

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS À PLANTAS BIOATIVAS DO BRASIL E ESTADOS
UNIDOS**

Camila Rodrigues de Carvalho

BELO HORIZONTE
2015

Camila Rodrigues de Carvalho

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS À PLANTAS BIOATIVAS DO BRASIL E ESTADOS
UNIDOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa

Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais – ICB/UFMG

Coorientadores: Dr. Carlos Augusto Rosa

Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Leveduras
– ICB/UFMG

Dr. David Wedge

Dr. Charles L. Cantrell

Natural Products Utilization Research Unit - National Center for Natural
Products Research – United States Department of Agriculture
(ARS/NPURU/USDA)

Belo Horizonte

2015

Colaboradores:

Dr. Zhiqiang Pan

Natural Products Utilization Research Unit - National Center for Natural Products Research –
United States Department of Agriculture (ARS/NPURU/USDA)

Dra. Rita Moraes

National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy / Center for Water and
Wetland Resources – The University of Mississippi

Dr. Victor L. Madoxx

Geosystems Research Institute – Mississippi State University

Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral

Departamento de Ciências Naturais – Universidade Federal de São João Del-Rei

Dr. Marcos José Salgado Vital

Departamento de Biologia – Universidade Federal de Roraima

Dra. Gilmara Maria Duarte Pereira

Centro de Estudos da Biodiversidade – Universidade Federal de Roraima

Dr. Jerri Edson Zilli

Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro

Dra. Krisle da Silva

Embrapa Roraima, Boa Vista, Roraima

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor de todas as coisas, obrigada pela fidelidade, misericórdia infinita, amor e sustento. Obrigada por cuidar de mim mesmo quando eu não percebia. Minha eterna gratidão por realizar em minha vida todos os seus desígnios. A Maria, minha Mãe, obrigada pelo cuidado, intercessão e presença constante;

Ao Prof. Luiz Rosa, agradeço pela orientação, discussões e confiança, essenciais para a realização deste trabalho. Muito obrigada por todas as oportunidades a mim oferecidas durante o período em que estive no laboratório. E claro, agradeço também pelo apoio, amizade, agradável convivência e disponibilidade;

Ao Prof. Carlos Rosa, agradeço primeiramente por ter me recebido tão bem em seu laboratório há alguns anos. Muito obrigada pela orientação, correções, valiosas sugestões e opiniões, paciência e confiança;

A querida equipe de trabalho do USDA: aos *advisors* Dr. David Wedge e Dr. Charles Cantrell, agradeço pela coorientação, ensinamentos, recepção, oportunidades e confiança. Aos técnicos Linda Robertson, Ramona Pace, Amber Callahan, Solomon Green III e Marilyn Ruscoe, obrigada pela adorável convivência, pelos ensinamentos, supervisão, paciência e carinho. Guardarei com saudade todo o tempo em que estive trabalhando com vocês! “*USDA Team Work!*”

Aos membros da banca examinadora, Dr^a. Susana Johann, Dr^a. Mariana Vieira, Dr. Aristóteles Góes-Neto e Dr^a. Betania Cota, assim como Dr. Daniel Santos e Dr^a. Tânia Alves, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que certamente serão muito importantes para a melhoria e continuidade dos nossos estudos;

Ao Prof. Daniel de Assis Santos, relator desta tese, pelas sugestões e contribuições;

Aos colaboradores Rita Moraes, Victor Madoxx, Marcos Sobral, Gilmara Duarte, Krisle Silva, Marcos Vital, Jerri Zilli e também aos mateiros de RR, obrigada pelo auxílio nas coletas; e

Zhiqiang Pan, obrigada por disponibilizar a infraestrutura do laboratório do seu grupo de pesquisa para realização dos experimentos;

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pela oportunidade, e a Fapemig pelo apoio financeiro e oportunidade da bolsa Doutorado Sanduíche;

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia-ICB/UFMG;

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

Ao pessoal do LPCM do Instituto René Rachou/FIOCRUZ, e do NAGE/UFMG, em especial ao Juliano Leal (em memória), por toda ajuda e por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização dos sequenciamentos;

A todos os amigos (antigos e mais recentes) dos Laboratórios de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais, e Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, pelos bons momentos que compartilhamos e pela agradabilíssima convivência. Em especial a Mari Vieira pela amizade e por ter me ensinado a prática dos endofíticos;

A todas as Curicas, muito obrigada pela amizade, companheirismo, gordices e boas risadas. Vocês são demais! Em especial a Frãn, obrigada pela amizade, companhia e alegria!

A minhas Batutas, Mari “Zé”, Barbara e Té, é praticamente impossível descrever quão grata sou a Deus por ter vocês como amigas. Muito obrigada pelo companheirismo de cada dia. Obrigada pelas reuniões Brasil-EUA via Skype e pela presença constante. Estar com vocês é sempre muito bom!

