolados 127 fungos que foram agrupados em 22 táxons distintos. Os gêneros encontrados mais frequentemente foram *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Guignardia*, *Phoma* e *Phomopsis*.

Tejesvi et al. (2011) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos associados a folhas de *Rhododendron tomentosum*, um pequeno arbusto amplamente encontrado na região da Finlândia tradicionalmente utilizada no tratamento de infecções. Os autores obtiveram 87 isolados de fungos endofíticos. Os táxons mais frequentemente isolados foram: *Penicillium raciborskii*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium* sp., *Sphaeriothyrium filicinum*, *Penicillium namyslowskii*, *Sordaria fimicola*, *Pleosporales* sp., *Penicillium canescens*, *Arthrimum phaeospermum*, *Lecythophora* sp. e *Sordaria humana*.

No estudo realizado por Park et al. (2012), no qual os autores exploraram a diversidade de fungos endofíticos associados a diferentes tecidos de *Panax ginseng*, planta comumente utilizada na medicina popular devido a sua ação antitumoral, antidiabética, antioxidante e redutora do colesterol, foram obtidos 127 fungos e agrupados

em 27 táxons. Os gêneros *Phoma*, *Collectotrichum*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Entrophospora* e *Xlyaria* foram os grupos encontrados em maior frequência.

Garcia et al. (2012) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos associados a folhas de *Sapindus saponaria* L., planta amplamente utilizada na medicina popular devido a sua ação ansiolítica e adstringente. Um total de 102 isolados foram obtidos e agrupados em 13 táxons distintos. Os grupos encontrados com maior frequência foram: *Cochliobolus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Diaporthe* e *Phoma*.

Diversos 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).

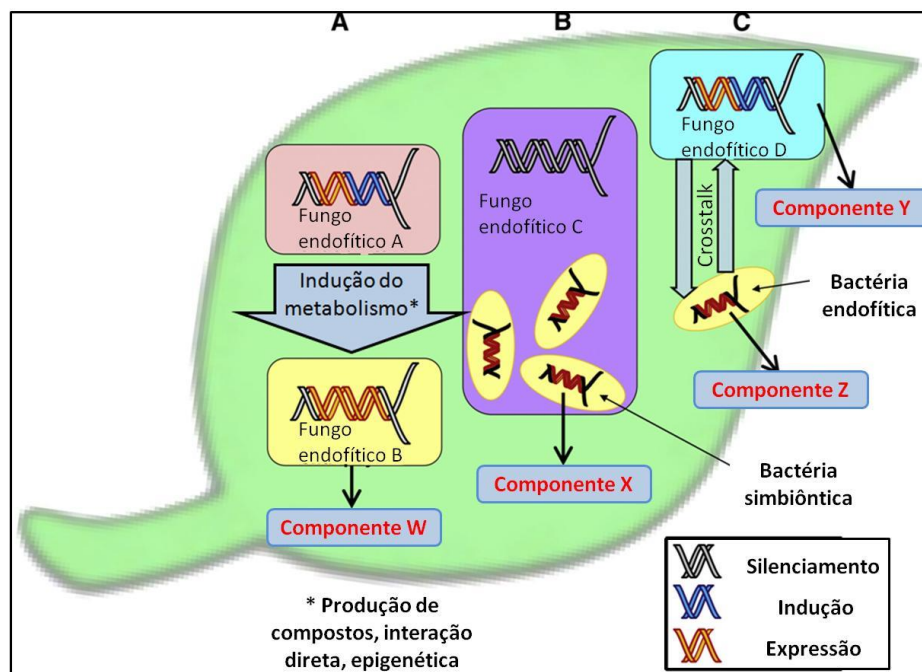


Figura 2 – Representação esquemática de interação interespecífica endófito – endófito. (A) Interação fungo – fungo. (B) Interação fungo – bactéria endossimbionte. (C) Interação fungo – bactéria (KUSARI et al., 2012).

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 endófitos 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 endófitos podem ser considerados

uma fonte promissora de metabólitos bioativos, uma vez que dentre os 20 medicamentos mais comumente descritos seis são de origem fúngica (SCHULZ et al., 2002; 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 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 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 alguns casos, superior a 30% (HUANG et al., 2001; PELÁEZ, 2006; 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 direcionada pelo desenvolvimento de resistência em infecções causadas por micro-organismos, doenças como AIDS e outros fatores que enfraquecem o sistema imune, como câncer e transplantes de órgãos. De acordo com Strobel e colaboradores (2004), ao selecionar as plantas para realizar o isolamento e identificação dos micro-organismos endofíticos algumas estratégias tem sido empregadas, tais como:

- (1) a escolha de plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns;
- (2) 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;
- (3) plantas endêmicas de determinadas regiões que apresentam longevidade incomum;
- (4) plantas cujo desenvolvimento se dá em áreas de grande biodiversidade, tal como em florestas temperadas e tropicais (STROBEL, 2003).

De acordo com Arnold e colaboradores (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 esta relacionada à produção de Podofilotoxina (PDT). Yang et al. (2003) relataram pela primeira vez 6 fungos endofíticos obtidos a partir de *Sinopodophyllum hexandrum* com capacidade de produzir Podofilotoxina e seus análogos. Entre as moléculas bioativas produzidas a partir de fungos endofíticos destacam-se:

- **Criptocandina A** (Figura 3a): substância de caráter lipopeptídico isolado de *Cryptosporiopsis quercina* associado à planta medicinal *Tripterigeum wilfordii* (*Celastraceae*). Este metabólito demonstrou alta atividade antifúngica contra alguns importantes patógenos humanos como *Lodderomyces albicans* e *Trichophyton* spp. (STROBEL & DAISY, 2003). Criptocandina é também ativo contra fungos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (STROBEL et al., 2004).
- **Taxol** (Figura 3b): primeira droga antitumoral a alcançar um mercado mundial de bilhões de dólares, encontrado inicialmente em pequenas quantidades na casca de árvores do gênero *Taxus*, de crescimento lento na região do noroeste do Pacífico (TAN & ZOU, 2001; STROBEL, 2003; GUNATILAKA, 2005; STROBEL, 2006). Posteriormente descobriu-se que o fungo endofítico *T. andreanae* isolado do vegetal citado produz o diterpeno paclitaxel.
- **Pestalosídeo** (Figura 3c): beta-glicosídeo aromático produzido por *P. microspora* isolado de *Torreya taxifolia* (*Cephalotaxaceae*), que possui atividade antifúngica (TAN & ZOU, 2001; STROBEL et al., 2004).
- **Substâncias L-783,281** (Figura 3d): quinonas obtidas do fungos *Pseudomassaria* sp. isolado de uma planta coletada na floresta tropical africana, possuem capacidade de mimetizar a ação da insulina (ZHANG, 1999).
- **Pestacina e Isopestacina** (Figura 3e, f): obtidos de *P. microspora* isolado da planta *Terminalia morobensis* (*Combretaceae*), ambos exibem atividade antimicrobiana e antioxidante (STROBEL & DAISY, 2003).

- **Altenusina** (Figura 3g): metabólito obtido a partir extrato orgânico de cultura do fungo endofítico *Alternaria* sp. UFMGCB 55, o qual foi isolado da planta *Trixis vauthieri* (*Asteraceae*), apresenta atividade inibitória sobre *Trypanosoma cruzi*. Este fungo foi capaz de inibir a atividade da enzima TryR com um valor de IC₅₀ de 4,3 mM (COTA et al., 2008).
- **Cochlioquinona A e Isocochlioquinana A** (Figura 3h, i): metabólitos obtidos a partir do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. UFMGCB 555, isolado da planta *Piptadenia adiantoides* (*Fabaceae*), exibem atividade contra *Leishmania amazonensis*, com valor de IC₅₀ de 1,7 µM e 4,1 µM, respectivamente (CAMPOS et al., 2008).
- **Citrinin** (Figura 3j): composto obtido a partir do fungo endofítico *Penicillium janthinellum*, isolado do fruto da planta *Melia azedarach* (*Meliaceae*), apresenta inibição de 100% de *Leishmania mexicana* na concentração de 40 µg/mL (MARINHO et al., 2005).

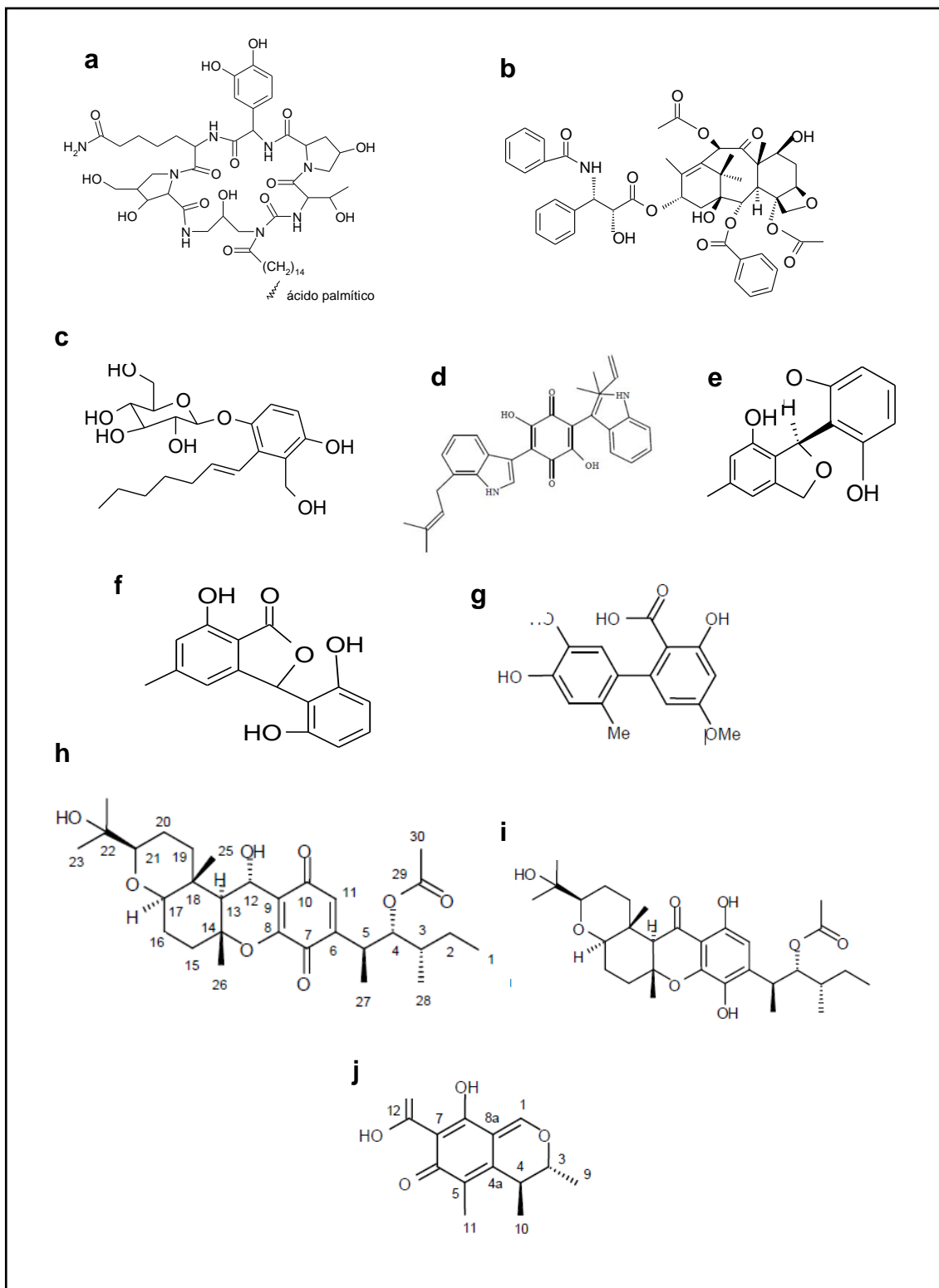


Figura 3 - Moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos. (a) Criptocandina A, (b) Taxol, (c) Pestalósídeo, (d) Substâncias L-783,281, (e) Pestacina, (f) Isopestacina, (g) Altenusin, (h) Cochlioquinona A , (i) Isocochlioquinana A, (j) Citrinin.

Fungos endofíticos representam uma fonte promissora de metabólitos biologicamente ativos com possíveis aplicações medicinais e agrícolas. 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 na medicina e agricultura (ALY et al., 2011).

2.5 *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba)

Há vários séculos inúmeras plantas vêm sendo utilizadas pelo homem para o tratamento de doenças. Os produtos naturais, principalmente aqueles obtidos a partir de plantas que possuem histórico etnobotânico, apresentam-se como uma importante fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos (SANTO, 2010). Tais plantas produzem substâncias conhecidas por suas propriedades terapêuticas, tornando-as promissoras para estudos de bioprospecção (JOHANN, 2007). A espécie *Carapa guianensis* Aubl., uma angiosperma pertencente à família *Meliaceae*, popularmente conhecida como Andiroba, é amplamente utilizada na medicina popular devido à sua ação anti-inflamatória, anti-reumática (HAMMER, 1993), inseticida (MORTON, 1981), no tratamento de doenças de pele, ferimentos e escoriações (MORTON, 1981). *Carapa guianensis* é uma árvore de 30-55 m de altura, de copa globosa, com tronco de 50-120 cm de diâmetro (Figura 4a), nativa de toda a região Amazônica, presente em várzeas secas e alagadiças, bem como no Norte do Brasil, do Pará até o Sul da Bahia (LORENZI & MATOS, 2008). Apresenta folhas composta pinadas de 80-120 cm de comprimento, com 12-18 folíolos (Figura 4b). Possui flores discretas, pequenas, de cor creme. Os frutos são cápsulas lenhosas, globoso-anguladas, deiscentes, de 8-14 cm de diâmetro, contendo de 5-10 sementes (Figura 4c) (LORENZI, 2002).

O óleo da andiroba, produzido a partir das sementes, é comercializado no Brasil e, além do uso medicinal, faz parte da composição de produtos para cabelos. É também utilizado puro ou em mistura com outros produtos naturais de forma tópica para o tratamento de ferimentos e escoriações ou em massagens terapêuticas por atletas e praticante de lutas marciais (PINTO, 1956; MORTON, 1981; LORENZI & MATOS, 2008). O óleo da andiroba é um dos produtos medicinais mais utilizados da floresta amazônica. Na medicina popular é utilizado para aliviar contusões, edemas, reumatismo, para auxiliar na cicatrização e recuperar a pele. Além do óleo das sementes, as folhas e as cascas também são empregadas na medicina caseira, tanto pelos índios quanto pela

população não-indígena local (LORENZI & MATOS, 2008). O chá das folhas é utilizado como medicamento para combater infecções e no tratamento de doenças da pele (TONINI & KAMINSKI, 2009). Todas as partes da árvore, incluindo o óleo, possuem um sabor bastante amargo, atribuído a um grupo químico triterpênico, chamado limonóides (andirobina, gedunina e epoxiazadiradione) (DUKE, 1985), cujas estruturas são muito similares aos metabólitos antimaláricos, encontrados em outras plantas tropicais da família *Meliaceae*. Outras substâncias encontradas na andiroba são: ácido hexadecenóico, oleico, esteárico, mirístico e em menor quantidade, os ácidos palmítico, palmitoléico, araquídico e linoléico (ROY, 2006; COSTA-SILVA et al., 2007 e 2008). O óleo possui um grande potencial medicinal, repelente e pesticida relatado na literatura devido aos limonóides, anteriormente citados, que perfazem de 2-5% de sua composição total (BOUFLEUER, 2004; KLIMAS, et al., 2007).

Alguns estudos demonstram a eficácia do extrato vegetal de *C. guianensis* no controle de pragas tais como: *Boophilus microplus* e *Aedes aegypti* (MIOT et al., 2004; MENDONCA et al., 2005; FREIRE et al., 2006; FARIAS et al., 2007). Farias e colaboradores (2007), fazendo o uso de teste carrapaticida, por meio de imersão de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (carrapato do boi) em soluções do óleo de andiroba, observaram morte das fêmeas ingurgitadas e redução da postura de ovos, demonstrando uma eficácia de 100% em todas as amostras testadas. Miot e colaboradores (2004) observaram em seu estudo com voluntários que tiveram seus antebraços recobertos com óleo de andiroba puro, que o mesmo apresentou efeito de repelência contra fêmeas saudáveis do mosquito *Aedes aegypti*. Apesar de sua eficácia constatada neste estudo, os efeitos do óleo foram mais discretos comparando-se com o grande potencial repelente do N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) que, ainda hoje, é o repelente mais efetivo encontrado no mercado. Estudo realizado com cobaias por Penido (2006) demonstrou que tetranortriterpenóides (TNTP) isolados a partir do óleo extraído da semente de *C. guianensis* apresentam notável atividade anti-inflamatória inibindo inflamações nas articulações, corroborando com o uso popular da espécie no tratamento de artrites. Análises da atividade antibacteriana, utilizando extratos hidroalcoólicos da casca da *C. guianensis* foram ativos contra *Proteus vulgaris* (NAKANISHI et al., 1965). Estudos da atividade antifúngica, realizado por Waterman (1946), também utilizando a casca do tronco, verificaram atividade contra *Lenzites trabea* e *Poria microspora*.

Com relação aos extratos produzidos a partir das folhas de *C. guianensis*, poucos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar suas possíveis atividades biológicas. Da mesma maneira, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de verificar a diversidade de fungos endofíticos e sua utilização como fontes de metabólitos bioativos. Cannon & Simmons (2002), estudaram a diversidade de fungos endofíticos associados a 12 espécies de árvores da reserva florestal Iwokrama na Guiana e obtiveram a partir de tecidos foliares de *C. guianensis*, 30 isolados fúngicos. Entre estes, foram identificados os seguintes táxons: *Beltrania* sp., *Beltrania rhombica*, *Colletotrichum orbiculare*, *Ellisiopsis*, *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp. e *Xylariaceae*.

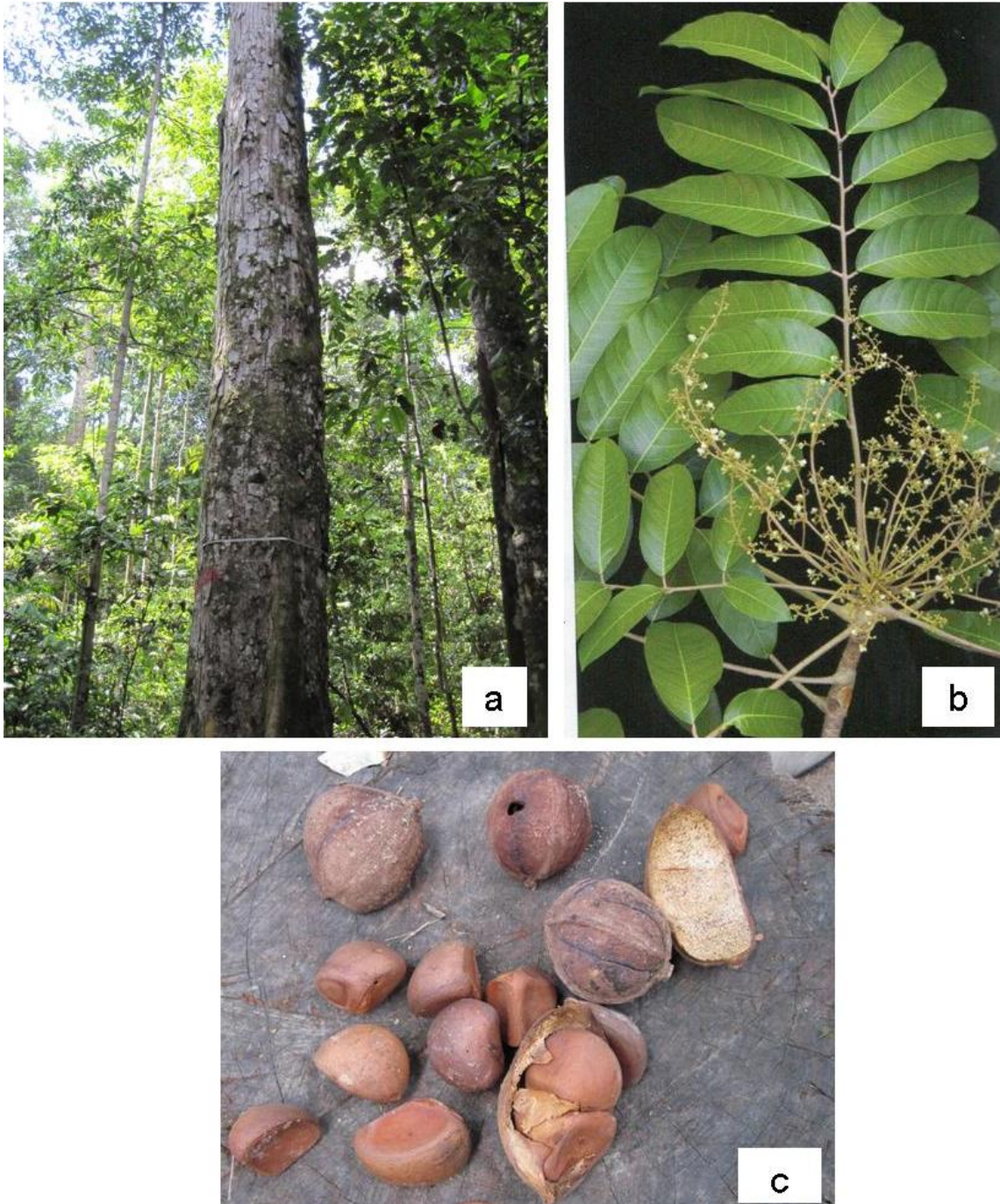


Figura 4 - *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*): árvore (a), folhas (b) e sementes(c).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados à *Carapa guianensis* Aubl. e avaliá-la como fonte de metabólitos bioativos.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar e isolar fungos endofíticos de amostras de folhas de diferentes espécimes de *Carapa guianensis*;
- Depositar todos os isolados de fungos endofíticos obtidos na Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Identificar os fungos obtidos utilizando técnicas de taxonomia moleculares;
- Avaliar a diversidade e riqueza da comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis*;
- Preparar extratos brutos a partir das culturas fúngicas e de suas plantas hospedeiras;
- Verificar a atividade antimicrobiana e antiparasitária dos extratos fúngicos e vegetais obtidos contra:
 - *Escherichia coli*,
 - *Pseudomonas aeruginosa*,
 - *Staphylococcus aureus*,
 - *Candida albicans*,
 - *Pichia kurdiavzevii* (*Candida krusei*),
 - *Cladosporium sphaerosperum*;
 - Formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Comparar as atividades biológicas dos fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras.

4 Material e Métodos

4.1 Área de coleta

As amostras de *C. guianensis* foram coletadas na área de preservação particular da EMBRAPA ($0^{\circ}57'02''\text{N}$, $59^{\circ}54'41''\text{W}$) localizada no município de São João da Baliza, Roraima, Brasil. O município de São João da Baliza localiza-se a 320 km de Boa Vista no sudeste do estado de Roraima (Figura 5). O clima na região é classificado como Ami (tropical chuvoso com pequeno período de seca) com precipitação média anual entre 1700-2000 mm. A temperatura média anual é de 27°C (TONNI, 2009). O município possui cobertura vegetal com características de florestas ombrófilas densa (Portal Roraima, www.portal.rr.gov.br).

O acesso a esta área foi realizado respeitando-se as legislações Estaduais e Federais de acesso à biodiversidade. Todos os espécimes vegetais foram identificados a partir de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, e depositados no herbário da Universidade Federal de Roraima.

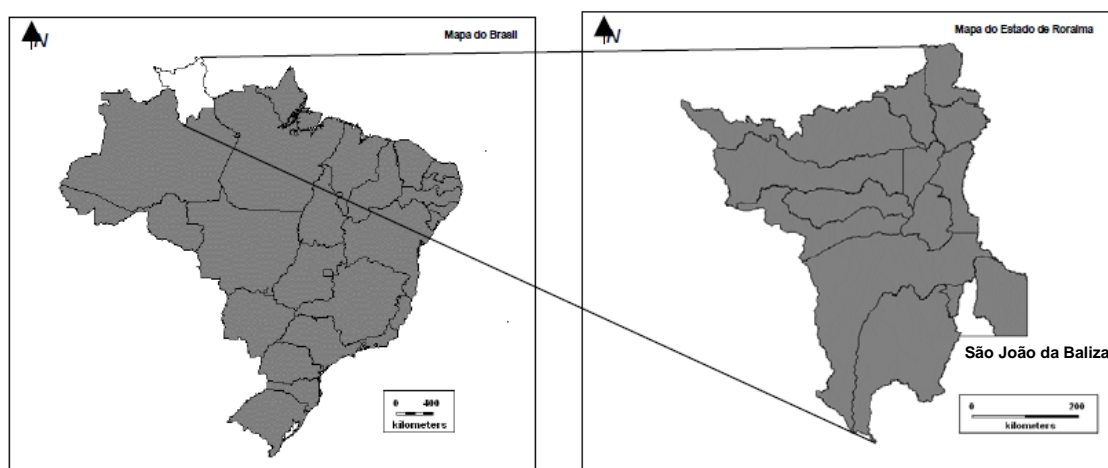


Figura 5 - Localização da área de coleta – Município de São João da Baliza, Roraima, Brasil.

4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Foram coletadas folhas de 30 indivíduos aparentemente saudáveis de *C. guianensis*. A localização dos indivíduos foi determinada por coordenadas geográficas obtidas pelo *Global Positioning System* (GPS). Uma exsicata representativa do material vegetal foi depositada no herbário da UFRR. Os indivíduos que tiveram suas exsicatas depositadas foram 32, 16, 78, 142 e 146 e receberam os números de tombamento 2961, 2964, 2962, 2963 e 2960, respectivamente. As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas no mesmo dia. Foram utilizadas três folhas de cada indivíduo, sendo que dez fragmentos de cada folha foram inoculados para isolamento dos fungos endofíticos.

Inicialmente ao processo de desinfestação, as folhas coletadas foram limpas superficialmente com detergente neutro e enxaguadas abundantemente com água destilada esterilizada. Em seguida, fragmentos foram retirados das folhas com auxílio de tesoura e pinças previamente esterilizadas. Fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro 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) (COLLADO et al., 1996). Após este processo de desinfestação superficial, 5 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. Cinco fragmentos também foram transferidos para placas de Petri contendo Agar Extrato de Malte e Extrato de Levedura (extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1%, ágar 2%) acrescido de 100 mg/mL de cloranfenicol. Fatores como meio de cultura, pH, temperatura e umidade podem influenciar na frequência de leveduras endofíticas isoladas. O meio de cultura Extrato de Malte e Extrato de Levedura foi utilizado com objetivo tentar amostrar a comunidade de leveduras endofíticas associadas à *C. guianensis*. 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 (COLLADO et al., 1996). 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 isolados

As colônias dos isolados de fungos filamentosos obtidos a partir das folhas da *C. guianensis* 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)₅. 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 (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA. As identificações dos grupos foram posteriormente confirmadas por meio do sequenciamento parcial do gene da β -Tubulina e/ou do Fator de alongação 1 alpha (EF-1 α). A escolha da região a ser sequenciada foi determinada de acordo com os gêneros encontrados por meio do sequenciamento da região ITS.

4.3.1 Extração do DNA Total

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa e colaboradores (2009). Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em BDA e então fragmentos de micélio foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 μ L 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 dodecil sulfato 1%) e deixado a -20 °C por aproximadamente 10 minutos. O micélio foi triturado com auxílio de um pistilo e foram acrescentados 5 μ L de Proteinase K (50 μ g/mL). Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60 °C em banho maria. Em seguida, foram adicionados 162 μ L de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foram acrescentados 570 μ L 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 1,5mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M. O tubo foi vertido para homogeneização, 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. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por 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.

4.3.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

O iniciador (GTG)₅ 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/µL), 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ 10 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 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 PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 55°C e 90 segundos 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).

4.3.3 Amplificação da região ITS

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rDNA, conforme descrito por White *et al.* (1990). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50 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 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1,0 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 μmol^{-1} (MWG Biotech), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μL de MgCl_2 25mM, 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 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 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 fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.3.4 Amplificação parcial do gene da β -tubulina

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) foram utilizados para amplificação parcial do gene da β -tubulina, conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 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 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1,0 μL de cada iniciador BT2a e BT2b 10 μmol^{-1} (MWG Biotech), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μL de MgCl_2 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 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).

4.3.5 Amplificação parcial do Fator de Elongação – 1 alpha

Os iniciadores EF1-728F (CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) e EF1-986R (TACTTGAAGGAACCCTTACC) foram utilizados para amplificação parcial do EF-1 α conforme descrito por Carbone & Kohn (1999). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador EF1-728F e EF1-986R 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ 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 96°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 95°C, 45 segundos de anelamento a 54°C e 45 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 0,5M, 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).

4.3.6 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 45 μ L, foram adicionados 11,25 μ L de EDTA 125 mM e 135 μ L 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 μ L 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 μ L de água para injeção esterilizada. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.3.7 Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000, no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão gênica (NAGE). Para as reações de sequenciamento foram utilizados 80-120 ng do DNA purificado e os reagentes presentes no Kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 μ L contendo 4 μ L do pré-mix (presente no kit de sequenciamento) e 1 μ L do iniciador (5 μ mol-1), e completa-se o volume final com água para injeção esterilizada. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95°C por 25 minutos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50°C e 3 minutos de extensão a 60°C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 μ L de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada para que as gotas do acetato de amônio se misturem à reação. Em seguida foram adicionados 28 μ L de etanol absoluto (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.

Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado virando-se a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante 1 segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol residual.

O DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuspendido em 10 μ L de “tampão de corrida” (presente no kit de sequenciamento). A placa foi então submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, centrifugada por 1 segundo a 900 rpm e armazenada a 4°C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACETM 1000.

4.3.8 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com sequências depositadas GenBank, 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 e disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os isolados que apresentaram sequência com identidade \geq a 99% em relação às sequências de fungos depositadas no GenBank, foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para as sequências com identidade igual a 98% o gênero e espécies foram aceitos, mas o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi usado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade entre 95 e 97% somente o gênero foi aceito, para sequências com identidade $<$ 95% os isolados foram identificados como espécies desconhecidas ou identificados em família, classe, ordem (GONÇALVES et al., 2012).

As sequências dos táxons referentes à ordem, família, gênero ou outros níveis hierárquicos, que apresentaram sequências com identidade \leq 97%, foram utilizadas na construção de árvores filogenéticas, submetidas ao alinhamento dos fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA, β -Tubulina e/ou Fator de Elongação (EF-1 α). A análise filogenética foi conduzida utilizando o programa MEGA (*Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 5 (TAMURA et al., 2011). Os táxons que apresentarem sequências menores que 300 pb foram considerados como não identificados. A análise de bootstrap foi com 1.000 repetições utilizando os softwares incluídos no MEGA 5. Sequências de espécies de referências depositadas no GenBank foram adicionadas às análises filogenéticas. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia fúngica foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>) e Index Fungorum (<http://www.Índexfungorum.org/>).

4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância

A abundância de cada táxon foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: porcentagem de abundância do táxon A = número de isolados do táxon A x 100/soma de isolados de todos os táxons. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência

de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades fúngicas na área de coleta.

Para avaliar a diversidade de espécies no local de coleta, foram utilizados os seguintes índices: (a) Fisher- α (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de diversidade de Fisher- α é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória onde, comumente algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena (FISHER et al., 1943). Este índice é calculado pela fórmula $S = a \cdot \ln(1+n/a)$ onde, S é o número de táxons presente na amostra, n é o número de indivíduos e a representa o índice de Fisher- α . O Índice de Margalef é uma medida utilizada em ecologia para estimar a riqueza de espécies de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por $S = (n-1)/\ln(N)$, onde n é o número de táxons encontrados e N representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de S maior a riqueza de espécies do local amostrado. O índice de Simpson é muitas vezes utilizado para quantificar a biodiversidade de um ecossistema. Ele leva em conta o número de espécies presentes no local, bem como a abundância de cada espécie. Trata-se de um índice de dominância que mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson é dado pela fórmula $D = \sum(n/N)^2$, onde n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de D pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o máximo de diversidade e 1 o mínimo de diversidade. Sendo assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de Mao Tau, o qual interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Este cálculo permite uma comparação estatística direta entre a riqueza e os conjuntos de dados (COLWELL et al. 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (RYAN et al., 1995).

4.5 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos

4.5.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C com umidade de 70-80%. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL. Para obtenção dos extratos brutos foi adicionado aos tubos 35 mL de etanol P.A. (Vetec). Os tubos foram incubados a 10°C e após 48 horas, o sobrenadante (etanol) de cada tubo foi filtrado com auxílio de papel filtro e transferido para frascos de vidro e para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (SANTIAGO et al., 2012).

4.5.2 Folhas de *Carapa guianensis*

Folhas de *C. guianensis* foram colocadas em tubos cônicos de 50 mL com 35 mL de etanol PA (Vetec). Os tubos foram mantidos ao abrigo da luz e, após 15 dias, o etanol (sobrenadante) de cada tubo foi filtrado e transferido para frascos de vidro e tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Todos os extratos brutos obtidos, dos fungos filamentosos e dos vegetais, foram secos em centrífuga a vácuo *Speed Vac* (Savant) com temperatura inferior a 35°C, solubilizados em dimetilsufóxido (DMSO), a uma concentração de 20 e 100 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.

4.6 Ensaios Biológicos

4.6.1 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 kurdiavzevii* (*Candida krusei*) ATCC 6258 e *Cladosporium sphaerosperum* CCT 1740.

4.6.1.1 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 10⁸ 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 10⁶ 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.

4.6.1.2 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 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) 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 Tetrazólio (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, 500mL q.s.p. Isopropanol PA, pH 5,4), e então as placas foram 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 60%. Estes foram testados para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	EX1	EX9	EX1	EX25	EX3	EX41	EX49	EX57	EX65	EX73	DMSO
B	BL	EX2	EX1	EX1	EX26	EX3	EX42	EX50	EX58	EX66	EX74	DMSO
C	BL	EX3	EX1	EX1	EX27	EX3	EX43	EX51	EX59	EX67	EX75	DMSO
D	BL	EX4	EX1	EX2	EX28	EX3	EX44	EX52	EX60	EX68	EX76	DMSO
E	CN	EX5	EX1	EX2	EX29	EX3	EX45	EX53	EX61	EX69	EX77	CP
F	CN	EX6	EX1	EX2	EX30	EX3	EX46	EX54	EX62	EX70	EX78	CP
G	CN	EX7	EX1	EX2	EX31	EX3	EX47	EX55	EX63	EX71	EX79	CP
H	CN	EX8	EX1	EX2	EX32	EX4	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 6 - Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios realizados.

4.6.2 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 foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22) para 15% de transmitância a 620nm, o que corresponde a 10^6 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 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) 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 absorvância de 570 nm. A

absorbância dos poços testes foi comparada com a absorbância do controle de micro-organismo. Arbitariamente foram considerados ativos os extratos com valor de inibição maior ou igual que 60%. Estes foram testados para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.6.3 Cálculo da Concentração Inibitória Mínima

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos 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. 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 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 2 até a coluna 11. Ao final, o volume de cada poço foi 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 7 - Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada nos ensaios de CIM realizados.

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 Tetrazólio (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 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 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). Todos os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos por Carvalho et al. (2012).

4.6.4 Re-cultivo, extração e certificação da atividade antimicrobiana

Os extratos que mantiveram atividade no teste do CIM foram novamente produzidos para avaliar a manutenção da atividade após o recultivo. Para tanto, o fungo bioativo selecionado foi crescido em placas de Petri contendo meio BDA a 25°C com umidade de 70-80%. 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. Simultaneamente foram produzidos extratos etanólicos, como descrito anteriormente, para comparação entre os solventes.

4.6.5 Ensaio com a forma tripomastigota de *Trypanossoma cruzi*

Os extratos foram testados por meio do ensaio colorimétrico desenvolvido por Buckner et al. (1996), com modificações (OLIVEIRA et al., 2006). Este ensaio utiliza uma linhagem de *Trypanossoma cruzi* (Tulahuen) e extratos fúngicos diluídos numa concentração de 20 mg/mL. A linhagem de *T. cruzi* é transformada para expressar beta-galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o clorophenol red beta-D-galactopyranoside (CPRG) é utilizado como substrato. Para a triagem dos extratos, 4.000 células L929 por poço foram semeadas em placas de 96 poços, seguido de incubação *overnight* em estufa a 37°C para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 parasitas/célula durante 2 horas. Após, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído e a placa novamente incubada.

Como controles foram utilizadas células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 mg/mL (3,81 mM) (controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1 % (controle negativo). Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução da absorbância dos poços experimentais em comparação com a absorbância dos poços com células infectadas não tratadas. Os extratos que mostrarem atividade igual ou maior que 70% foram submetidos ao ensaio descrito acima para determinação da concentração do extrato necessária para inibir o desenvolvimento de aproximadamente 50% dos parasitos (IC₅₀). Para isso, os extratos foram testados em concentrações decrescentes, a partir de 20 mg/ mL em diluições 1:3 (solução estoque do extrato: meio) até se chegar ao IC₅₀. Os ensaios de triagem foram realizados em duplicata e os ensaios de determinação do IC₅₀ em triplicata.

4.7 Processos fermentativos do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 para determinação das condições ótimas de cultivo e obtenção de metabólitos bioativos

Com objetivo de melhorar a produção de metabólitos bioativos os parâmetros do processo fermentativo como meio de cultivo, temperatura e tempo de crescimento foram variados. Quatro meios de cultura distintos foram selecionados para o teste:

1. Ágar água/glicose - AAG (glicose 0,5%, ágar 2%);
2. Ágar água/glicose/extrato de levedura - AAGL (glicose 0,5%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%);
3. Ágar Batata Dextrosado (BDA/Difco);

4. BDA/glicose – BDAG (BDA suplementado com 0,5% de glicose).

As placas foram incubadas nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35°C por 15, 30, 45 e 60 dias. Após o período de crescimento a extração dos metabólitos foi realizada com DCM como descrito no item 4.6.4. Para avaliar a influências de tais parâmetros no espectro de ação dos extratos, os mesmos foram submetidos à triagem contra os alvos anteriormente testados e os extratos com atividade superior a 60% tiveram sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada.