Ao trio desespero, pelas longas conversas, parceria e compartilhamento de dúvidas durante esses 4 anos,

A Vivi, que de amiga passou à siamesa e então à afilhada! Muito obrigada pela amizade, paciência, apoio, discussões, ajuda e por dividir a bancada comigo desde o primeiro dia que entrei no lab. Desejo que você realize todos os seus projetos, seja sempre muito feliz, e alcance todo o sucesso e reconhecimento que merece;

A Mari “Zé”, obrigada por essa alegria e companhia diária, por me ajudar tanto e principalmente nos últimos meses. Desejo que Deus realize em sua vida as coisas mais belas! Te adoro!

A Alice, rommie, muito obrigada pela companhia durante o doc sanduíche, pelas conversas intermináveis e por tudo que me ensinou. Muito sucesso pra você!

À Mara, filhota, obrigada por ter sido meu braço direito no último ano. Sua ajuda, dedicação, responsabilidade e competência foram essenciais para a finalização desse trabalho. Você brilha e vai longe!!!

Aos meus pais, Geraldo e Lúcia, meu tesouro e exemplo de vida, muito obrigada pelo apoio, orações, por acreditarem e investirem em mim. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado;

Ao meu querido irmão e amigo João Paulo, agradeço por existir e alegrar os meus dias. Muito obrigada também por me apoiar e incentivar a cada decisão;

A minha família Rodrigues e Carvalho, obrigada pelo amor, suporte, orações e por estarem sempre presentes;

As minhas queridas, Marina, Roberta, Maísa e Ma Esteves, obrigada pela convivência, carinho e apoio. Em especial a Mary “Lindoca” que sempre esteve logo ali ao lado!

As minhas eternas amigas, Ma, Sil, Mariela, Lorena, Mari Amorim, Ma Mendes e Jackie, obrigada por se fazerem sempre presentes apesar da distância física e por compreenderem a minha ausência;

Aos queridos amigos de Oxford, internacionais e brasileiros, muito obrigada por tornarem a estadia tão agradável e prazerosa. Em especial agradeço a Nat, a Elzita, Thati, Mari e Mi, pela amizade que perdura, risadas, presença, ajuda, apoio, viagens e compras. Vocês tornaram tudo mais especial!

Ao Plínio, Paula, Brauner, Gi, João, Luciano, Teteu, Ramiro e Kaka que aos poucos se tornaram pessoas tão especiais. Obrigada pela amizade e presença!

A todos do Ministério de Música Sementes da Trindade e do EJC, Encontro de Jovens com Cristo, pelas orações e convivência;

Enfim, muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para que este estudo pudesse ser concluído!!!

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	22
1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Biologia de microrganismos endofíticos	26
2.2 Fungos endofíticos: uma rica fonte de metabólitos bioativos	32
2.3 Seleção de plantas para isolamento de microrganismos endofíticos	36
2.4 Gênero <i>Copaifera</i> L.: <i>C. langsdorffii</i> (Desf.) Kuntze e <i>C. pubiflora</i> Benth	38
2.5 <i>Echinacea purpurea</i> L. (Moench.)	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo Geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Espécimes vegetais	47
4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos	48
4.3 Identificação dos fungos endofíticos	49
4.3.1 Extração do DNA total	49
4.3.2 Amplificação do DNA utilizando o iniciador (GTG) ₅	51
4.3.3 Amplificação do DNA utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4	51
4.3.4 Amplificação do fragmento gênico da β -tubulina	52
4.3.5 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4	53
4.3.6 Purificação dos amplicons	54
4.3.7 Reação de sequenciamento e precipitação das amostras	54
4.3.8 Análise computacional das sequências	55
4.4 Diversidade da comunidade fúngica: cálculo dos índices de abundância, riqueza e dominância	56
4.5 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos	57

4.5.1 Extratos etanólicos	57
4.5.2 Extratos diclorometânicos	58
4.5.3 Cultivo dos fungos em larga escala	59
4.6 Ensaios biológicos	59
4.6.1 Ensaio antimicrobiano de microdiluição em placa	59
4.6.1.1 Padronização dos inóculos	60
4.6.1.2 Triagem da atividade antimicrobiana	61
4.6.1.3 Cálculo da concentração inibitória mínima (CIM)	63
4.6.2 Determinação da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos	63
4.6.2.1 Ensaios de bioautografia contra os fitopatógenos	63
4.6.2.2 Ensaio de microdiluição em placa com as substâncias antifúngicas obtidas contra os fitopatógenos	64
4.7 Seleção dos extratos bioativos para análise química	65
4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	66
4.9 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos	66
4.9.1 Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos	66
4.9.2 Identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos	67
4.9.3 Reação de diazotação – produção de ésteres metílicos dos ácidos graxos	68
4.10 Fracionamento químico biomonitorado	68
4.11 Análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)	69
4.12 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	69
4.13 Cromatografia Líquida acoplada a um Espectrômetro de Massas (CL-EM/EM)	69
4.14 Elucidação estrutural dos constituintes químicos	70
5 RESULTADOS	71
5.1 Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados <i>Copaifera langsdorffii</i> e <i>C. pubiflora</i>	71
5.1.1 Coleta, isolamento e identificação dos fungos endofíticos	71
5.1.2 Diversidade de fungos endofíticos associados à <i>Copaifera langsdorffii</i> e <i>C. pubiflora</i>	90
5.1.3 Triagem da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em placa	96