5 Resultados e discussão

5.1 Coleta e isolamento dos fungos endofíticos

A partir da coleta realizada foram processados 10 fragmentos de 3 folhas de cada um dos 30 indivíduos de *C. guianensis* amostrados (30 fragmentos por indivíduo, totalizando 900 fragmentos foliares), dos quais 450 foram inoculados em meio de cultura BDA e 450 em YM. A metodologia utilizada para a desinfestação superficial das folhas, bem como a técnica de isolamento dos fungos aplicada no presente trabalho, tem sido comumente utilizada em diversos estudos e, desta forma, considerada um método tradicional e eficiente para detecção e quantificação de fungos endofíticos (TAN & ZOU, 2001; ORDUÑA et al., 2011; GONZALEZ et al., 2011, VIEIRA et al., 2012; CARVALHO et al., 2012). Além disso, a técnica de desinfestação se demonstrou eficiente para eliminação dos micro-organismos epifíticos, permitindo assim o isolamento dos fungos no estado endofítico associados às folhas de *C. guianensis*.

A partir dos 900 fragmentos plaqueados foram obtidos 209 fungos filamentosos. Destes, 115 (55%) foram provenientes do meio de cultura YM e 94 (45%) do meio BDA. Até o momento, poucos trabalhos fazem uma correlação entre os meios de cultura utilizados para o isolamento de fungos endofíticos e sua frequência de isolamento. Meios de cultura como YM, Agar Extrato de Malte, Agar Sabouraud e BDA, aparentemente, apresentam taxas de isolamento de fungos endofíticos similares (SIQUEIRA, et al., 2011; SUN, et al., 2011; TEJESVI et al., 2011).

Apesar da utilização do meio YM, que propícia o crescimento de leveduras endofíticas, no presente trabalho não foi obtido nenhum táxon deste grupo microbiano. A não obtenção de leveduras endofíticas pode estar associado ao rápido crescimento que os fungos filamentosos apresentam ao emergirem dos fragmentos de folhas, desta forma, desfavorecendo o crescimento e isolamento das leveduras (VIEIRA et al. 2012; CARVALHO et al. 2012) ou à sua baixa frequência na comunidade de endófitos associados à *C. guianensis*.

A frequência de isolamento dos fungos endofíticos a partir de cada indivíduo de *C. guianensis* variou de 0 a 6,22% (Figura 8). Em alguns exemplares de *C. guianensis* não foram obtidos fungos. A detecção de fungos endofíticos baseia-se na sua capacidade de crescer fora dos tecidos vegetais (PROMPUTTHA et al., 2007). Portanto, fungos que

possuem crescimento lento em meios de cultura convencionais ou aqueles que são considerados não cultiváveis podem não ter sido detectados no presente estudo.

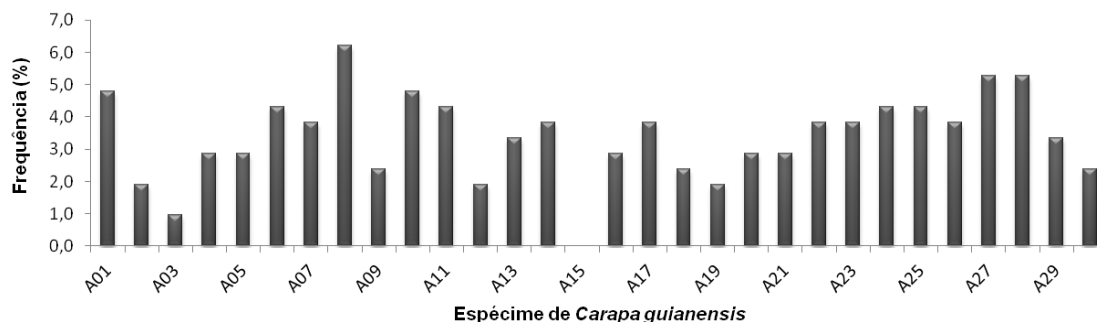


Figura 8 – Frequência de isolamento dos fungos filamentosos obtidos a partir de cada espécime de *carapa guianensis*. A: Espécime de *Carapa guianensis* (Andiroba) amostrado.

5.2 Identificação dos fungos endofíticos isolados

Os 209 isolados de fungos obtidos foram inicialmente separados em 39 grupos de acordo com as características macromorfológicas da colônia tais como velocidade de crescimento, cor (frente e verso), textura da superfície e aspecto da borda. Para confirmar o agrupamento morfológico, os isolados dos grupos fúngicos foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR). Após a análise dos perfis moleculares obtidos, os 39 grupos foram reagrupados em 117 grupos moleculares.

Um ou mais isolados de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA. As identificações dos grupos foram posteriormente confirmadas por meio do sequenciamento parcial do gene da β -tubulina e/ou do EF-1 α . O sequenciamento parcial do gene da β -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 do EF-1 α está geralmente presente em cópia única no genoma e codifica a tradução do fator de alongação que controla a velocidade da síntese de proteínas em células eucarióticas (HELGASON et al., 2003). A região do EF-1 α amplificada possui sequências de éxons que são homólogas entre muitos fungos *Ascomycota*, mesmo entre espécies filogeneticamente distantes.

Além disso, a região do EF-1 α também apresenta sequências de íntrons de tamanhos variáveis, as quais são conservadas entre diferentes indivíduos da mesma espécie e codifica um fragmento de 250 a 350 pares de base (CARBONE & KOHN, 1999). Neste estudo, para a análise das sequências obtidas foram levados em consideração critérios tais como tamanho da sequência, percentual de identidade, cobertura da sequência e valor de E.

Dos 117 grupos moleculares obtidos, 15 fungos (12,9%) foram classificados como não identificados, mas representam táxons de fungos endofíticos associados a *C. guianensis*. A não 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., 2009). Em outros casos, não foi possível obter DNA com dosagens suficientes (50 ng/ μ L) 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 foram obtidas 42 unidades taxonômicas distintas (UTD) e todos os táxons identificados foram classificados como pertencentes ao filo *Ascomycota*. A classe *Sordariomycetes* foi predominante e representou 91% dos táxons obtidos. As classes *Dothideomycetes* (6%) e *Eurotiomycetes* (3%) também foram encontradas, porém em menor frequência (Figura 9).

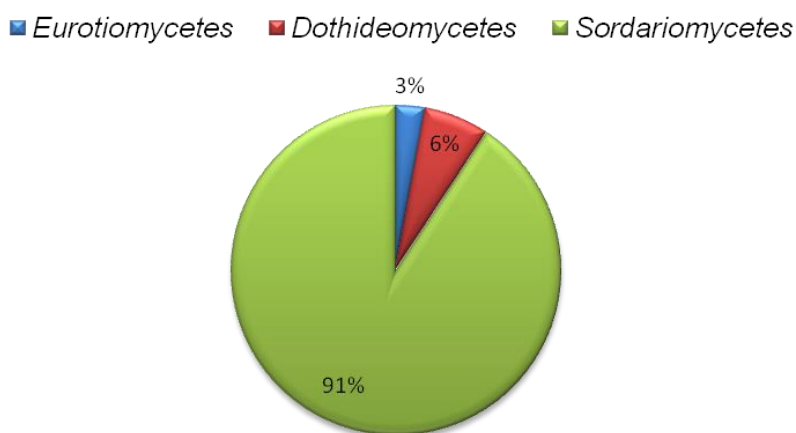


Figura 9 – Porcentagem dos fungos endofíticos classificados em nível de classe associados às folhas de *Carapa guianensis*.

Inseridos na classe *Sordariomycetes* foram encontrados os gêneros *Colletotrichum* (Corda), *Diaporthe* (Nitschke), *Entonaema* (G.W. Martin), *Fusarium* (Link), *Glomerella* (Spauld. & H. Schrenk), *Hypocrea* (Fr.), *Menisporopsis* (S. Hughes), *Pestalotiopsis* (Steyaert), *Phomopsis* [(Sacc.) Sacc.], *Pilidiella* (Petr. & Syd.) e *Xylaria* (Hill ex Schrank). Entre os *Dothideomycetes* foram identificados os gêneros *Botryosphaeria* (Ces. & De Not.), *Endomelanconiopsis* (E.I. Rojas & Samuels) e *Guignardia* (Viala & Ravaz). Os gêneros pertencentes à classe *Eurotiomycetes* foram *Aspergillus* (P. Micheli ex Haller) e *Penicillium* (Link). Diferentes estudos sugerem que os principais grupos de fungos endofíticos pertencem a *Ascomycota* e os gêneros *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Xylaria* são frequentemente obtidos de espécies vegetais presentes em ambientes tropicais e temperados (PROMPUTTHA, 2007; RODRIGUEZ et al., 2009).

5.3 Composição da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas de *Carapa guianensis*

A comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis* foi representada principalmente por *Sordariomycetes*. O gênero *Colletotrichum* foi predominante com 61 (29,18%) isolados. 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*.

No presente trabalho foram obtidos 10 táxons distintitos pertencentes ao complexo *Colletotrichum/Glomerella* (Tabela 1), que foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS e β -tubulina. Entre estes, os táxons UFMGCB 4817, 4827, 4860, 4872, 4884, 4915 e 4991 foram identificados como *Colletotrichum* sp. e os táxons UFMGCB 4933 e 5012 identificados como *Glomerella* sp. Apesar destes táxons terem apresentado similaridade entre 98 e 100% com sequências de espécies depositadas no

GenBank, não foi possível elucidar a qual espécie pertencem, devido a complexidade taxonômica existente dentro deste grupo e também devido aos erros de identificação existentes entre as sequências depositadas como *Colletotrichum* no GenBank. As sequências dos táxons encontradas no presente estudo apresentaram o mesmo percentual de similaridade com 3 ou 4 espécies diferentes de *Colletotrichum* (Figura 10a,b). Sequências de espécies tipo ou referência, depositadas no GenBank, foram utilizadas nas análises filogenéticas com o objetivo de tentar evitar erros de identificação. Entretanto, não foram encontradas sequências de espécies tipo da maior parte espécies de *Colletotrichum* similares aos táxons associados a *C. guianensis* quando alinhando com sequências da região ITS e/ou β -tubulina depositadas no GenBank. No presente estudo, apenas um táxon dentro deste complexo foi identificado em nível de espécie, *Colletotrichum siamense* UFMGCB 5016 apresentou 100% de similaridade apenas com *C. siamense* CBS 130420 (JX010415).

A maioria das espécies encontradas como endofíticas de *C. guianensis* pertence ao complexo *Colletotrichum gloeosporioides*, que compreende 22 espécies. Segundo Weir *et al.* (2012), a identificação da maioria das espécies do complexo *C. gloeosporioides* é incapaz de resolver de forma confiável baseando-se apenas no sequenciamento da região ITS e deve ser realizada baseando-se em uma análise de múltiplos genes, variáveis de acordo com cada táxon.

Espécies de *Colletotrichum* são isoladas de plantas de ambientes tropicais e temperadas. Kurose *et al.* (2011) observaram que 35% dos isolados de *Fallopia japonica* foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Rosa *et al.* (2012) constataram que 16,6% dos isolados fungos endofíticos associados à *Smallanthus sonchifolius* pertencem a este mesmo gênero. Vaz *et al.* (2012) ao avaliarem a composição da comunidade de fungos endofíticos associados à *Eugenia aff. bimarginata*, *Myrciaria floribunda* e *Alchornea castaneifolia* obtiveram 25 isolados do gênero que foram todos identificados como *Colletotrichum gloeosporioides*.

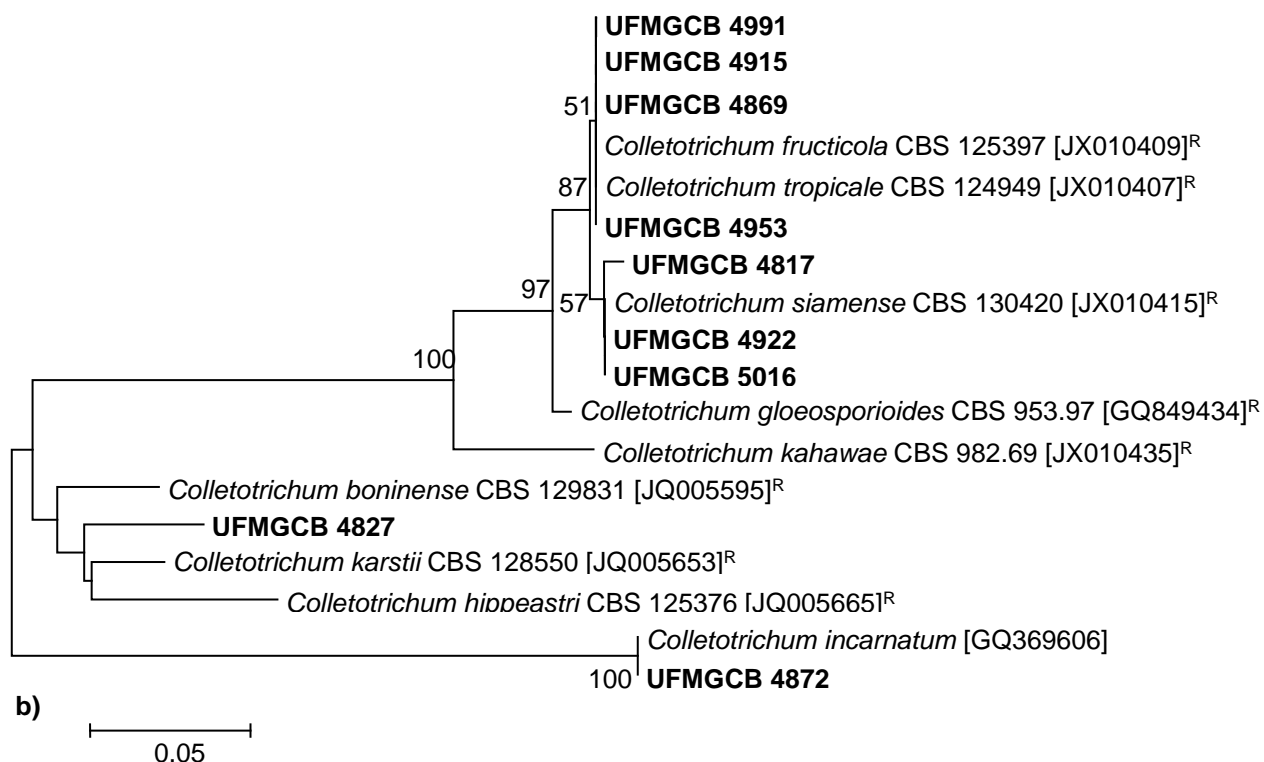
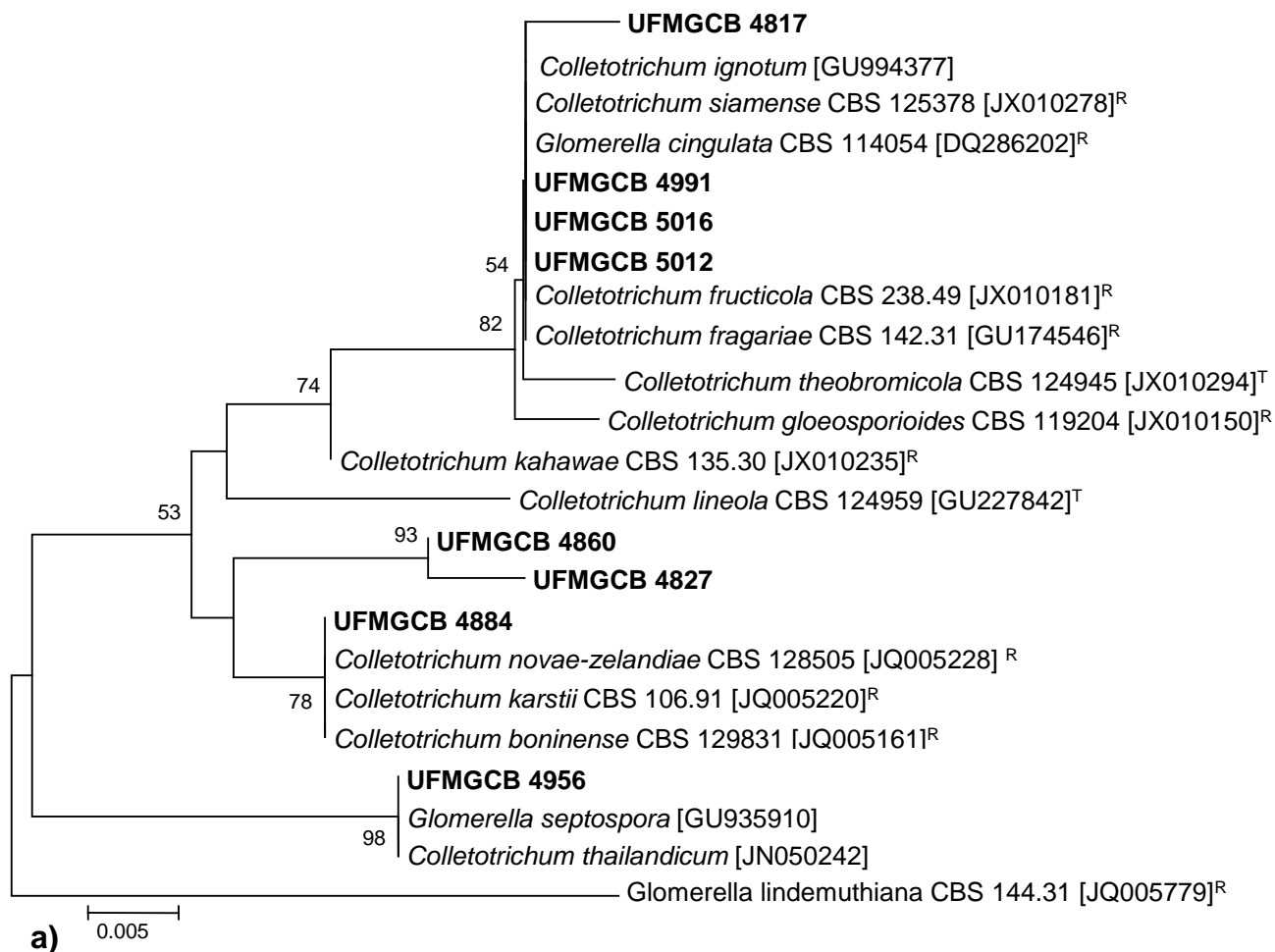


Figura 10 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Colletotrichum* associados à *Carapa guianensis*. **a)** Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. **b)** Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β -Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

O complexo *Diaphorte/Phomopsis*, também pertencente à classe *Sordariomycetes*, foi o grupo mais frequente com 62 (29,6%) isolados obtidos (Tabela 1). Espécies de *Diaphorte* 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).

Tabela 1 - Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *Carapa guianensis*.

Código UFMGCB	Nº de isolados	Sequencia de referência do BLAST [Número de acesso GenBank]	Identidade (%)	Nº de pb	Espécie ou grupo taxonomico proposto
4991 ^{a,b}	33	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [HQ645081]	100	458	<i>Colletotrichum</i> sp. 4
4807 ^{a,b,c}	21	<i>Phomopsis</i> sp. [FJ798595]	99	491	<i>Phomopsis</i> sp. 3
4876 ^{a,b}	12	<i>Pestalotiopsis microspora</i> [AY924287]	100	415	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2
4967 ^{a,b}	10	<i>Diaporthe</i> sp. [FJ799941]	99	420	<i>Diaporthe</i> sp. 1
4806 ^{a,b}	8	<i>Phomopsis</i> sp. [EU002927]	98	463	<i>Phomopsis</i> sp. 2
4992 ^a	7	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> [EU683669]	99	481	<i>E. endophytica</i>
4896 ^{a,b,c}	7	<i>Phomopsis</i> sp. [JN153049]	100	424	<i>Phomopsis</i> sp. 4
4884 ^a	6	<i>Colletotrichum boninense</i> [JF683320]	100	468	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
5016 ^{a,b}	6	<i>Colletotrichum siamense</i> [GQ849443]	100	435	<i>Colletotrichum siamense</i>
4826 ^{a,b,c}	6	<i>Phomopsis</i> sp. [DQ235668]	99	465	<i>Phomopsis</i> sp. 1
4811 ^{a,b}	5	<i>Diaporthe lusitanicae</i> [GQ250190]	98	470	<i>Diaporthe</i> sp. 2
4817 ^{a,b}	4	<i>Colletotrichum fragariae</i> [GU174546]	99	344	<i>Colletotrichum</i> sp. 2
4915 ^b	4	<i>Colletotrichum fructicola</i> [GQ849435]	99	675	<i>Colletotrichum</i> sp. 3
4860 ^a	4	<i>Colletotrichum karstii</i> [HM585409]	97	331	<i>Colletotrichum</i> sp. 6
4809 ^{a,b,c}	4	<i>Pestalotiopsis sydowiana</i> [HQ248207]	98	456	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 4
4878 ^{a,b}	3	<i>Aspergillus panamensis</i> [FJ491665]	92	462	<i>Aspergillus</i> sp.
4880 ^a	3	<i>Beltrania querna</i> [GU905994]	97	352	<i>Beltrania</i> sp. 1
4863 ^{a,b,c}	3	<i>Diaporthe</i> sp. [HQ022959]	99	360	<i>Diaporthe</i> sp. 4
4924 ^{a,b}	3	<i>Pestalotiopsis mangiferae</i> [JX305700]	97	310	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1
4872 ^b	2	<i>Colletotrichum incarnatum</i> [GQ369606]	99	526	<i>Colletotrichum</i> sp. 5

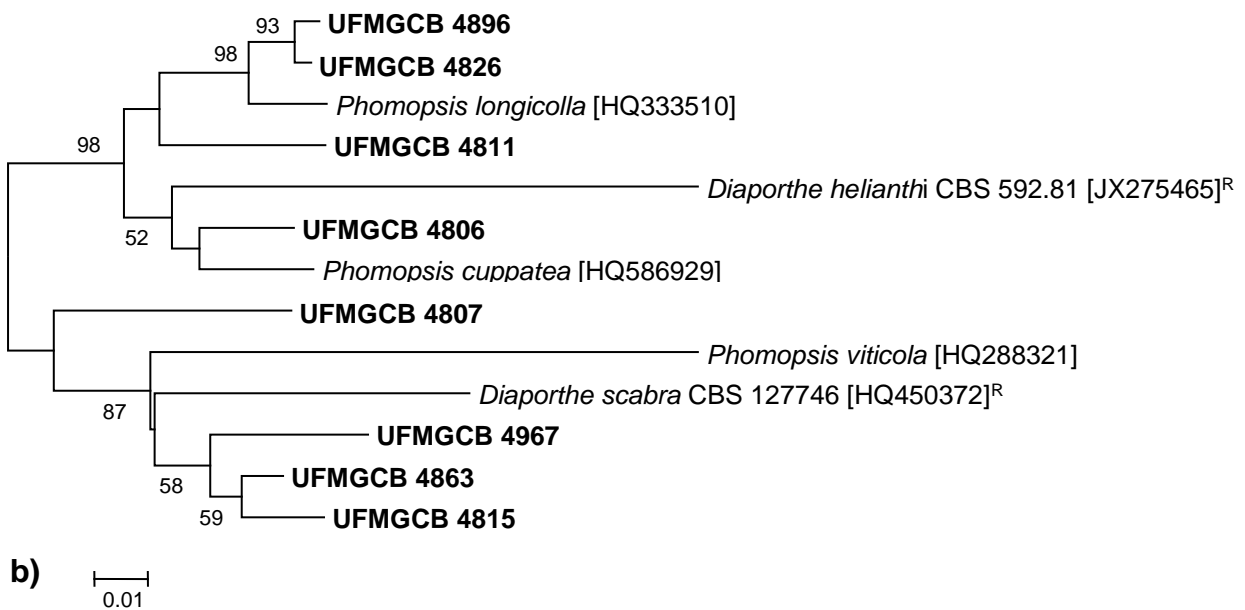
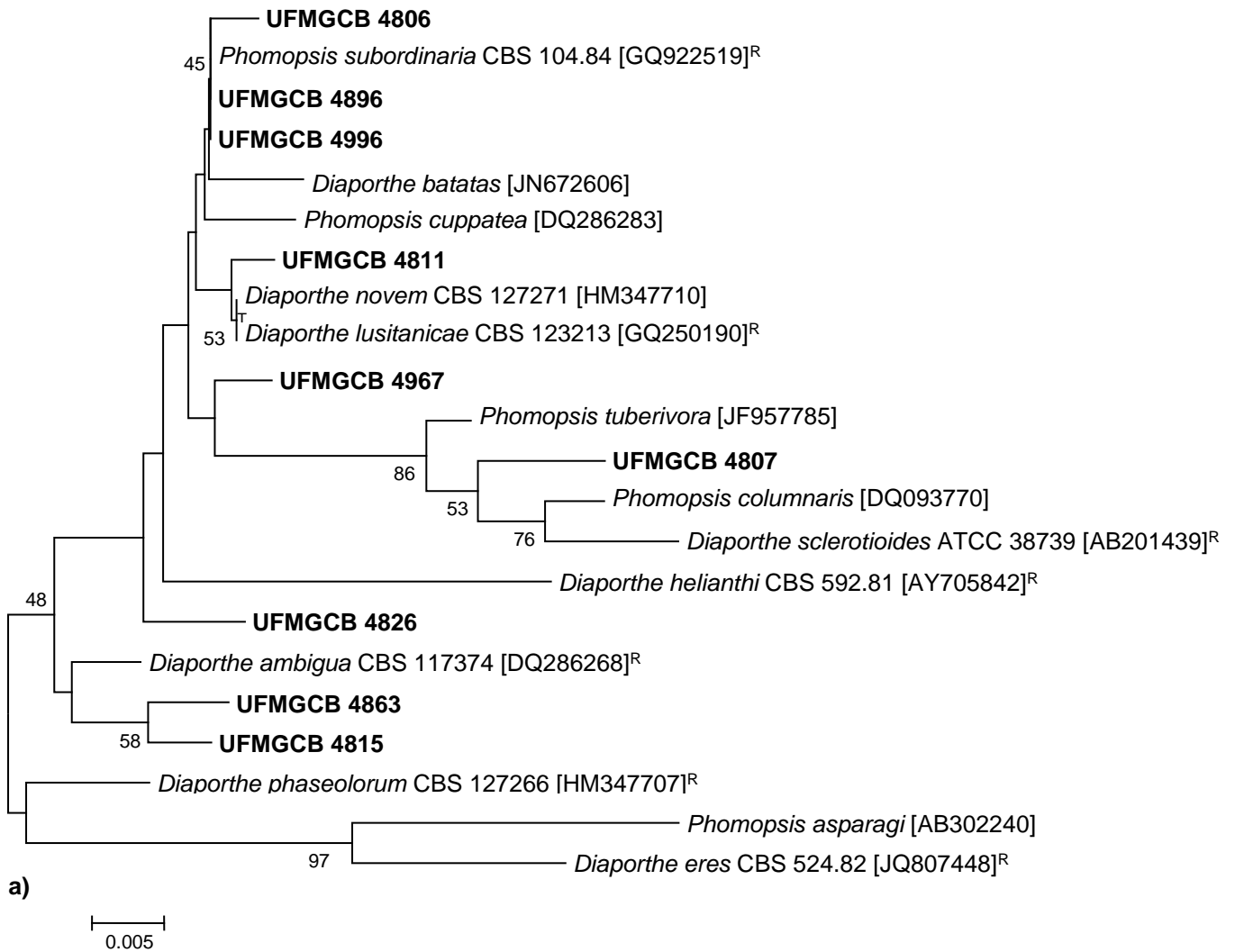
4827 ^{a,b}	2	<i>Colletotrichum novae-zelandiae</i> [JQ005228]	96	415	<i>Colletotrichum</i> sp. 7
5012 ^a	2	<i>Glomerella cingulata</i> [HQ845385]	98	426	<i>Glomerella</i> sp. 1
4933 ^a	2	<i>Guignardia mangiferae</i> [FJ538342]	98	486	<i>Guignardia</i> cf. <i>mangiferae</i>
4958 ^a	2	<i>Hypocrea rufa</i> [DQ315438]	99	457	<i>Hypocrea rufa</i>
4906 ^a	2	<i>Pestalotiopsis protearum</i> [JN712498]	97	409	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 3
5015 ^a	2	<i>Xylaria adscendens</i> [GU300101]	99	373	<i>Xylaria adscendens</i>
5005 ^{a,b}	2	<i>Entonaema pallida</i> [AM900591]	99	473	<i>Entonaema</i> cf. <i>pallida</i>
4882 ^a	1	<i>Beltrania querna</i> [GU905994]	93	359	<i>Beltrania</i> sp. 2
4862 ^a	1	<i>Menisporopsis theobromae</i> [GU905996]	95	511	<i>Menisporopsis</i> sp.
4902 ^a	1	<i>Botryosphaeria mamane</i> [EF118052]	99	311	<i>Botryosphaeria mamane</i>
4996 ^a	1	<i>Phomopsis subordinaria</i> [GQ922519]	99	320	<i>Phomopsis subordinaria</i>
4815 ^{a,b}	1	<i>Diaporthe</i> sp.[EF423542]	98	435	<i>Diaporthe</i> sp. 3
4903 ^a	1	<i>Fusarium proliferatum</i> [GQ167230]	98	429	<i>Fusarium</i> cf. <i>proliferatum</i>
4956 ^a	1	<i>Glomerella septospora</i> [GU935911]	99	321	<i>Glomerella</i> sp. 2
4813 ^a	1	<i>Guignardia vaccinii</i> [EU167584]	99	477	<i>Guignardia vaccinii</i>
5014 ^{a,b}	1	<i>Penicillium citrinum</i> [GU944571]	100	308	<i>Penicillium citrinum</i>
4855 ^{a,b}	1	<i>Penicillium siamense</i> [JN899385]	99	409	<i>Penicillium</i> sp.
4904 ^{a,b}	1	<i>Pilidiella quercicola</i> [AY339345]	98	333	<i>Pilidiella</i> cf. <i>quercicola</i>
4916 ^b	1	<i>Xylaria cubensis</i> [GQ502701]	98	300	<i>Xylaria</i> sp. 1
4877 ^a	1	<i>Xylaria</i> sp. [DQ139271]	95	442	<i>Xylaria</i> sp. 2
4914 ^a	1	<i>Entonaema pallida</i> [AM900591]	95	462	<i>Entonaema</i> sp. 1
4848 ^a	1	<i>Entonaema pallida</i> [AM900591]	97	475	<i>Entonaema</i> sp. 2

do BLASTn utilizando
do gene da β -tubulina.

No presente trabalho foram encontrados 9 táxons distintos pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis* (Tabela 1). A identificação dos isolados deste complexo foi realizada baseando-se no sequenciamento de 3 regiões do genoma: ITS, β -tubulina e EF 1- α . Mesmo após a realização de análises filogenéticas baseadas nestas regiões, foi possível elucidar a identificação de apenas 1 dos isolados em nível de espécies. Todos os demais isolados foram identificados como *Diaporthe* sp. ou *Phomopsis* sp. Árvores filogenéticas foram construídas com o intuito de demonstrar quais os táxons mais próximos daqueles encontrados no presente estudo (Figura 11). A maioria dos táxons encontrados dentro do complexo *Phomopsis/Diaporthe* apresentaram baixa similaridade com as sequências depositadas no GenBank, o que pode significar que as folhas de *C. guianensis* possam representar um reservatório de possíveis espécies novas dentro deste complexo. Entretanto, estudos taxonômicos mais detalhados serão necessários para a caracterização destes táxons.

Huang et al. (2009) observaram que espécies de *Phomopsis* e *Diaporthe* estão entre os táxons mais frequentes em associação com as plantas medicinais *Artemisia capillaris*, *A. indica* e *A. lactiflora*. Carvalho et al. (2012) ao avaliarem a diversidade de fungos endofíticos associados à *Stryphnodendron adstringens* obteve 320 isolados, dos quais 106 foram identificados como pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis*. Garcia et al. (2012) observaram que 40% dos táxons obtidos de *Sapindus saponaria* foram identificados como *Diaporthe/Phomopsis*.

No presente trabalho, o gênero *Pestalotiopsis* com 21 (10%) isolados (Tabela 1) foi o terceiro mais frequente com endofítico de *C. guianensis*. 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 devido aos vários relatos de produção de metabólitos secundários bioativos de interesse na agricultura e medicina (GEHLOT et al., 2012).



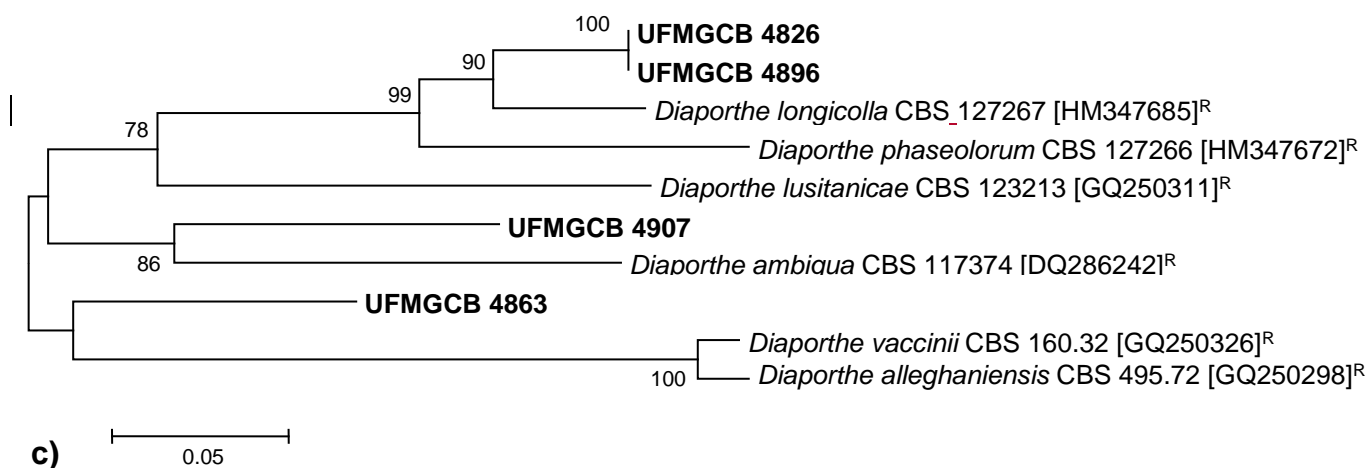


Figura 11 - Árvores filogenéticas dos isolados do complexo *Diaporthe/Phomopsis* associados à *carapa guianensis*. **a)** Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. **b)** Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β -Tubulina. **c)** Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene do EF 1- α , utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

Os 21 isolados obtidos foram agrupados em 4 táxons distintos de *Pestalotiopsis*. A identificação destes táxons foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene da β -tubulina e pela região ITS. Todos os táxons foram identificados como *Pestalotiopsis* sp. Árvores filogenéticas foram construídas com o intuito de demonstrar os táxons mais próximos daqueles encontrados no presente trabalho (Figura 12). No entanto, não foram encontradas sequências de referência ou tipo para comparação e sendo assim, apenas o gênero foi aceito.

Tejesvi et al. (2009) encontraram 5 espécies de *Pestalotiopsis* associadas com as folhas das plantas medicinais *Azadirachta indica*, *Holarrhena antidysenterica*, *Terminalia arjuna* e *T. chebula*. Kumaran et al. (2010) isolaram os táxons *P. microspora*, *P. guepinii*, *P. versicolor* e *P. neglecta* em associação com *Taxus cuspidata*. Espécies de *Pestalotiopsis* tem sido frequentemente relatadas como táxons comuns e dominantes em diversas espécies vegetais (KUMARAN et al., 2010).

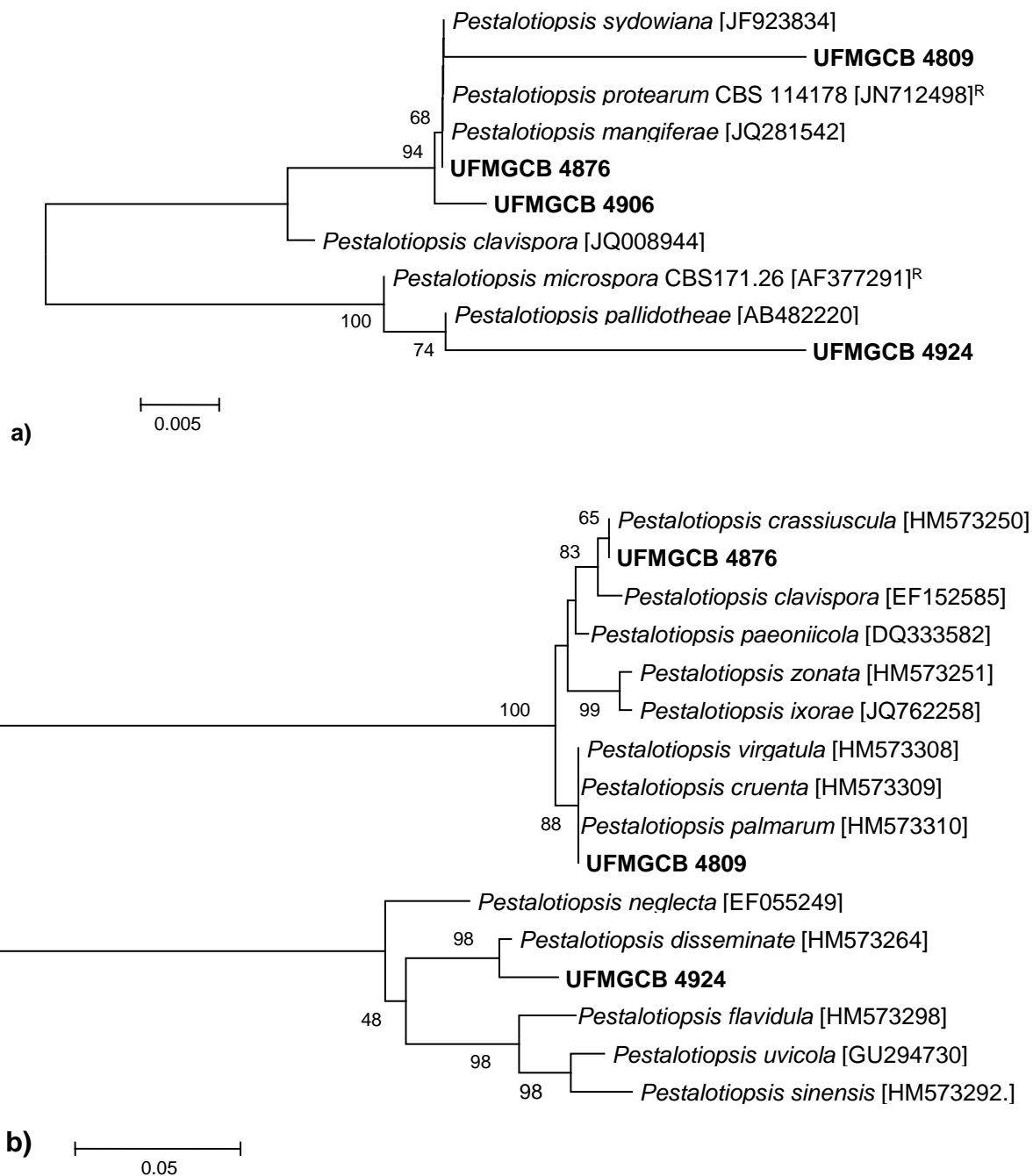


Figura 12 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Pestalotiopsis* associados à *carapa guianensis*. **a)** Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. **b)** Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

A família *Xylariaceae* foi representada por 6 táxons (9 isolados), como endofíticos de *C. guianensis*, a qual já foi documentada em associação com coníferas, monocotiledônea, dicotiledônea e pteridófitas (DAVIS et al., 2003). Estes endofíticos são colonizadores em assintomáticos, posteriormente podem atuar como de decompositores

de celulose e lignina, quando a planta entra em fase de senescência (DAVIS et al., 2003). Carvalho *et al.* (2012) ao avaliarem a diversidade de fungos endofíticos de folhas e cascas de *S. adstringens* e obtiveram 5 espécies de *Xylariaceae*. Espécies de *Xylaria* também já foram relatadas em associação com *Ginkgo biloba* (LIU et al., 2007), *Piper aduncum* (SILVA *et al.*, 2010) e outras espécies vegetais.