5.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ativos	101
5.1.5 Determinação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia	105
5.1.6 Análise química, fracionamento biomonitorado e identificação dos metabólitos bioativos	107
5.2 DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A <i>Echinacea purpurea</i> L. (Moench.)	112
5.2.1 Coleta, isolamento e identificação dos fungos endofíticos	112
5.2.2 Análise da diversidade de fungos endofíticos associados a <i>E. purpurea</i>	117
5.2.3 Determinação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia	121
5.2.4 Análise química, fracionamento biomonitorado e identificação dos metabólitos bioativos	123
5.3 Ensaio de microdiluição em placa com as substâncias isoladas	134
6 DISCUSSÃO	144
6.1 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos associados à <i>Copaifera langsdorffii</i> , <i>C. pubiflora</i> e <i>Echinacea purpurea</i>	144
6.2 Diversidade dos fungos endofíticos associados à <i>Copaifera langsdorffii</i> , <i>C. pubiflora</i> e <i>Echinacea purpurea</i>	149
6.3 Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à <i>Copaifera langsdorffii</i> , <i>C. pubiflora</i> e <i>Echinacea purpurea</i>	151
7 CONCLUSÃO	159
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160
9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO	188
ANEXOS	196

RESUMO

Os fungos endofíticos são aqueles que, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais vivos sem causar sintomas aparentes de doença ou efeitos negativos a seus hospedeiros. Estes microrganismos podem ser encontrados em diferentes grupos vegetais e representam fontes promissoras de metabólitos bioativos de interesse farmacológico e na agricultura. Diferentes espécies de plantas medicinais vêm sendo utilizadas ao longo da história da humanidade no mundo. Dentre as espécies medicinais do Brasil, as do gênero *Copaifera* são utilizadas devido à ação anti-inflamatória e cicatrizante do seu óleo resina; nos Estados Unidos, *Equinacea purpurea* é amplamente utilizada devido à habilidade de estimular o sistema imunológico. Poucos estudos foram realizados com o objetivo de conhecer a micota endofítica dessas plantas, apesar do seu amplo emprego na medicina popular. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade de fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii*, *C. pubiflora* e *Equinacea purpurea*, bem como avaliá-las quanto à produção de metabólitos antimicrobianos. Novecentos e um isolados de fungos endofíticos foram obtidos associados às plantas medicinais *C. langsdorffii* (308 isolados), *C. pubiflora* (360 isolados) e *E. purpurea* (233 isolados). Os gêneros *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Guignardia/Phyllosticta* e *Pestalotiopsis* foram compartilhados pelas três plantas hospedeiras estudadas. Os táxons *Diaporthe* sp. 6, *Xylariaceae* sp. 1, *Diaporthales* sp. 1 e *Diaporthales* sp. 2 foram os dominantes em *C. langsdorffii*; *Diaporthe* sp. 5, *Guignardia* sp. 2, *Diaporthales* sp., *Diaporthe* sp. 8 e *Guignardia* sp. 1 em *C. pubiflora*; e *Alternaria alternata*, *Colletotrichum dematium* e *Stagonosporopsis* sp. 2 em *E. purpurea*. Os valores do índice de Fisher α demonstraram que a comunidade endofítica com maior diversidade foi a associada a *C. langsdorffii* (Fisher α = 16,6), seguida por *E. purpurea* (Fisher α = 14,96) e *C. pubiflora* (Fisher α = 7,23). A riqueza da comunidade fúngica de *C. langsdorffii* foi a mais alta (Margalef = 8,41), seguida por *E. purpurea* (Margalef = 7,52) e *C. pubiflora* (Margalef = 4,57). O índice de Simpson (dominância) exibiu valores próximos para as comunidades endofíticas associadas às três plantas hospedeiras (*C. langsdorffii* = 0,94, *C. pubiflora* = 0,90, *E. purpurea* = 0,84). Somente 11 (1,6%) extratos dos fungos associados às espécies de *Copaifera* apresentaram porcentagem de inibição de $\geq 70\%$ frente a pelo menos um dos microrganismos alvos, sendo selecionados para determinação da sua concentração inibitória mínima (CIM). Os extratos diclorometânicos de

Alternaria daucifolii UFMGCB 7491, *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696 e 7720, *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 e *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719, 7770, 7772 foram submetidos à espectroscopia de RMN ¹H, a qual possibilitou a detecção de sinais referentes a presença majoritária de ácidos graxos nos extratos de *A. daucifolii* UFMGCB 7491 e *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927. Os ácidos linoléico, palmítico e elaídico foram predominantes no extrato de *A. daucifolii* UFMGCB 7491, e os ácidos oléico, linoléico, estearidônico e palmítico no extrato de *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927. O fracionamento do extrato de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719 ocasionou a identificação de citocalasina H e citocalasina J, as quais apresentaram atividade antifúngica frente *Phomopsis obscurans* e *P. viticola*. Dos extratos dos endofíticos associados a *E. purpurea*, oito foram selecionados para análise química, sendo que os espectros de RMN ¹H de *Colletotrichum* sp. 4 EPU8FB, *Fusarium* sp. EPU9CB, *Nigrospora oryzae* EPU13CA, *Colletotrichum* sp. 4 EPU30CA, *Fusarium sporotrichioides* EPU36CA e *Sordariomycetes* sp. 2 EPU40CE exibiram sinais referentes a presença majoritária de ácidos graxos. Posteriormente, a presença de uma mistura de 16 ácidos graxos foi confirmada nos extratos destes fungos. O extrato diclorometânico de *Biscognauxia mediterranea* EPU38CA foi submetido ao fracionamento biomonitorado e isoladas duas substâncias, a (-)-5-metilmeleína e (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina. (-)-5-metilmeleína apresentou atividade antifúngica frente a *P. obscurans* e *P. viticola*, e com exceção de *C. gloeosporioides*, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina apresentou atividade frente a todos os demais microrganismos alvos, em pelo menos uma concentração e intervalo de tempo avaliados. Os efeitos antifúngicos observados nos extratos e frações selecionados, assim como a produção das citocalasinas H e J, (-)-5-metilmeleína e (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, reforçam a hipótese que a simbiose entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras pode produzir substâncias com atividade frente fitopatógenos e predadores das plantas em geral. Os resultados obtidos demonstraram que as plantas medicinais podem representar um promissor reservatório de fungos endofíticos, dentre eles táxons produtores de metabólitos bioativos.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms which live inside plant tissues or organs, without causing them any harmful symptoms. These microorganisms may be found in several species of plants and represent a promising source of bioactive metabolites for pharmacological and agricultural area. The medicinal plants have been used throughout human history in the world. Specifically in Brazil, the *Copaifera* genus are frequently used due its anti-inflammatory effects and wound healing of their oleoresin. In the United States, *Echinacea purpurea* is commonly used because it may stimulate the immune system. However, despite its ethnobotany use, few studies have been conducted in order to know their endophytic fungi communities. The aim of this study were to characterize the diversity of the community of endophytic fungi associated with *Copaifera langsdorffii*, *C. pubiflora*, *Equinacea purpurea* and evaluate it as a source of bioactive metabolites as well. Nine hundred-one endophytic fungal isolates were obtained in association with the medicinal plant *C. langsdorffii* (308 isolates), *C. pubiflora* (360 isolates) and *E. purpurea* (233 isolates). *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Guignardia/Phyllosticta* and *Pestalotiopsis* genera were shared among the three host plants. *Diaporthe* sp. 6, *Xylariaceae* sp. 1, *Diaporthales* sp. 1 e *Diaporthales* sp. 2 were the dominant species associated with *C. langsdorffii*; *Diaporthe* sp. 5, *Guignardia* sp. 2, *Diaporthales* sp., *Diaporthe* sp. 8 e *Guignardia* sp. 1 with *C. pubiflora*; and *Alternaria alternata*, *Colletotrichum dematium* and *Stagonosporopsis* sp. 2 with *E. purpurea*. The fungal community associated with *C. langsdorffii* showed the highest diversity (Fisher α = 16.6), followed by *E. purpurea* (Fisher α = 14.96) and *C. pubiflora* (Fisher α = 7.23). The fungal community of *C. langsdorffii* showed the highest species richness (Margalef = 8.41), followed by *E. purpurea* (Margalef = 7,52) and *C. pubiflora* (Margalef = 4,57). The Simpson index (dominance) showed close values for the three communities (*C. langsdorffii* = 0.94, *C. pubiflora* = 0.90, *E. purpurea* = 0.84). Only 11 (1.6%) extracts from *Copaifera* species showed $\geq 70\%$ inhibition against at least one target microorganism, and those extracts were selected for the minimal inhibitory concentrations determination (MIC). The dichloromethane extracts of *Alternaria daucifolii* UFMGCB 7491, *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696 and 7720, *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 and *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719, 7770, 7772 were submitted to ^1H NMR spectrometry. The extracts of *A. daucifolii* UFMGCB 7491 and *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 were predominately composed of fatty acids. The linoleic,