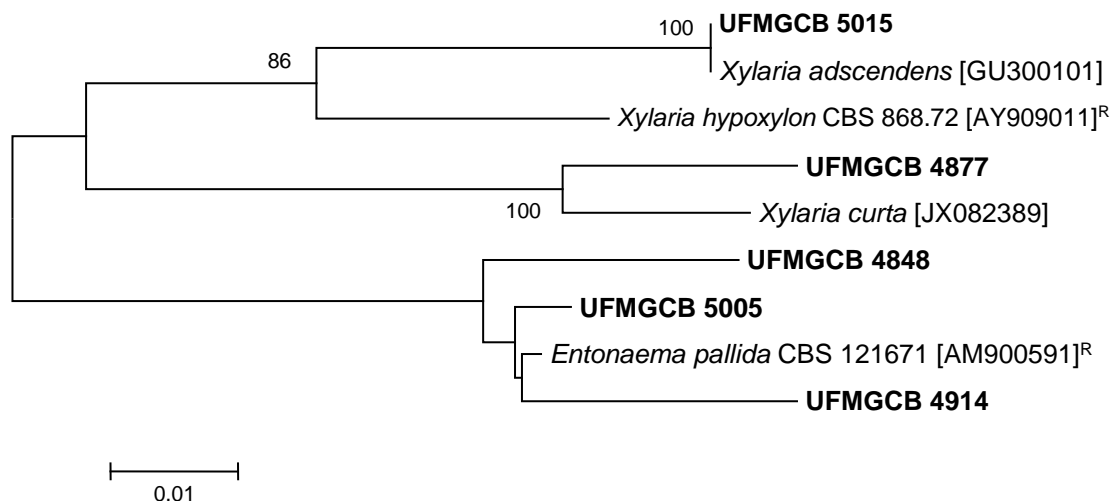


Figura 13 - Árvores filogenéticas dos isolados da família *Xylariaceae* associados à *carapa guianensis*, construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA,, utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

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). No presente estudo foi encontrado apenas um isolado pertencente ao gênero *Fusarium*. O isolado UFMGCB apresentou 98% de similaridade com *Fusarium proliferatum* (GQ167230) e foi identificado com *Fusarium cf. proliferatum* (Tabela 1).

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, assim 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 trabalho foi encontrado o táxon UFMGCB 4958 pertencente a este gênero (Tabela 1), o qual apresentou 99% de similaridade com *Hypocrea rufa* (DQ315438) e a espécie foi aceita.

O gênero *Pilidiella* é de distribuição cosmopolita e já foi relatado como patógeno de plantas, causando doença em folhas, caules e raízes de diversas plantas (NIEKERK et al., 2004), bem como espécies sapróbias e endofíticas (CROUS et al., 2012; HO et al., 2012). Um isolado pertencente a este gênero foi obtido no presente trabalho e foi identificado como *Pilidiella* cf. *quercicola* (Tabela 1), o qual apresentou 98% de similaridade com o táxon *Pilidiella quercicola* (AY339345).

Os isolados UFMGCB 4862, 4880 e 4882 apresentaram similaridade de 93 a 97% com 3 gêneros distintos: *Beltrania*, *Bagadiella* e *Menisporopsis*. Uma árvore filogenética foi construída para tentar elucidar a qual destes gêneros cada um dos táxons isolados pertence (Figura 14).

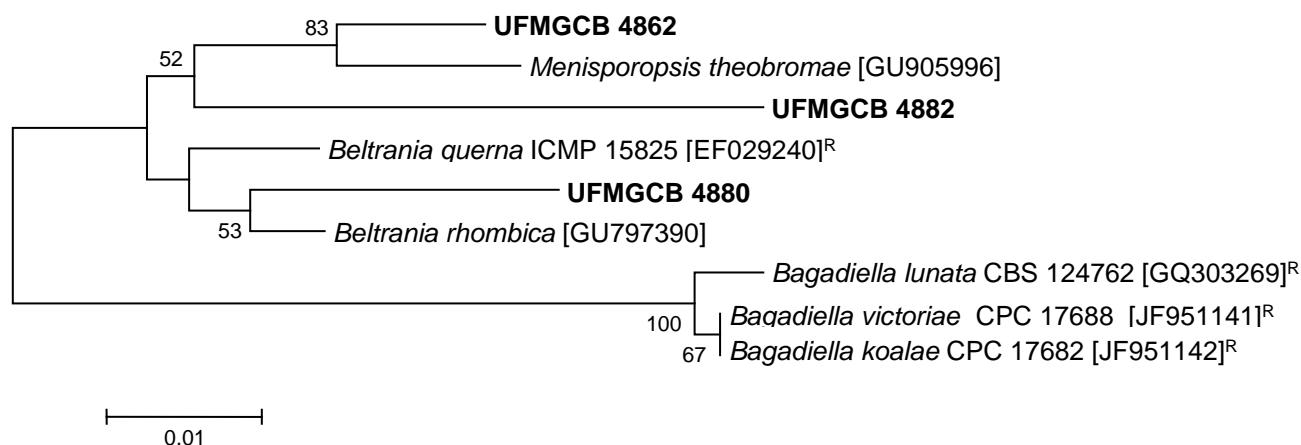


Figura 14 - Árvores filogenéticas construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA, utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

A sequência do isolado UFMGCB 4862 apresentou 2 e 4% de diferença de nucleotídeo para *Menisporopsis theobromae* (GU905996) e *Beltrania querna* (EF029240), respectivamente e foi identificado como *Menisporopsis* sp. O isolado UFMGCB 4882 apresentou 4 e 5% de diferença para os táxons *Beltrania querna* (EF029240) e *Menisporopsis theobromae* (GU905996), respectivamente, e foi identificado como *Beltrania* sp. O isolado UFMGCB 4880 apresentou 2% de diferença para *Beltrania rhombica* (GU797390) e também foi identificado como *Beltrania* sp.

(Figura14). *Menisporopsis* é considerado um gênero restrito com até o momento 10 espécies registradas no Index Fungorum. *Menisporopsis theobromae*, espécie-tipo do gênero, tem sido amplamente relatada pela sua capacidade de sintetizar um poliéster bioativo (SULTAN, 2012). Espécies do gênero *Beltrania* são consideradas anamorfo de um ciclo desconhecido de *Ascomycota*. *Beltrania* é um gênero bastante difundido e comumente encontrado em folhas em decomposição e restos de plantas em áreas subtropicais e tropicais (FREITAS, 2012), porém já foi relatado como endofítico de *Eperua falcata*, *Goupia glabra*, *Jacaranda* sp., *Manilkara bidentata* e também em *Carapa guianensis* (CANNON & SIMMONS, 2002).

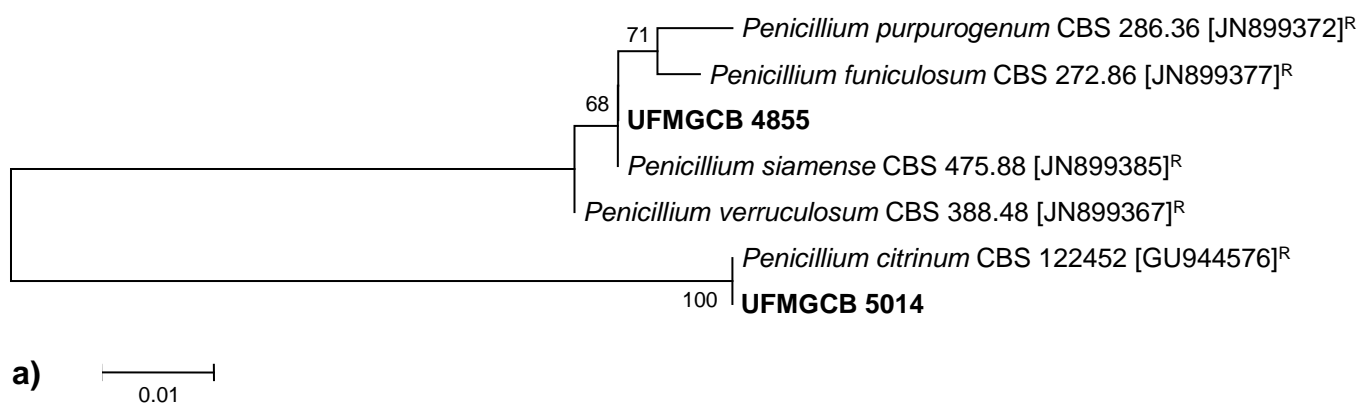
No presente trabalho, a classe *Dothideomycetes* foi representada pelos gêneros *Botryosphaeria*, *Endomelanconiopsis* e *Guignardia*. Os isolados de *Dothideomycetes* foram todos identificados baseando-se apenas no sequenciamento da região ITS. O gênero *Endomelanconiopsis* foi o táxon mais frequente dentro de *Dothideomycetes* com 7 isolados. A sequência do táxon UFMGCB 4992 apresentou 99% de similaridade com táxon *Endomelanconiopsis endophytica* (EU683669) e a identificação da espécie foi aceita. *Endomelanconiopsis endophytica* foi descrita em 2008 por E.I. Rojas & Samuels e análises filogenéticas demonstram que esta espécie é considerada “irmã” de *E. microspora* (*Botryosphaeriaceae*). *Endomelanconiopsis endophytica* já foi relatada em associação com folhas de *Theobroma cacao*, *Heisteria concinna* e *Ouratea lucens* (ROJAS et al., 2008), *Hevea brasiliensis* (GAZIS & CHAVERRI, 2010) e *Merremia umbellata* (BAEL et al., 2012). A análise da sequência do isolado UFMGCB 4902 apresentou 99% de similaridade com *Botryosphaeria mamane* (EF118052) e a identificação da espécie também foi aceita. *Botryosphaeria* é um gênero com diferentes espécies com distribuição cosmopolita. Algumas espécies já foram descritas como sapróbias, ocasionalmente parasitas, endofíticas e patogências causando diversas doenças em seus hospedeiros. Além disso, espécies de *Botryosphaeria* já foram relatadas em associação com monocotiledoneas, dicotiledôneas e gimnospermas (DENNAM, et al., 2000).

Dentro de *Dothideomycetes* foram ainda encontrados 2 táxons do gênero *Guignardia*. 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). A sequência do isolado UFMGCB 4933 apresentou 98% de similaridade

com *Guignardia mangiferae* (FJ538342) e foi identificado como *Guignardia* cf. *mangiferae*. A sequência do isolado UFMGCB 4813 apresentou 99% de similaridade com *Guignardia vaccinii* (EU167584) e foi identificado como *Guignardia vaccinii* (Tabela 1).

Eurotiomycetes correspondem à terceira classe de fungos filamentosos encontrada no presente trabalho. A identificação dos táxons desta classe foi baseada no sequenciamento parcial do gene da β -tubulina e na região ITS. Os gêneros encontrados no presente estudo (*Penicillium* e *Aspergillus*) constituem grupos taxonomicamente complexos não sendo possível elucidar a sua identificação baseando-se apenas na região ITS.

Associado a *C. guaianensis* foram encontradas 2 espécies do gênero *Penicillium*. O isolado UFMGCB 5014 apresentou 100% de similaridade com *Penicillium citrinum* na análise da região ITS e β -tubulina (Figura 15a, b) quando comparadas com sequências de referência. Já o isolado UFMGCB 4855 apresentou 100% de similaridade com *Penicillium siamense* CBS 475.88 (JN899385) na análise das sequências da região ITS (Figura 15a). A sequência de β -tubulina apresentou 26% de diferença com os táxons *Penicillium sizovae* CBS 122387 (GU944536) e *Penicillium tropicum* CBS 112584 (GU944532) (Figura 15b). Desta forma, o isolado UFMGCB 4855 foi identificado como *Penicillium* sp. *Penicillium citrinum* já foi isolado de uma variedade de substratos, tais como solo, alimentos e em associação com diferentes espécies vegetais (SAMSON et al. 2004). Além disso, *P. citrinum* tem sido frequentemente isolado de raízes e caules de café, raízes de *Ixeris repenes* e folhas de *Catha edulis* (HOUBRAKEN et al., 2010). Apenas um representante do gênero *Aspergillus* foi encontrado no presente estudo. *Aspergillus* sp. UFMGCB 4878 apresentou 92 e 79% de similaridade com *Aspergillus panamensis* na análise das sequências de ITS e β -tubulina, respectivamente (Figura 16).



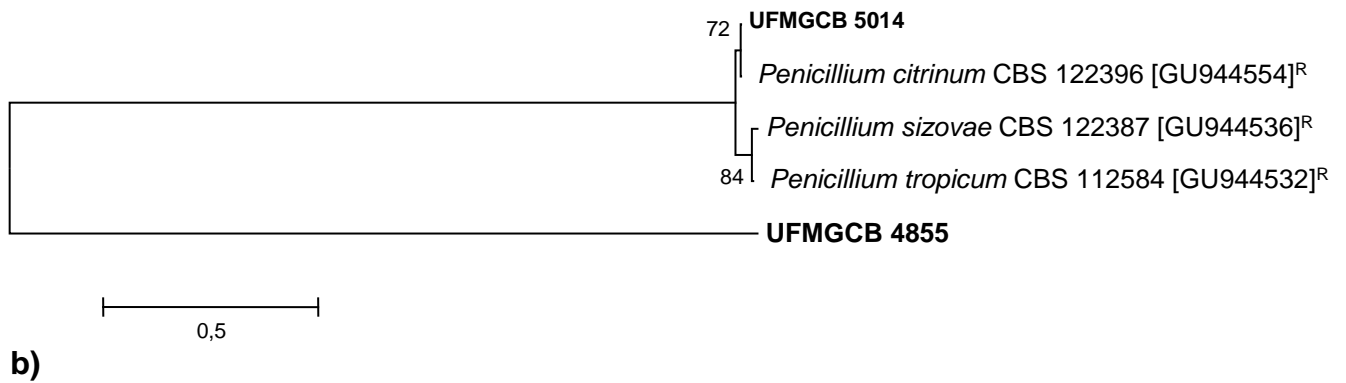


Figura 15 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Penicillium* associados à *carapa guianensis*. **a)** Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. **b)** Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

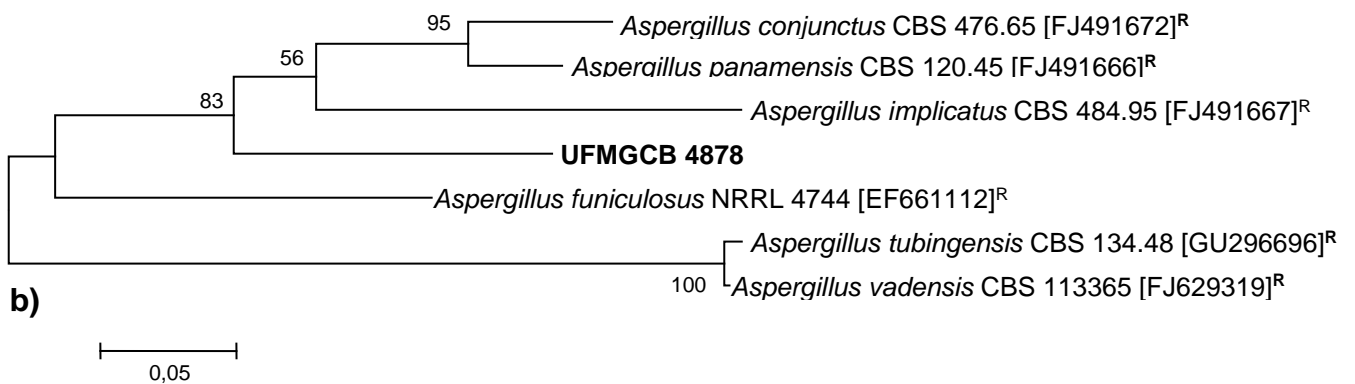
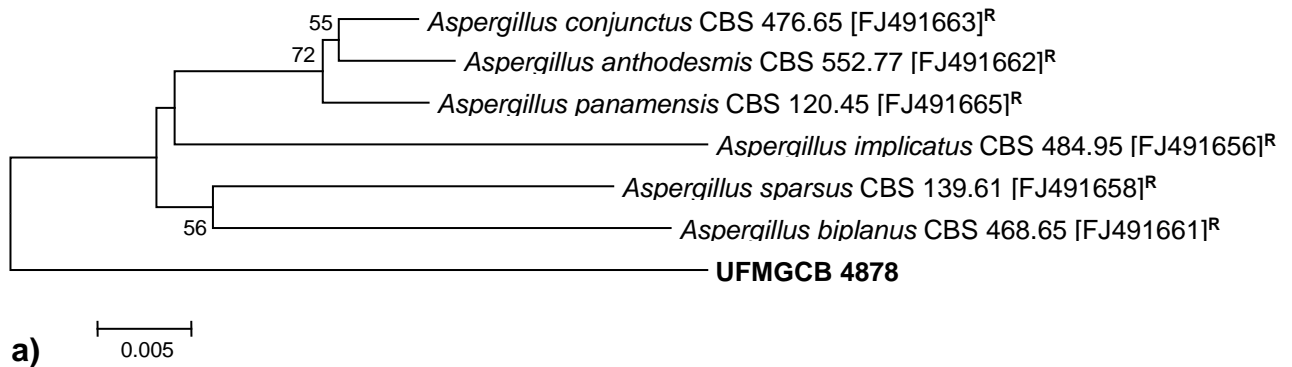


Figura 16 - Árvores filogenéticas dos isolados do táxon *Aspergillus* associados à *carapa guianensis*. **a)** Árvore filogenética construída baseando-se em fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene rRNA. **b)** Árvore filogenética construída baseando-se no sequenciamento parcial do gene da β - Tubulina, utilizando o método *Neighbour-joining*. ^RSequência de referência. ^TSequência tipo.

Cannon & Simmons (2002) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos associados às folhas de 12 espécies de plantas encontradas na reserva florestal Iwokrama, Guiana. Entre as espécies vegetais amostradas foram coletadas amostras de 2 indivíduos de *C. guianensis*. Os autores isolaram 30 fungos filamentosos que foram identificados em 16 táxons distintos, dentre eles: *Beltrania* sp., *Beltrania rhombica*, *Colletotrichum* sp., *Ellisiopsis* sp., *Nodulisporium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* sp., *Xylariaceae* sp.. Os principais gêneros encontrados no presente estudo estão de acordo com os táxons mais frequentemente isolados no estudo de Cannon & Simmons (2002).