palmitic and elaidic acids were the predominant in the *A. daucifolii* UFMGCB 7491 extract. The oleic, linoleic, stearidonic and palmitic acids in the *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 extract. The *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719 extract was fractionated and two pure compounds were identified, cytochalasin H and cytochalasin J. Those compounds showed antifungal activity against *Phomopsis obscurans* e *P. viticola*. Eight extracts from endophytic fungi associated to *E. purpurea* were selected for chemical analysis. The ¹H NMR analysis indicated that the extracts of *Colletotrichum* sp. 4 EPU8FB, *Fusarium* sp. EPU9CB, *Nigrospora oryzae* EPU13CA, *Colletotrichum* sp. 4 EPU30CA, *Fusarium sporotrichioides* EPU36CA and *Sordariomycetes* sp. 2 EPU40CE were predominately composed of fatty acids. Further analysis of all of the extracts confirmed the presence of a mixture of 16 fatty acids. Using a bioassay-guided purification approach (-)-5-methylmellein and (-) (3R)-8-Hydroxy-6-methoxy-3,5-dimethyl-3,4-dihydroisocoumarin were obtained from *Biscognauxia mediterranea* EPU38CA. The (-)-5-methylmellein showed antifungal activity against *P. obscurans* and *P. viticola*. The (-) (3R)-8-Hydroxy-6-methoxy-3,5-dimethyl-3,4-dihydroisocoumarin was not able to inhibited the *C. gloeosporioides* growth, however the substance showed activity against all the others microorganism tested in at least one concentration and time of incubation. The antifungal effects observed in extracts and fractions selected, as well as the cytochalasin H, cytochalasin J, (-)-5-methylmellein and (-) (3R)-8-hydroxy-6-methoxy-3,5-dimethyl-3,4-dihydroisocoumarin production give evidence that the symbiotic relationship between endophytic fungi and their host plants may be able to produce substances against pathogenic fungi and herbivores animals. The results obtained in this study showed that medicinal plants can represent a reservoir of endophytic fungi promising for bioprospecting.

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 endofítico – patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que o fenômeno mostrado pode não ser universal. (D) Estratégia de sobrevivência do endofítico. (E) Equilíbrio sinérgico. (Fonte: KUSARI et al., (2012a), com modificações). 31
- Figura 2.** Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos. 36
- Figura 3:** Proporção de isolados biologicamente ativos de diferentes fontes testados para atividade antimicrobiana em pesquisas recentes. Adaptado de Yu et al. (2010). 37
- Figura 4.** Processo de extração artesanal do óleo resina realizado a partir de canaletas feitas no tronco da árvore de *Copaifera pubiflora* – RR (Foto: C.R. de Carvalho – 18/01/2012). 40
- Figura 5.** Espécimes de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora* (Foto: C.R. de Carvalho). 42
- Figura 6.** Espécime de *Equinacea purpurea* (Fotos: L.H. Rosa & C.R. de Carvalho). 45
- Figura 7 -** Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada na triagem da atividade antimicrobiana. 62
- Figura 8.** Número de isolados e porcentagem de fungos endofíticos associados a folhas, caules e sementes de *Copaifera langsdorffii* (Desf.) Kuntze e *Copaifera pubiflora* Benth. 71
- Figura 9.** Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA,

utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Alternaria*, (b) *Cladosporium*, (c) *Aspergillus*, (d) *Chaetomium* (e) *Colletotrichum*.

76

Figura 10. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Curvularia*, (b) *Diaporthales* sp.1, (c) *Diaporthales* sp.2, (d) *Fusarium*, (e) *Diplodia*, (f) *Guignardia*.

77

Figura 11. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Hypoxylon*, (b) *Muscodor*, (c) *Neopestalotiopsis*, (d) *Lecythophora*, (e) *Penicillium*, (f) *Pestalotiopsis*.

78

Figura 12. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Pleosporales* sp.2, (b) *Preussia*, (c) *Trichoderma*, (d) *Sordariomycetes* sp.1, (e) *Xylariaceae*, (f) *Sordariomycetes* sp.2, (g) *Pleosporales* sp.1.

79

Figura 13. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram

construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises do gênero *Diaporthe*. 80

Figura 14. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Aspergillus*, (b) *Chaetomium*, (c) *Hypoxylon*, (d) *Diaporthales*, (e) *Penicillium*, (f) *Colletotrichum*. 81

Figura 15. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Neopestalotiopsis*, (b) *Pestalotiopsis*, (c) *Sordariomycetes*, (d) *Diaporthe*. 82

Figura 16. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Neopestalotiopsis*, (b) *Aspergillus*, (c) *Botryosphaeria*, (d) *Chaetomium*, (e) *Colletotrichum*. 85

Figura 17. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o

método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Diaporthales*, (b) *Fusarium*, (c) *Guignardia*, (d) *Penicillium*, (e) *Hypoxyton*, (f) *Pleosporales*.

86

Figura 18. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Pestalotiopsis*, (b) *Pseudofusicoccum*, (c) *Xylariaceae*, (d) *Diaporthe*.

87

Figura 19. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Aspergillus*, (b) *Neopestalotiopsis*, (c) *Chaetomium*, (d) *Amphisphaeriaceae*, (e) *Pestalotiopsis*.

88

Figura 20. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. A árvore representa a análise do gênero: *Diaporthe*.

89

Figura 21. Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii*. As curvas foram construídas com intervalo de 95% de confiança: (a) amostragem de folhas, (b) amostragem de caule, (c) amostragem de sementes, (d) amostragem total.

95

Figura 22. Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Copaifera pubiflora*. As curvas foram construídas com intervalo de 95%

de confiança: (a) amostragem de folhas, (b) amostragem de caule, (c) amostragem de sementes, (d) amostragem total. 96

Figura 23. Espectros RMN ^1H dos extratos de *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696 e 7720, e *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719, 7770, 7772 exibiram sinais semelhantes referentes à presença de hidrogênios aromáticos. 108

Figura 24. Fluxograma de fracionamento químico biomonitorado do extrato diclorometânico de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719. 110

Figura 25. Isolados de fungos endofíticos associados a folhas e pedúnculos de *Echinacea purpurea* L. (Moench.). 112

Figura 26. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Echinacea purpurea* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Alternaria*, (b) *Cercospora*, (c) *Diaporthe*, (d) *Cladosporium*, (e) *Colletotrichum*, (f) *Fusarium*. 115

Figura 27. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Echinacea purpurea* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Phyllosticta*, (b) *Didymella*, (c) *Phoma*, (d) *Stagonosporopsis*. 116

Figura 28. Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Echinacea purpurea*. As curvas foram construídas com intervalo de 95%

de confiança: (a) amostragem de folhas, (b) amostragem de caule, (c) amostragem de sementes, (d) amostragem total. 120

Figura 29. Fluxograma de fracionamento químico biomonitorado do extrato diclorometânico de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA. 128

Figura 30. Cromatograma de CG-EM das substâncias A e B. **a.** Fração F5. **b.** Fração F6. 131

Figura 31. Substâncias isoladas a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato diclorometânico do fungo *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA. 134

Figura 32. Médias de inibição do crescimento (%) de *Botrytis cinerea* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 137

Figura 33. Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum acutatum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 138

Figura 34. Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum fragariae* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 139

Figura 35. Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum gloeosporoides* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 140

Figura 36. Médias de inibição do crescimento (%) de *Fusarium oxysporum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 141

Figura 37. Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis obscurans* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 142

Figura 38. Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis viticola* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento. 143

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Critério utilizado para caracterizar classes de fungos endofíticos, segundo Rodriguez et al. (2009). 27
- Tabela 2.** Identificação dos fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii* utilizando o programa BLASTn, o banco de sequências do NCBI GenBank, bem como análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 6. 73
- Tabela 3.** Identificação dos fungos endofíticos associados à *Copaifera pubiflora* utilizando o programa BLASTn, o banco de sequências do NCBI GenBank, bem como análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 6. 83
- Tabela 4.** Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a folhas, caules e sementes de *Copaifera langsdorffii*. 91
- Tabela 5.** Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a folhas, caules e sementes de *Copaifera pubiflora*. 93
- Tabela 6.** Índices de diversidade dos fungos endofíticos isolados de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora*. 94
- Tabela 7.** Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos dos fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora* contra bactérias e fungos alvos. 98
- Tabela 8.** Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas e amostras de caules de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora* contra bactérias e fungos alvos. 99
- Tabela 9.** Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólicos vegetais bioativos. 102

Tabela 10. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólicos e diclorometânicos dos fungos endofíticos bioativos.	104
Tabela 11. Atividade antifúngica de extratos diclorometânicos dos fungos endofíticos e vegetais bioativos pelo método de bioautografia contra espécies <i>Colletotrichum</i> .	106
Tabela 12. Quantificação de ácidos graxos (em porcentagem) em extratos produzidos por fungos endofíticos e seu hospedeiro.	109
Tabela 13. Identificação dos fungos endofíticos associados à <i>Equinacea purpurea</i> utilizando o programa BLASTn, o banco de sequências do NCBI GenBank, bem como análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 6.	113
Tabela 14. Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a folhas e hastes florais de <i>Equinacea purpurea</i> .	118
Tabela 15. Índices de diversidade dos fungos endofíticos isolados de <i>Equinacea purpurea</i> .	120
Tabela 16. Atividade antifúngica de extratos diclorometânicos dos fungos endofíticos associados à <i>Equinacea purpurea</i> pelo método de bioautografia frente espécies <i>Colletotrichum</i> .	122
Tabela 17. Quantificação de ácidos graxos (em porcentagem) em extratos produzidos por fungos endofíticos associados à <i>Echinacea purpurea</i> .	124
Tabela 18. Quantificação de ácidos graxos (porcentagem) em frações obtidas pelo fracionamento do extrato diclorometânico de <i>Diaporthe cuppatea</i> EPU24CA.	126
Tabela 19. Atividade antifúngica das frações obtidas a partir do extrato bruto de <i>Biscogniauxia mediterranea</i> EPU38CA.	132
Tabela 20. Quantificação de ácidos graxos (porcentagem) em frações obtidas pelo fracionamento do extrato diclorometânico de <i>Biscogniauxia mediterranea</i> EPU38CA.	133