5.4 Diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas de *Carapa guianensis*

A abundância de fungos endofíticos associados às folhas de *C. guianensis* variou entre 0,56 e 18,33% (Tabela 2). Para a determinação destes valores foram considerados apenas 180 isolados, uma vez que não foi possível realizar a identificação de 29 isolados por meio da metodologia utilizada. Um total de 42 táxons distintos associados à *C. guianensis* foram identificados e os gêneros *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Diaporthe* foram os mais abundantes, respectivamente. De acordo com Rajagopal et al. (2012) os gêneros *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Guignardia* e *Glomerella* são encontrados com frequência em diferentes plantas medicinais de ambientes tropicais. Rojas et al. (2010) identificaram *Colletotrichum gloeosporioides* como espécie dominante associada à *Theobroma cacao*. Ruma et al. (2011) encontraram o gênero *Colletotrichum* como endofítico dominante em *Artocarpus hirsutus* e *Vateria indica*. Carvalho et al. (2012) encontraram *Phomopsis* sp. como o táxon dominante em *S. adstringens*. Por outro lado, no presente trabalho foram encontrados 15 táxons com valores de abundância de 0,56%, constituindo a porção minoritária da comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis*, os quais incluem espécies dos gêneros *Fusarium*, *Guignardia*, *Botryosphaeria*, *Menisporopsis*, *Pilidiella*, *Penicillium*, *Entonaema* e *Xylaria* (Tabela 2).

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, além da independência em relação ao esforço amostral. Para determinar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados

à *C. guianensis* foram utilizados índices de riqueza (Margalef), dominância (Simpon) e diversidade (Fisher- α). As folhas de *C. guianensis* apresentaram um índice de riqueza de espécies moderado (Margalef = 7,9) quando comparado com outros estudos relacionados. Carvalho *et al.* (2012) obtiveram um alto índice de riqueza de espécies (Margalef = 11,4) associadas às folhas de *S. adstringens*, planta medicinal encontrada no Cerrado brasileiro. Pang *et al.* (2008) ao avaliarem a riqueza de espécies associadas às folhas de *Kandelia candel*, árvores de mangue tipicamente encontradas no Japão, obtiveram uma baixa riqueza de espécies (Margalef = 1,69). Assim como no presente estudo, Kusari *et al.* (2012) encontraram uma riqueza de espécies fungos endofíticos moderada (Margalef = 7,75) associadas á folhas de *Cannabis sativa*, planta utilizada para fins medicinais.

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 *C. guianensis* apresentou índice de Simpson de 0,93, sugerindo que poucos táxons foram dominantes e se distribuíram de forma homogênea dentro da comunidade. Vieira *et al.* (2012) também observaram que os fungos endofíticos associados a *Solanum cernuum* (Panacéia), planta medicinal popularmente utilizada no tratamento de doenças infecciosas, apresenta distribuição homogênea dentro da comunidade (Simpson = 0,92). Ravindra *et al.* (2011) caracterizaram a diversidade de fungos endofíticos associados a *Adenocalymma alliaceum*, planta medicinal nativa da região amazônica, e encontraram valores para o índice de Simpson = 0,89. Flor *et al.* (2011) ao caracterizarem a diversidade de fungos endofíticos associados às folhas de *Taxus globosa* encontraram índice de Simpson = 0,87.

A diversidade de espécies associadas às folhas de *C. guianensis* foi calculada por meio do índice de Fisher- α , o qual apresentou valor de 17,23. Quanto maior o valor de Fisher- α , maior a diversidade de espécies do ambiente analisado. Veja *et al.* (2010) ao calcularem o índice de diversidade de Fisher- α da comunidade de fungos endofíticos associados a espécies de café do México e Colômbia encontraram valores de 14,7 e 75,4, respectivamente, demonstrando que ambas as comunidades apresentaram alta diversidade. Gazis & Chaverri (2010) ao avaliarem a diversidade de fungos endofíticos associados a *Hevea brasiliensis*, encontraram uma comunidade com alta diversidade (Fisher- α = 22,41). Carvalho *et al.* (2012) encontraram valores de Fisher- α de 25,8 ao avaliarem a diversidade de fungos associados à *S. adstringens*.

Tabela 2 – Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a *Carapa guianensis*.

Espécie de fungo endofítico	Número de isolados	Abundância (%)
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	33	18,33
<i>Phomopsis</i> sp. 3	21	11,67
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	12	6,67
<i>Diaporthe</i> sp. 3	10	5,56
<i>Phomopsis</i> sp. 2	8	4,44
<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	7	3,89
<i>Phomopsis</i> sp. 4	7	3,89
<i>Colletotrichum siamense</i>	6	3,33
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	6	3,33
<i>Phomopsis</i> sp. 1	6	3,33
<i>Diaporthe</i> sp. 1	5	2,78
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	4	2,22
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	4	2,22
<i>Colletotrichum</i> sp. 6	4	2,22
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 4	4	2,22
<i>Aspergillus</i> sp.	3	1,67
<i>Beltrania</i> sp. 1	3	1,67
<i>Diaporthe</i> sp. 4	3	1,67
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	3	1,67
<i>Colletotrichum</i> sp. 5	2	1,11
<i>Colletotrichum</i> sp. 7	2	1,11
<i>Entonaema</i> cf. <i>pallida</i>	2	1,11
<i>Glomerella</i> sp. 1	2	1,11
<i>Guignardia</i> cf. <i>mangiferae</i>	2	1,11
<i>Hypocrea rufa</i>	2	1,11
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 3	2	1,11
<i>Xylaria adscendens</i>	2	1,11
<i>Beltrania</i> sp. 2	1	0,56
<i>Botryosphaeria mamane</i>	1	0,56
<i>Diaporthe</i> sp. 3	1	0,56
<i>Entonaema</i> sp. 1	1	0,56
<i>Entonaema</i> sp. 2	1	0,56
<i>Fusarium</i> cf. <i>proliferatum</i>	1	0,56
<i>Glomerella</i> sp. 2	1	0,56

<i>Guignardia vaccinii</i>	1	0,56
<i>Menisporopsis</i> sp.	1	0,56
<i>Penicillium citrinum</i>	1	0,56
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,56
<i>Phomopsis subordinaria</i>	1	0,56
<i>Pilidiella</i> cf. <i>quercicola</i>	1	0,56
<i>Xylaria</i> sp. 1	1	0,56
<i>Xylaria</i> sp. 2	1	0,56
Total	180	100

O esforço amostral da comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis* foi avaliado por meio de curva de rarefação de espécies, que representa o número de espécies em função do número de amostras avaliadas (Figura 17). A curva não atingiu uma assíntota, indicando que a diversidade total (riqueza e composição de espécies) não foi obtida. Este resultado sugere que o aumento da amostragem poderia levar a obtenção de outros táxons de fungos associados a *C. guianensis*. Unterseher et al. (2007) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos associados as folhas de *Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur* e *Tilia cordata* e a avaliação do esforço amostral por meio da curva de rarefação também demonstrou que não foi possível obter toda a diversidade de espécies associadas a estas plantas. Carvalho et al. (2012) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos associados a *S. adstringens* e obtiveram 320 isolados que foram agrupados em 66 táxons distintos. As análises de diversidade indicaram que a riqueza e a composição de espécies associadas a *S. adstringens* também não foram totalmente observadas.

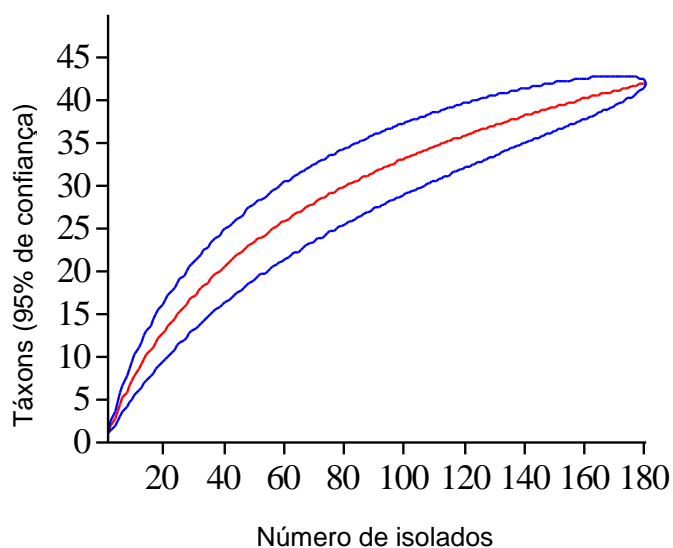


Figura 17 – Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) dos fungos endofíticos associados às folhas de *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*), construída com intervalo de 95% de confiança.

5.5 Cultivo e preparo dos extratos

Um total de 209 extratos fúngicos e 30 extratos de *C. guianensis* foram preparados para a realização dos ensaios biológicos. Alguns trabalhos relatam que a metodologia utilizada para a produção dos extratos brutos pode influenciar profundamente nos tipos de metabólitos produzidos pelo fungo (FRISVAD et al., 2008; ALY et al., 2011). Para obtenção dos metabólitos bioativos, todos os fungos foram cultivados utilizando técnicas de fermentação em estado sólido (FES) em BDA. A fermentação em meios sólidos vem sendo amplamente utilizada em diferentes bioprocessos, incluindo a obtenção de produtos naturais bioativos microbianos. Este tipo de fermentação proporciona um ambiente favorável para o crescimento microbiano, principalmente para fungos filamentosos devido ao crescimento de hifas, a qual tem a capacidade de crescer não apenas sobre a superfície das partículas do substrato, mas também penetrar através delas (PANDEY, 2008). Além disso, de acordo com Kusari et al., (2012), a alteração nos parâmetros fermentativos pode influenciar na biossíntese dos metabólitos secundários, aumentando o número de moléculas produzidas. Fatores como pH, temperatura, composição do meio de cultura, umidade, tempo de crescimento podem influenciar não apenas nos tipos

componentes produzidos, mas também no rendimento destes metabólitos (ALY et al., 2011).

Para a extração dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos associados a *C. guianensis* foi utilizado como solvente etanol PA. A escolha deste solvente esta relacionada com o fato do etanol (1) possuir uma faixa de polaridade com capacidade de se ligar a moléculas de baixo e médio peso molecular, (2) pelo satisfatório poder de penetração em meios de cultura sólido e por (3) sua baixa toxicidade.

5.6 Detecção dos extratos ativos

Dos 209 extratos fúngicos submetidos ao ensaio de triagem para detecção de metabólitos antimicrobianos, 22 (11%) apresentaram percentual de inibição superior a 60% contra pelo menos um dos micro-organismos alvos (Figura 18a). Entre estes, 13 extratos (59%) foram capazes de inibir o crescimento de *Candida krusei*, 5 (23%) inibiram o crescimento de *C. albicans* e 4 (18%) *E. coli* (Figura 18b). Com relação aos extratos de *C. guianensis*, apenas um extrato apresentou percentual de inibição superior a 60%, o qual inibiu o crescimento de *C. krusei*. Nenhum extrato etanólico apresentou atividade contra as linhagens de *P. aeruginosa* e *C. sphaerosperum*. Os 23 extratos considerados ativos tiveram sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada, e destes, apenas 3 (14%) repetiram a atividade apresentada nos testes de triagem (Figura 18c). De acordo com Vieira et al. (2012) é possível que ocorra perdas da atividade de alguns extratos em função de fatores como alterações físico-químicas imperceptíveis durante o processo de armazenamento ou mesmo devido à instabilidade da(s) substância(s) ativa(s) presentes nos extratos.

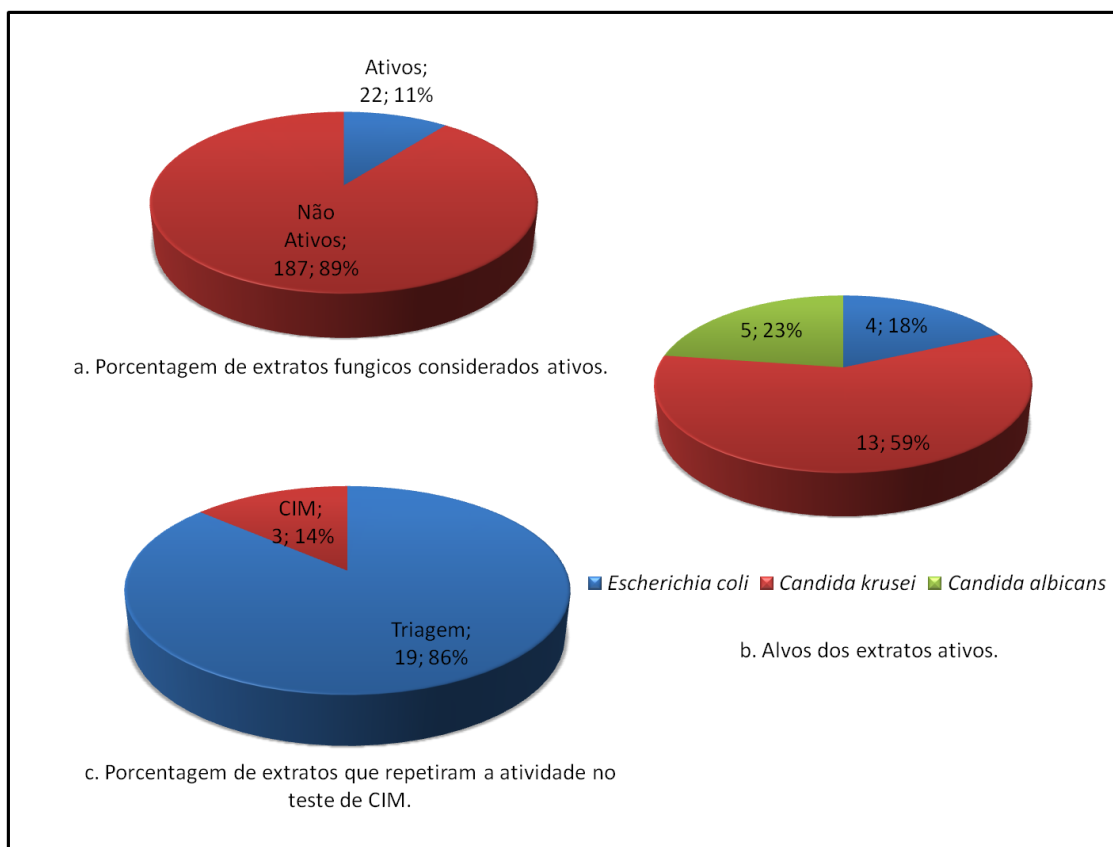


Figura 18 – Desempenho dos extratos dos endofíticos associados à *Carapa guianensis* contra os micro-organismos alvos.

O percentual de extratos ativos encontrados no presente trabalho foi considerado baixo em comparação com outros estudos publicados. Phongpaichit et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de 377 extratos de fungos endofíticos associados à 5 espécies de *Garcinia*, planta medicinal utilizada no tratamento de infecções na Ásia, África e Austrália. Estes autores avaliaram o desempenho dos extratos contra *S. aureus*, *C. albicans* e *Cr. neoformans* e observaram 70 (18,6%) extratos ativos contra pelo menos um dos micro-organismos alvos. Guimarães et al. (2008) verificaram o potencial antimicrobiano de 37 extratos de fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, plantas medicinais comumente utilizadas no tratamento de malária, diarreia, febre, hepatite e feridas. Os autores acima observaram que 5,1% dos extratos apresentaram atividade contra *S. aureus*, 25,6% contra *E. coli* e 64,1% contra *C. albicans*. No estudo realizado por Buatong et al. (2011), o qual avaliou a atividade antimicrobiana de 150 extratos de fungos endofíticos associados à 12 espécies de plantas de mangue, 61,3% dos isolados foram capazes de produzir metabólitos bioativos. Rosa et al. (2012) avaliaram a atividade antifúngica de 24 fungos endofíticos associados com *S. sonchifolius* (yacon) e *S. uvedalius* (*bear foot*), plantas medicinais utilizadas nos Estados Unidos, os

quais verificaram a atividade dos extratos dos fungos endofíticos contra *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* e obtiveram 41,6% dos extratos com atividade antifúngica contra pelo menos um dos alvos. Carvalho et al. (2012) realizaram um estudo para verificar a atividade biológica de 320 extratos de fungos endofíticos associados à *S. adstringens* e um total de 16 extratos (5%) apresentaram atividade contra pelo menos contra um dos micro-organismos alvos. Sathish et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos associados à *Eucalyptus globulus* e *E. citriodora*, plantas produtoras de óleos essenciais comumente utilizados no combate a infecções bacterianas, fúngicas e problemas respiratórios. Dos 30 extratos fúngicos avaliados, apenas 4 foram capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* e *C. albicans* e 2 inibiram o crescimento do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum*.

Segundo Strobel (2003), 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. Os táxons *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4872 e 4991 apresentaram percentual de inibição de 95 e 98%, na concentração de 250 µg/mL, contra *E.coli*. Diferentes estudos vêm demonstrando que espécies de *Colletotrichum* são boas produtoras de metabólitos bioativos. *Colletotrichum* cf. *boninense* e *Colletotrichum* sp., fungos endofíticos isolados de *S. adstringens*, foram capazes de inibir o crescimento de linhagens de *C. albicans* (CARVALHO et al., 2012). Espécies de *Colletotrichum* isoladas a partir de tecidos foliares de *Artemisia annua*, uma herbácea medicinal, apresentaram atividade contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas* sp., *C. albicans* e *Aspergillus niger* (LU et al., 2000). *Colletotrichum dematium* e *Chaetomium globosum* isolados a partir de folhas e caules de *Nyctanthes arbor-tristis*, planta medicinal utilizada no sudoeste da Ásia, foram capazes de inibir o crescimento de *Shigella flexnii*, *Shigella boydii*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* e *P. aeruginosa*. *Colletotrichum dematium* isolado a partir desta mesma planta foi capaz de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *Curvularia lunata* (GOND et al., 2012). *Colletotrichum truncatum*, endofítico da planta medicinal *Tylophora indica*, foi ativo contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium oxysporum* (KUMAR et al., 2010). Além da ampla atividade antimicrobiana associada às várias espécies deste gênero, *Colletotrichum gloeosporioides* isolados da planta medicinal *Justicia gendarussa*, foi capaz de produzir taxol, substância conhecida por sua atividade antitumoral (GANGADEVI & MUTHUMARY, 2009).

Neste estudo o táxon *Pilidiella* cf. *quercicola* UFMGCB 4904 foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* em 92%, na concentração de 250 µg/mL. Entretanto, pelo nosso conhecimento não existe nenhum estudo que caracterize que esta espécie seja produtora de metabólitos antimicrobianos.

5.6.1 Determinação da atividade tripanosomicida

Com relação aos ensaios contra formas amastigotas de *T. cruzi*, dos 209 extratos fúngicos avaliados, 3 (1,4%) apresentaram atividade tripanosomicida acima de 70% de inibição na concentração de 20 µg/mL. O isolado *Phomopsis* sp. UFMGCB 4830 foi capaz de inibir em 100% o desenvolvimento das formas amastigotas de *T. cruzi*. Espécies de *Phomopsis* tem sido relatadas como produtores de diferentes metabólitos bioativos. De acordo com Yang et al. (2010), nos últimos 40 anos foram descritos cerca de 40 novos metabólitos produzidos por espécies de *Phomopsis*, dentre os quais se destacam peptídeos, lactonas, xantonas, micoepoxidienos, entre outros com diferentes tipos de atividades biológicas.

O isolado UFMGCB 4865, não identificado, foi capaz de inibir em 77,8% o desenvolvimento de *T. cruzi*. *Endomelanconiopsis endophytica* UFMGCB 4995 apresentou percentual de inibição de 85,9%. *Endomelanconiopsis endophytica* é uma espécie recentemente descrita como endofítica e foi encontrada pela primeira vez em associação com folhas de *T. cacao* (cacau) (ROJAS et al., 2008). *Endomelanconiopsis endophytica* tem sido descrita em associação com hospedeiros lenhosos de ambientes tropicais sul-americanos, tais como *Heisteria concinna* e *Ouratea lucens* (ROJAS et al., 2008), *Hevea brasiliensis* (GAZIS & CHAVERRI, 2010), espécies de *Terminalia* (BEGOUDE et al., 2011) e *Merremia umbellata* (BAEL et al., 2012). Pelo nosso conhecimento não existe relato de atividade biológica de espécies de *Endomelanconiopsis*.

Trypanossoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas, que afeta 15 milhões de pessoas na América Latina e é responsável pela morte de 45 mil pessoas por ano de acordo com Organização Mundial da Saúde (LUIZE et al., 2005; IZUMI et al., 2011). Atualmente, os compostos benzonidazol e Nifurtimox têm sido utilizados em toda a América Latina como as drogas de escolha no tratamento da doença, no entanto, estes compostos não são considerados eficazes e apresentam efeitos colaterais como toxicidade renal e cardíaca (VELOSO et al., 2001). No Brasil o benzonidazol é a única droga

disponível e seus resultados demonstram cura de 70-80% dos casos, na fase aguda, mas somente 10-20% para a infecção crônica (IZUMI et al., 2011). Desta forma, fica evidente a necessidade da busca de novos compostos bioativos contra *T. cruzi*. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram-se promissores para a investigação de novas moléculas bioativas em relação ao extrato produzido pelo fungo *E. endophytica* UFMGCB 4995, uma vez que não há registros do potencial biotecnológico deste táxon.

5.7 Re-cultivo, extração e certificação da atividade antimicrobiana

Os extratos que mantiveram atividade biológica nos ensaios de CIM foram novamente produzidos para avaliar a manutenção da atividade após novo cultivo. Os isolados *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4872 e *Pilidiella* cf. *quercicola* UFMGCB 4904 não puderam ser re-ativados após criopreservação e foram considerados mortos. Desta forma, o teste de confirmação de atividade antimicrobiana foi realizado apenas com o isolado *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991. Para obter um extrato com menos componentes do meio de cultura (extraídos com etanol), o extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 foi produzido utilizando-se o solvente diclorometano (DCM). O uso do DCM como solvente para extrair metabólitos fúngicos evita a extração de componentes do meio de cultura onde o fungo foi cultivado tais como açúcares e compostos nitrogenados. Além disso, o DCM, devido a sua polaridade, extrai preferencialmente moléculas de baixo peso molecular, ou seja, metabólitos secundários ou produtos naturais. Após cultivo de 5 placas com crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991, foi obtido rendimento de 6,42 mg do extrato diclorometânico. O extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 produzido utilizando DCM foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* em 95,3% na concentração de 125 µg/mL.

5.8 Processos fermentativos do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 para determinação das condições ótimas de cultivo e obtenção de metabólitos bioativos

Os métodos mais utilizados para a obtenção de metabólitos bioativos a partir de micro-organismos estão diretamente relacionados com os processos fermentativos (JOSEPH & PRIYA, 2011). De acordo com Kusari (2012), o controle das condições de fermentação por alteração dos parâmetros do processo tais como tipo de meio de cultura,

pH, pressão de O₂ e CO₂, tempo de crescimento, temperatura e aeração podem melhorar a produção de metabólitos secundários bioativos microbianos. Com o objetivo de melhorar a produção de metabólitos bioativos do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991, parâmetros como meio de cultivo, temperatura e tempo de crescimento foram alterados. Os meios de cultura variaram desde muito pobres, com presença apenas de glicose (AAG); meio intermediário, contendo glicose e extrato de levedura (AAGL); meio rico BDA e muito rico (BDA suplementado com glicose).

Ao final do processo fermentativo do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991, 64 diferentes condições de cultivo foram avaliadas. Os extratos produzidos foram submetidos à triagem contra todos os micro-organismos alvos para determinação do espectro de ação. Entre as diferentes condições analisadas, 27 (42,2%) apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos alvos. O extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 que inicialmente foi capaz de inibir apenas *E. coli*, após as variações nos parâmetros de cultivo, também passou a apresentar atividade contra *S. aureus*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. sphaerosperum* (Figura 19). Nenhum dos extratos produzidos a partir das diferentes condições foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*.

Os extratos do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 produzidos a partir do meio de cultura AAG não apresentaram atividade contra nenhum dos micro-organismos alvos, indicando que o estresse submetido ao fungo devido à carência de nutrientes parece não ter favorecido a produção metabólitos secundários bioativos (Tabela 3). O crescimento micelial do fungo neste meio foi bem reduzido, com colônias apresentando aspecto hialino e com baixa densidade de hifas. Como consequência os extratos produzidos a partir deste meio apresentaram os rendimentos baixos em sua maioria, variando de 0,0189 a 0,48 mg/mL, de acordo com a temperatura e do tempo de crescimento (Figura 20). De acordo com Frisvad et al. (2008) e Aly et al. (2011) a diversidade de metabólitos secundários pode aumentar com a utilização de meios complexos. Quantidades elevadas de sacarose e glicose, juntamente com extrato de levedura ou extrato de malte, bem como a adição de minerais e traços de metais podem levar a produção de metabólitos altamente variados e com rendimento elevado.

Dos 64 extratos avaliados, 21 apresentaram atividade contra *E. coli* com inibição entre 71,5 e 100% (Tabela 3). Entre estes, 3 extratos produzidos no meio AAGL apresentaram atividade contra *E. coli*, com inibição entre 74,4 e 96,8%; destes, 2 inibiram de 89,2 e 96,8% na concentração de 62,5 µg/mL (Tabela 3) e tiveram os fungos crescidos

nas temperaturas de 30° e 20°C, respectivamente, por 45 dias. Apesar de estes extratos apresentarem atividade em concentrações relativamente baixas, o tempo para a obtenção dos metabólitos bioativos foi considerado alto, o que torna estas condições, em termos de tempo de cultivo, desvantajosas.

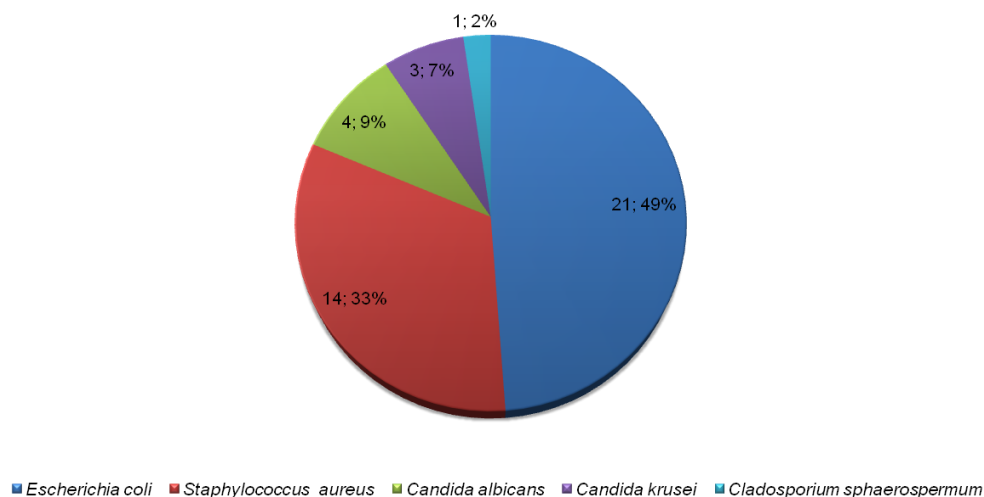


Figura 19 – Espectro de ação dos extratos obtidos a partir do teste fermentativo realizado com o fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991.

Dez extratos produzidos em BDA exibiram atividade contra *E. coli*, com inibição entre 81,2 e 100% (Tabela 3). As concentrações dos extratos ativos neste meio variaram de 15,6 a 250 µg/mL. O extrato que exibiu melhor atividade (96,9% de inibição a 15,6 µg/mL) foi preparado a partir do meio BDA a 25°C com 60 dias de crescimento. No entanto, o tempo de crescimento necessário para a obtenção de atividade nesta concentração foi considerado alto, o que torna esta condição menos interessante quando comparada com a condição padrão para obtenção de extratos brutos (BDA 25° em 15 dias). O extrato produzido nas condições padrão (BDA 25° em 15 dias) apresentou inibição de 87,2% a 31,25 µg/mL contra *E. coli*, o que torna esta condição a mais atraente para detecção de metabólitos antibacterianos.

Foram obtidos ainda 8 extratos produzidos a partir do meio BDAG que exibiram atividade contra *E. coli*. Estes extratos apresentaram inibição entre 71,5 e 100% (Tabela 3). As concentrações dos extratos ativos neste meio variaram entre 31,25 e 250 µg/mL, sendo que as atividades nas concentrações mais baixas foram obtidas a 25° e 30°C com 60 dias de crescimento, 94,5 e 98,6% de inibição a 31,25 µg/mL, respectivamente.

A temperatura de 35°C se mostrou desfavorável para obtenção de metabólitos bioativos contra *E. coli*, apenas um extrato exibiu atividade nesta temperatura (AAGL

com 30 dias de crescimento). Os extratos que apresentaram as melhores atividades contra *E. coli* foram produzidos em BDA e BDAG nas temperaturas de 25° e 30°C. As atividades nas concentrações mais baixas foram obtidas, principalmente, com os tempos de crescimento de 45 e 60 dias, indicando que fungo permanece produzindo metabólitos bioativos durante todo seu período de crescimento.

Quatorze extratos foram ativos contra *S. aureus*, com inibição variando entre 66,6 e 98,2% (Tabela 3). Apenas 2 extratos produzidos a partir do meio AAGL foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*. Os extratos obtidos utilizando o meio AAGL só apresentaram atividade com 30 e 45 dias de crescimento na temperatura de 30°C, com inibição de 86,6 e 90,3%, respectivamente, na concentração de 125 µg/mL.

Seis extratos preparados a partir do meio BDA exibiram atividade contra *S. aureus*, com inibição variando de 66,6 a 98,2%. As concentrações dos extratos ativos variaram de 31,25 a 250 µg/mL. As melhores atividades obtidas do crescimento do fungo em BDA foram obtidas a 30°C com 45 e 60 dias de crescimento, com inibição de 70,2 e 73,8% na concentração de 31,25 µg/mL. O extrato produzido a partir do BDA a 25°C com 15 dias de crescimento apresentou atividade de 98,2% a 250 µg/mL. Também foram observados 6 extratos produzidos a partir do meio BDAG que apresentaram atividade contra *S. aureus*, com porcentagens de inibição variando entre 66,8 e 97,1%. As concentrações dos extratos ativos variaram de 31,25 a 125 µg/mL. A melhor atividade no meio BDAG foi observada a 25°C após 60 dias de crescimento. A atividade contra *S. aureus* foi observada principalmente com períodos de crescimento de 45 e 60 dias. O extrato do meio BDAG a 25°C apresentou os melhores resultados para *S. aureus*, exibindo atividade promissora com todos os tempos de crescimento. Os extratos produzidos a 35°C não exibiram atividade em nenhum dos meios de cultura.

Quatro extratos apresentaram atividade contra *C. albicans*, com inibição entre 70 a 87,2% (Tabela 3). Os extratos exibiram atividade apenas nas concentrações de 125 e 250 µg/mL. Os extratos produzidos a partir do meio AAGL apresentaram atividade de 70% (25°C em 45 dias) e 74,5% (35°C em 30 dias) na concentração de 250 µg/mL. O extrato preparado a partir do BDA apresentou a melhor atividade quando produzido a 25°C após 60 dias de crescimento, exibindo inibição de 79,8% a 125 µg/mL. O extrato produzido a partir do meio de cultura BDAG a 20°C, com 30 dias de crescimento, apresentou porcentagem de inibição de 87,2% na concentração de 250 µg/mL. Nenhum extrato preparado com 15 dias de crescimento exibiu atividade contra *C. albicans*.

A atividade contra *C. krusei* foi observada em 3 condições: (1) AAGL 35°C em 30 dias, (2) BDA 35°C em 60 dias e (3) BDAG 20°C em 30 dias, com inibição de 99,1, 70,9 e 71,8%, respectivamente. A atividade foi observada apenas na concentração de 250 µg/mL. Apenas o extrato produzido a partir de AAGL na temperatura de 35°C com 30 dias de crescimento exibiu atividade contra *C. sphaerosperum*, com inibição de 66,7% a 250 µg/mL.

O isolado *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991 quando crescido em AAGL a 35°C por 30 dias foi capaz de produzir metabólitos capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. sphaerosperum*, a qual indica ser uma condição que induz a produção de uma maior variedade de metabólitos secundários.

Com relação aos rendimentos dos extratos, foi possível observar que os meios mais pobres (AAG e AAGL) apresentaram rendimentos mais baixos quando comparados com os meios ricos (BDA e BDAG). Os extratos produzidos a partir do meio AAGL apresentaram rendimentos entre 0,019 e 0,127 mg/mL; enquanto os extratos produzidos a partir dos meios BDA e BDAG apresentaram rendimentos entre 0,016-0,44 e 0,016-1,28 mg/mL, respectivamente. No entanto, a princípio não foi possível observar um padrão entre as temperaturas e o tempo de crescimento, pois os rendimentos se mostraram variáveis (Figura 20). De uma maneira geral é possível observar uma redução dos rendimentos com o decorrer do tempo, tal fato pode estar associado a uma desidratação do meio de cultura após longos períodos de incubação.

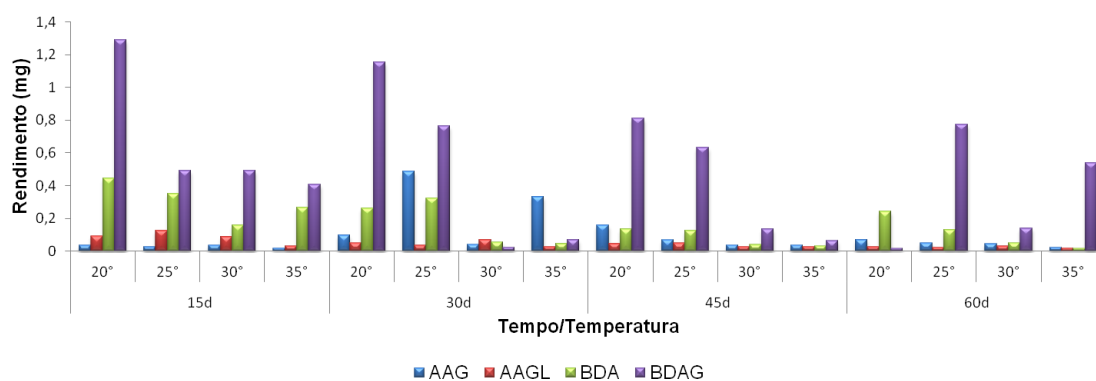


Figura 20 – Rendimento dos extratos produzidos no teste de fermentação realizado com o isolado *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991.

Tabela 3- Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir do teste fermentativo realizado com fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 4991.

Condição de cultivo	Bacteria						Leveduras				Fungo filamentososo	
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
	% Inib. ^a (CV ^b)	CIM ^c (µg/mL)	% Inib. (CV)	CIM (µg/mL)	% Inib. (CV)	CIM (µg/mL)	% Inib. (CV)	CIM (µg/mL)	% Inib. (CV)	CIM (µg/mL)	% Inib. (CV)	CIM (µg/mL)
AAGL 20° 45d ^d	96,8 (17,4)	62,5	6 (0)	-	4,3 (1)	-	35,3 (1)	-	42,8 (1)	-	4,4 (26)	-
AAGL25° 45d	9,3 (11,2)	-	0 (4)	-	0 (2)	-	70 (2)	250	0 (0)	-	2 (6,7)	-
AAGL 30° 30d	32,2 (10,2)	-	86,6 (1,3)	125	0 (2)	-	0 (0)	-	35,1 (3)	-	2, 3 (4,3)	-
AAGL 30° 45d	89,2 (26,3)	62,5	90,3 (11,3)	125	0 (6)	-	37 (0)	-	31,3 (0)	-	31,8 (7)	-
AAGL 35° 30d	74,4 (3,8)	250	20,8 (0)	-	7,8 (1)	-	74,5(0,6)	250	99,1(0,8)	250	60,7 (1)	250
BDA 20° 15d	92,9 (0,2)	125	35,5 (2)	-	0 (0)	-	11,7 (0,8)	-	43,3 (2)	-	3,5 (65)	-
BDA 20° 45d	97,9 (0,1)	125	68,7(2,6)	62,5	0 (9)	-	41,5 (1)	-	50,1 (1)	-	0 (24)	-
BDA 20° 60d	97,6 (0,7)	62,5	66,6 (7,6)	31,25	4,9 (3)	-	40,5 (2)	-	41,7 (0)	-	0 (7)	-
BDA 25° 15d	87,2 (2,4)	31,25	98,2 (4)	250	0 (3)	-	47,1 (1)	-	0 (1)	-	4,4 (9)	-
BDA 25° 30d	10, 5 (12,9)	-	91,5 (2,1)	62,5	0 (7)	-	42, 6 (2)	-	46,2 (2)	-	7,6 (2)	-
BDA 25° 45d	98,1 (0,6)	31,25	14,9 (1)	-	1,2 (0)	-	31,3 (2)	-	49,4 (1)	-	14 (54)	-
BDA 25° 60d	96,9 (0,5)	15,62	56,7 (1)	-	11 (2)	-	79,8 (0,6)	125	53,4 (2)	-	0 (25)	-