1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atualmente é crescente a necessidade por substâncias bioativas capazes de atuar na medicina, contra enfermidades e microrganismos resistentes, assim como na agricultura, como pesticidas mais eficientes e menos tóxicos. Na procura por esses metabólitos, os fungos se destacam como uma fonte promissora, com destaque para os fungos endofíticos, que são definidos funcionalmente, por sua ocupação assintomática no interior de tecidos de plantas. Supõe-se que diversas interações entre vegetais e microrganismos endofíticos possam ter sido estabelecidas ao longo dos anos, a partir do momento em que as primeiras plantas apareceram na Terra. Os fungos endofíticos desempenham importante papel nessa interação (fungo endofítico X planta hospedeira), como proteção contra a herbivoria, contribuição para a adaptação da planta a estresse biótico e abiótico, por aumentar a resistência à seca e estresse hídrico, bem como tolerância a alta temperatura e alta salinidade. Além de possuírem a capacidade de produzir inúmeros metabólitos secundários que são importantes nas interações entre o endofítico e a planta hospedeira, podem ser utilizados na agricultura e medicina, pois muitos possuem atividades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória e imunossupressora.

A existência de fungos endofíticos dentro de tecidos e órgãos de plantas assintomáticas é conhecida desde o final do século 19. Ao considerar todos esses anos de pesquisas e os relatos na literatura, supõe-se que todas as plantas possuam fungos endofíticos, os quais podem pertencer em sua maioria ao filo *Ascomycota*. A seleção das plantas para realizar o isolamento e identificação dos microrganismos endofíticos é um importante fator, por se considerar que em alguns casos os fungos endofíticos são capazes de produzir substâncias similares àquelas provenientes de suas plantas hospedeiras, mas também metabólitos bioativos diferentes. Dentre os critérios estabelecidos, há a escolha por plantas que apresentam histórico etnobotânico, ou seja, que são tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos, grupos étnicos e pela população.

As plantas medicinais têm sido utilizadas ao longo da história da humanidade. No Brasil, as espécies do gênero *Copaifera* são plantas comumente utilizadas, principalmente devido a ação anti-inflamatória e cicatrizante do seu óleo resina, e nos Estados Unidos, a espécie *Equinacea purpurea*, devido a ação moduladora do sistema imune. A partir do

exposto, e pela escassez de estudos a respeito da comunidade endofítica de *C. langsdorffi*, *C. pubiflora* e *E. purpurea*, estudos com foco nos fungos endofíticos associados a estas plantas, assim como na avaliação da capacidade desses fungos em produzir metabólitos bioativos, podem contribuir para o conhecimento da diversidade deste grupo de

5 microrganismos, bem como para a seleção de espécies produtoras de metabólitos com atividade antimicrobiana.

10

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biologia de microrganismos endofíticos

5 Os microrganismos endofíticos são aqueles que, pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais vivos sem causar sintomas aparentes de doença ou efeitos negativos a seus hospedeiros (BACON & WHITE, 2000; ARNOLD, 2007). Estes microrganismos são encontrados em diferentes tipos vegetais como árvores de grande porte, gramíneas e plantas herbáceas (STROBEL & DAISY, 2003; RIESS et al., 2014),
10 podendo ocorrer em caules, folhas (WILSON, 1995; TAN & ZOU, 2001; SCHULZ & BOYLE, 2005; CARVALHO et al., 2012, VAZ et al., 2014; FERREIRA et al., 2015), em raízes (RODRIGUEZ et al., 2009; VAZ et al., 2009), sementes (ASSUMPÇÃO et al., 2009; HODGSON et al. 2014) e espinhos (QADRI et al., 2014).

O termo “endofítico” foi proposto pela primeira vez por de Bary em 1866
15 (KUSARI et al., 2012a), e pode ser referido a protistas (PETERS, 1991), bactérias (KOBAYASCHI & PALUMBO, 2000) e fungos (STONE et al., 2000; CARVALHO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012), sendo os fungos, geralmente, os isolados com maior frequência (STROBEL & DAYSE 2003; STROBEL et al., 2004; TAN & ZOU, 2001). Evidências de microrganismos associados a vegetais encontrados em tecidos de cascas e
20 folhas fossilizados tem revelado que a associação endofítico-hospedeiro pode ter evoluído a partir do momento em que as primeiras plantas superiores apareceram na Terra (REDECKER et al., 2000; GUNATILAKA, 2005). Desse modo, supõe-se que diversas interações entre vegetais e microrganismos endofíticos podem ter sido estabelecidas ao longo dos anos, incluindo-se relações de especificidade entre os
25 microrganismos e as plantas hospedeiras (TAN & ZOU, 2001; STROBEL, 2003).