BDA 30° 15d	96,7 (5)	250	0 (3)	-	8,2 (18)	-	35,3 (0)	-	19,6 (1)	-	15,1 (28)	-
BDA 30° 30d	99,8 (2,5)	31,25	50 (0)	-	0 (0)	-	54,4 (2)	-	59,5 (2)	-	19,3 (13)	-
BDA 30° 45d	100 (4,1)	250	70,2 (4,5)	31,25	7 (2)	-	0 (1)	-	48,6 (4)	-	10 (0)	-
BDA 30° 60d	99,4 (0,9)	125	73,8 (4,5)	31,25	0 (0)	-	27,7 (1)	-	48,1 (2)	-	36,6 (1)	-
BDA 35° 60d	0 (4,1)	-	15,6 (0)	-	0 (4)	-	17,5 (1)	-	70,9 (1)	250	2 (1,6)	-
BDAG 20° 30d	51,1 (1,5)	-	22,7 (2)	-	0 (6)	-	87,2 (1)	250	71,8 (6)	250	54,4 (8,9)	-
BDAG 20° 45d	94,7 (2,5)	62,5	66,8(1,5)	125	3,4 (3)	-	45,8 (0)	-	0 (1)	-	35 (5)	-
BDAG 25° 15d	39,2 (0,2)	-	92 (2,7)	62,5	0 (2,6)	-	0 (4)	-	36,6 (1)	-	23,1 (1)	-
BDAG 25° 30d	81,2 (3,1)	125	71,2 (6,5)	125	17,7 (0)	-	57,8 (1)	-	44,9 (2)	-	0,7 (4)	-
BDAG 25° 45d	98,1 (0,1)	125	81,3 (5)	62,5	0 (8)	-	38,3 (1)	-	50,1 (10)	-	41,4 (13)	-
BDAG 25° 60d	94,5 (0,3)	31,25	91,8 (11)	31,25	3,2 (0)	-	29,4 (0)	-	51,5 (1)	-	0 (19)	-
BDAG 30° 15d	100(14,1)	250	0 (0)	-	56,2 (0)	-	53,2 (1)	-	29,8 (1)	-	38,8 (17)	-
BDAG 30° 30d	97,9 (1,5)	62,5	43 (1,6)	-	46,5 (0)	-	48,8 (0,7)	-	44,4 (1)	-	0 (11)	-
BDAG 30° 45d	71,5 (1,4)	31,25	97,1 (4,4)	125	8,7 (1)	-	57 (0)	-	59,1 (1)	-	14,3 (24)	-
BDAG 30° 60d	98,6 (0,4)	31,25	10 (3,6)	-	0 (0)	-	34,8 (0,6)	-	50,5 (0)	-	0 (23)	-

AAG: Ágar/água/glicose; AAGL: Ágar/água/glicose/extrato de levedura; BDA: Ágar batata dextrosado; BDAG: BDA acrescido de glicose; ^aPercentual de inibição;

^bCoefficiente de Variação; ^cConcentração Inibitória Mínima; ^ddias de crescimento

6 Conclusões

As plantas medicinais representam um notório reservatório de metabólitos bioativos que podem ser úteis na medicina, indústria e agricultura. Esse potencial pode não estar relacionado apenas às características intrínsecas dessas plantas, mas também a comunidade de seus fungos endofíticos associados. Desta forma, o presente trabalho contribui para o conhecimento da comunidade de fungos endofíticos associados à planta medicinal *C. guianensis* e do seu potencial valor biotecnológico. Além disso, este estudo sugere que:

- De acordo com as análises de diversidade e comparações com os relatos encontrados na literatura foi possível observar que a comunidade de fungos endofíticos associados a *C. guianensis* apresentou alta diversidade e baixa dominância, indicando que os táxons encontrados estão distribuídos de forma homogênea dentro da comunidade. Por outro lado, a comunidade de fungos apresentou moderada riqueza de espécies;
- A maioria dos táxons encontrados dentro do complexo *Phomopsis/Diaporthe* apresentou baixa similaridade com as sequências depositadas no GenBank, sugerindo que as folhas de *C. guianensis* podem representar um reservatório de possíveis novas espécies dentro deste complexo. Entretanto, estudos taxonômicos mais detalhados serão necessários para a identificação destes táxons;
- A maioria dos táxons identificados neste trabalho já foi relatada como fitopatógenos, sugerindo que a interação entre fungos endofíticos e *C. guianensis* pode se tratar de uma relação antagônica balanceada;
- Os táxons *P. cf. quercicola*, o qual apresentou atividade contra *E. coli* e *E. endophytica*, ativo contra *T. cruzi* foram relatados pela primeira vez como produtores de metabólitos bioativos, o que os tornam interessantes modelos para novos estudos de bioprospecção;
- As condições escolhidas para o cultivo dos fungos endofíticos podem influenciar drasticamente na produção de metabólitos secundários bioativos, assim como a escolha do solvente para a extração destes metabólitos, parâmetros que podem favorecer a obtenção e maiores quantidades de metabólitos de interesse a serem extraídos;

- Meios de culturas complexos e ricos em glicose (açúcares) parecem favorecer a produção de metabólitos secundários bioativos. Extratos produzidos nestes meios apresentaram atividade em concentrações mais baixas;
- Na maioria das condições avaliadas, as temperaturas 25° e 30°C se mostraram as melhores para a produção de metabólitos bioativos, uma vez que tais temperaturas podem ser próximas das condições que estes endofíticos são encontrados na natureza;
- Os extratos produzidos pelos fungos *Pilidiella* cf. *quercicola* e *Endomelanconiopsis endophytica* e aqueles obtidos por meio do teste fermentativo demonstraram-se promissores e estes podem conter moléculas protótipos para o desenvolvimento de novas drogas.

7 Referências Bibliográficas

AFTS-EUCAST. European Committee on Antibiotic Susceptibility. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E.Dis 7.1. Taufkirchen, Germany: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2002.

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.

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.

ARNOLD A. E.; MEJIA L. C.; KYLLO D.; ROJAS E. I.; ROBBINS N.; HERRE E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A. E.; HENK, D. A.; EELLS, R. L.; LUTZONI, F.; VILGALYS, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99:185–206, 2007.

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.

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 Biothechnology*, v. 3, p. 40-64, 2000.

BAEL, S. A. V.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M. C.; ROJAS, E. I. HERRE.; W. E. A. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. *Proc. R. Soc. B.* v276, p2419–2426, 2009.

BEGOUDE, B.A.D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; ROUX, J. The pathogenic potential of endophytic Botryosphaeriaceae fungi on *Terminalia* species in Cameroon. *Forest Pathology.* v41, p281–292, 2011.

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany.* v98(3): p 426–438, 2011.

BOUFLEUER, N. T. ASPECTOS ECOLOGICOS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aublet., MELIACEAE), COMO SUBSIDIO AO MANEJO E CONSERVACAO; Dissertação Mestrado. Rio Branco, UFAC, 2004.

BRUNDRETT, MC. 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.

BUATONG J.; PHONGPAICHIT, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal Microbiol Biotechnol.* v27: p3005–3008, 2011.

CANNON, P.F., SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia,* v. 94(2), p. 210–220, 2002.

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.

CARBONE, I. KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, v91, p 553-556, 1999.

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.

COLWELL, R. K.; MAO, C.X.; CHANG, J. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology* v85: p2717–2727, 2004.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAUJO, A. V.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M. C.C.A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 112, p. 122-126, 2007.

COLLADO, J.; PLATAS, G. & PELÁEZ. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. *Nova Hedwigia*. v. 63, p.347-360, 1996.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAUJO, A. V.; RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; FRAGA, M. C.C.A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.*, vol. 116, p. 495-500, 2008.

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.

DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. *Science*, v. 214, p. 987-994, 1981.

DREYFUSS, M.; CHAPELA, I. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. V26, p.49–80, 1994.

DUKE, J. A. Handbook of medicinal herbs. CRC. Press, Inc. Boca Raton, Fla, 1985.

FARIAS, M. P. O.; SOUSA, D. P.; ARRUDA, A. C.; ARRUDA, M. S. P.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Plantas. Mediciniais*, vol. 9, no 4, p.68-71, 2007.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A.Y., *Systematic mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Fungal Databases*, 2009.

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.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava*, v.62(3), p.251-257, 2007.

FREIRE, D. C. B., BRITO-FILHA, C. R. C., CARVALHO-ZILSE, G. A. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa* sp.) e Copaiba (*Copaifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colmeias, (Diptera:Phoridae) na Amazonia Central. *Acta Amazonica*, vol. 36, no 3, p. 365- 368, 2006.

FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol Res* 112:231–240, 2008.

GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia* 156:41–45, 2002.

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.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. A Novel Endophytic Taxol-Producing Fungus *Chaetomella raphigera* isolated From a Medicinal Plant, *Terminalia arjuna*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*, v3, p210-253, 2010.

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.

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.

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.

GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* P. 1 - 12, 2012.

GOND, S. K.; MISHRA, A.; SHARMA V. A.; VERMA, S. H. K.; KUMAR, J.; KHARWAR, R. N.; KUMAR, A. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience* v53, p113–121, 2012.

GONZÁLEZ, V.; TELLO, M. L. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, v47: p29–42, 2011.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, v.1, p.52-61, 2005.

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.

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.

HAMMER, M.L. ET AL. Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* 40(1):53-75. 1993.

HERRE, E. A.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; BUTLER, A.; VAN BAEL, S. Ecological implications of antipathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* v88, p50–558, 2007.

HO, M-Y.; CHUNG, W-C.; HUANG , H-C.; CHUNG, W-H.; CHUNG, W-H. Identification of Endophytic Fungi of Medicinal Herbs of Lauraceae and Rutaceae with Antimicrobial Property. *Taiwania*, v57: p229-241, 2012.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; SURVESWARAN, S.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. 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.

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.; PRIHASTUTI, 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 in current use. *Fungal Divers.* v39, p147–182, 2009.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M. G.; RESENDE, M.A.; DONNICI, C.. Antifungal properties of plants used in brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 632-637, 2007.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. *Fungal Diversity* v44, p117–133, 2010.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; VEIGA JR., V. F.; Nakamura, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.*, v28, p809–823, 2011.

JOSEPH, B.; PRIYA, M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potencial in Pharmaceutical Rffect: A Review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2011.

KLIMAS, C. A.; KAINER, K. A.; WADT, L. H.O. Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon. *Forest. Manag.* p. 256- 265, 2007.

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

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.

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.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PROKSC, P. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 2010.

KUMARAN, R. S.; KIM, H. J.; HUR, B-K. Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. V110, p 541–546, 2010.

KUROSE, D.; FURUYA, N.; TSUCHIYA, K.; TSUSHIMA, S.; EVANS, H. C. Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Mycological Research*, 2012.

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

LAINE, A-L. First report of *Phomopsis subordinaria* in a natural population of *Plantago lanceolata* in south-west Finland. *Plant Pathology*, v 52, p422, 2003.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery *Trends in Microbiology*, v15, p279-289, 2008.

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.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*. V106, p 548–554, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. A.. *Plantas Medicinais no Brasil. Nativas e Exóticas*. 2ª Edição, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, v151, p67–73, 2000.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MAZA, M. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v41, 2005.

MELO, A.S. O que ganhamos ‘confundindo’ riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotropica*, v. 8, p. 21-27, 2008.

MENDONCA, F. A. C., SILVA, K.F.S., SANTOS, K.K., JUNIOR, K. L. R., SANT’ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, vol. 76, p.629 -636, 2005.

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.

MIOT, H. A.; BATISTELLA, R. F.; BATISTA, K. A.; VOLPATO, D. E. C.; AUGUSTO, L. S. T.; MADEIRA, N. G.; HADDAD, V.; MIOT, L. D. B. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes* sp. *Rev. Inst. Med. Trop.*, vol. 46, no 5, p. 253-256, 2004.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*. v98: p380–386, 2008.

MORTON, J.F. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Charles C. Thomas, Illinois. 1981.

NIEKERK, J. M. V.; GROENEWALD, J. Z. E.; VERKLEY, G. J. M.; FOURIE, P. H.; WINGFIELD, M. J.; CROUS, P. W. Systematic reappraisal of *Coniella* and *Pilidiella*,

with specific reference to species occurring on Eucalyptus and Vitis in South Africa. Mycol. Res. v108: p283–303, 2004.

NILSSON, R. H.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K.; KVIST, E. S.; KRISTIANSSON, E. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. FEMS Microbiol Lett. V296, P97–101, 2009.

NILSSON, H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERGAND, N.; LARSSON, K. H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evolutionary Bioinformatics, v. 4, p. 193–201, 2011.

ORDUÑA, R. F.N.; SANCHEZ, S.R.A.; BUSTAMANTE, Z.R.F.; RODRIGUEZ, G.J.N.; COTERA, L.B.F. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). Fungal Diversity, 47:65–74, 2011.

PANG, K-L.; LILIAN L.P.; VRIJMOED; GOH, T. K.; PLAINGAM, N.; JONES, E. B. G. Fungal endophytes associated with *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) in Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. Botanica Marina. v51, p171–178, 2008.

PARK, Y.H.; LEE, S. G.; AHN, D. J.; KWON, T. R.; PARK, S. U.; LIM, H. S.; BAE, H. Diversity of Fungal Endophytes in Various Tissues of *Panax ginseng* Meyer Cultivated in Korea. J Ginseng Res Vol. 36, No. 2, 211-217, 2012.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; MATAS, M.T.D.; GARCÍA, J.B.; VAL, A.G.; GONÁLEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P. MARTÍN; I. PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. Mycological Research. v. 102, p.755-761, 1998.

PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins. v.1, p.185-196, 1992.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Microbiology of the Phyllosphere. Fokkema, N.J.& Van den Hevel, Cambridge University Press, 1986.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunol Med Microbiol.* v48, p367–372, 2006.

PINTO, G. P. O oleo de andiroba. In: Boletim Técnico, Instituto Agrônômico do Norte 31, p119. 1956.

PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; HUGE, E.; MACKENZIE, C.; HYDE, K. D.; JEEWON, R. A. Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, v.53, p.579-590, 2007.

RADIC, N.; STRUKELJC, B. Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 2012.

RAJAGOPAL, K.; MAHESWARI S.; KATHIRAVAN G. Diversity of endophytic fungi in some tropical medicinal plants – A report. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(12), pp. 2822-2827, 2012.

RAVINDRA, N.; KHARWAR; SATISH, K.; VERMA; MISHRA, A.; SURENDRA, K.; GOND; VIJAY, K.; SHARMA; AFREEN, T.; KUMAR A. Assessment of diversity, distribution and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from a medicinal plant *Adenocalymma alliaceum* Miers. *Symbiosis*, v55, p39–46, 2011.

REDECKER, D., KODNER, R., GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. v289, p1920–1921, 2000.

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.

RODRIGUES, K.F.; & DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. bumidicola*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 31, p. 905-909, 1996.

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., HERRE, E. A., MEJIA, L., CHAVERRI, P. SAMUELS, G. J. *Endomelanconiopsis*, a new anamorph genus in the Botryosphaeriaceae. *Mycologia* v100, p760–775, 2008.

ROJAS, E. I.; REHNER, S. A.; SAMUELS, G. J. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia*, v102, p. 1318–1338, 2010.

ROSA, L. H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; WEDGE, D. E.; PAN, Z.; BERNIER, U. R.; BECNEL, J. J.; AGRAMONTE, N. M.; WALKER, L. A.; MORAES, R. M. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with Micropropagated Medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *American Journal of Plant Sciences*, v3, p1105-1114, 2012.

ROSA, L. H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; PAN, Z.; WEDGE, D. E.; MORAES, R. M. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smilax* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Can. Journal Microbiology*, v58, p1202–1211, 2012.

ROY, A. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 2, p. 191-201, 2006.

RUMA, K.; SHAILASREE, S.; SAMPATH, K. K. K.; NIRANJANA, S. R.; PRAKASH, H. S. Diversity of Fungal Endophytes from Two Endemic Tree Species *Artocarpus hirsutus* Lam. And *Vateria indica* Linn. of Western Ghats, India. World Journal of Agricultural Sciences 7 (5): 577-582, 2011.

RYAN, G.S.; HARPER, D. A. T.; WHALLEY, J. S. PALSTAT, Statistics for palaeontologist. Champman & Hall, London, 1995.

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.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of Endophyte-plant symbioses. Trends in plant science, v. 9, p. 275-280, 2004.

SANTIAGO; I. F.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P. A. JR; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia Antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. 2012.

SANTO, R. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. Natural Product Report, v27, p1084–1098, 2010.

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 species definition. Fungal Biology, v114, p255–270, 2010.

SATHISH, L.; PAVITHRA, N.; ANANDA, K. Antimicrobial Activity and Biodegrading Enzymes of Endophytic Fungi from *Eucalyptus*. International Journal Pharmaceutical Sciences and Research. v3(8): p2574-2583, 2012.

SIEBER, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biol Rev.* v21, p75–89, 2007.

SIQUEIRA, V. M.; CONTI, R.; ARAÚJO, J.M.; MOTTA, C. M.S. Endophytic Fungi from the Medicinal Plant *Lippia Sidoides* Cham. and their Antimicrobial Activity. *Symbiosis* v53: p89–95, 2011.

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.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, v.106: p.996-1004, 2002.

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.

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.

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

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 comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova*, v. 32, p. 498-502, 2009.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, p. 491-502, 2003.

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

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

STROBEL, G. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol.* v. 22, p315-33, 2002.

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

SULTAN, S. *Bioactive Polyesters in Marine and Plant Endophytic Fungi*. Licensee In Tech, 2012.

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.

SURYANARAYANAN, T. S.; WITTLINGER, S. K.; FAETH, S. H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research*, v. 109, p. 635-639, 2005.

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

TEJESVI, M.V.; TAMHANKAR, S.A.; KINI, K.R.; RAO, V.S.; PRAKASH, H.S. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Fungal Diversity* v38: p167-183, 2009.

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

TONINI, H., KAMINSKI, P. E.. Processo Tradicional da Extração e Usos do Óleo da Andiroba em Roraima. *Documentos 14 – Embrapa*. 2009.

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.

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.

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

VAZ, A.B. M.; BRANDÃO L. R.; VIEIRA M. L. A.; PIMENTA, R. S.; MORAIS, P. B.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A. Diversity and antimicrobial activity of

fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(13), pp. 3173-3185, 9 April, 2012.

VEJA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M. C.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD A. E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. Fungal Ecology, v3, p122–138, 2010.

VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parenteral strains. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 96, p. 1005-1011, 2001.

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.

YANG X, GUO S, ZHANG L, SHAO H. Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. Natural Product Research and Development.; v15: p419-422, 2003.

YANG, Y.L., LIU, Z.Y., CAI, L., HYDE, K.D., YU, Z.N. AND MCKENZIE, E.H.C. Colletotrichum anthracnose of Amaryllidaceae. Fungal Diversity v39: p123-146, 2009.

YANG, J.; XU, F.; HUANG, C.; LI, J.; SHE, Z.; PEI, Z.; LIN, Y. Metabolites from the Mangrove Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. (#zsu-H76). Eur. J. Org. Chem. p3692–3695, 2010.

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.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. *Nature*, v. 292. p. 449-451. 1981.

WHITE J. F. JR.; TORRES M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol Plant* 138:440–446, 2010.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum Gloeosporioides* Species Complex. *Studies in Mycology* v73: p115–180, 2012.

WENZEL, J. B.; GARCÍA; A.; FILHO, C; J; R.; PRIOLI, A; J;; PAMPHILE, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biol Res* 43: 375-384, 2010.

WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI S; VANGRONSVELD, J. Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Curr Opin Biotechnol* 20:248–254, 2009.

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, J. F. JR, TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiol Plant* v138: p440–446, 2010.

WICKLOW, D.T., ROTH, S., DEYRUP, S.T., GLOER, J.B.. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research* v109, p610–618, 2005.

XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Diversity* v4, :p15–31, 2010.

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.

ZHANG, B.; SALITURO, G.; SZALKOWSKI, D.; LI, Z.; ZHANG, Y.; ROYO, I.; VILELLA, D.; DÍEZ, M. T.; PELAEZ, F.; RUBY, C.; KENDALL, R. L.; MAO, X.; GRIFFIN, P.; CALAYCAY, J.; ZIERATH, J. R.; HECK, J. V. SMITH, R. G.; MOLLER, D. E. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, v. 284, p. 974-977, 1999.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep* 23:753–771, 2006.

ZUCCARO, A., LAHRMANN, U., GULDENER, U., LANGEN, G., PFIFFI, S., BIEDENKOPF, D., WONG, P., SAMANS, B., GRIMM, C., BASIEWICZ, M. Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathog.* v7, 2011.