A existência de fungos endofíticos dentro de órgãos de plantas assintomáticas é conhecida desde o final do século 19 (GUERIN, 1898). Rodriguez et al. (2009) divide os fungos endofíticos em dois grandes grupos, de acordo com diferenças taxonômicas, plantas hospedeiras e funções ecológicas: os endofíticos clavicipitaceos (C-endofíticos),
30 que colonizam somente gramíneas; e os endofíticos não clavicipitaceos (NC-endofíticos) que são isolados de tecidos de plantas não vasculares, samambaias e angiospermas, com

ausência de sintomas. Contudo, o grupo dos NC-endofíticos são fungos altamente diversos que se divide em pelo menos três classes funcionais distintas, baseado em características de colonização do hospedeiro, mecanismo de transmissão entre gerações, níveis de biodiversidade e funções ecológicas, conforme Tabela 1.

5 **Tabela 1.** Critério utilizado para caracterizar classes de fungos endofíticos, segundo Rodriguez et al. (2009).

Critério	Clavicipitaceos	Não-clavicipitaceos		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Amplitude de hospedeiros	Restrita	Ampla	Ampla	Ampla
Tecido(s) colonizado(s)	Parte aérea e rizoma	Parte aérea, raiz e rizoma	Parte aérea	Raiz
Colonização na planta	Extensa	Extensa	Limitada	Extensa
Biodiversidade na planta	Baixa	Baixa	Alta	Desconhecido
Transmissão	Vertical e horizontal	Vertical e Horizontal	Horizontal	Horizontal
Benefícios*	NAH	NAH e AH	NAH	NAH

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

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos verticalmente da planta parental para a descendente (SAIKKONEN et al., 2004); ou horizontalmente, as folhas, logo após
10 emergirem, acumulam numerosas infecções por meio de germinação epifítica de propágulos fúngicos, seguido por penetração através da cutícula ou dos estômatos (SAIKKONEN et al., 1998; SCHULZ & BOYLE, 2005). A metodologia comumente utilizada para a detecção e quantificação dos fungos endofíticos ocorre por meio do
15 isolamento de superfícies desinfestadas de tecidos das plantas hospedeiras (STONE et al., 2000; HALLMANN et al., 2006), os quais pertencem em sua maioria ao filo *Ascomycota*, incluindo várias espécies de *Sordariomycetes* e *Dothideomycetes*. Os gêneros de fungos endofíticos comumente encontrados incluem: *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Phomopsis*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Daldinia*, e *Diaporthe/Phomopsis* (RODRIGUES &
20 SAMUELS, 1999; SURYANARAYANAN et al., 2002; SCHULZ & BOYLE, 2005;

ARNOLD, 2008; CARVALHO et al., 2012). Contudo, Vieira et al. (2012) obteve um isolado pertencente ao filo *Zygomycota* e 21 táxons pertencentes ao filo *Basidiomycota*, associados a *Solanum cernuum* Vell., apesar de representantes destes filios serem menos frequentemente encontrados como endofíticos.

5 Embora o método mais comumente utilizado combine desinfestação superficial e plaqueamento dos fragmentos, atualmente o aumento no interesse, e importância em conhecer os microrganismos não cultiváveis, conduziu à aplicação de métodos moleculares para a identificação (HALLMANN et al., 2009). Segundo Sun & Guo (2012), o processo consiste basicamente em: (1) extração do DNA genômico total
10 (incluindo fungos e plantas) de tecidos desinfestados das plantas, (2) amplificação de fragmentos do DNA (por exemplo: ITS) do DNA total com primers fúngicos específicos, (3) separação dos produtos do DNA (bandas) por eletroforese em gradiente de gel desnaturante (DGGE, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), e excisão de diferentes bandas de DGGE representando diferentes táxons, (4) clonagem de produtos de PCR
15 diretamente em plasmídeos e transferência à *E. coli* DH5 α , (5) triagem de clones positivos para diferentes táxons utilizando técnicas de DNA fingerprinting (por exemplo: PCR-RFLP), (6) sequenciamento de clones representativos com diferentes padrões de fingerprinting e bandas de DGGE, (7) identificação das sequências baseado em análises filogenéticas e comparação de similaridades.

20 De acordo com Ferrara (2006) e Strobel et al. (2004), todos os vegetais estudados até o momento demonstraram abrigar microrganismos endofíticos, sendo possível o isolamento de um elevado número de espécies a partir de um único hospedeiro. Cada hospedeiro vegetal pode abrigar uma comunidade característica de endofíticos; contudo, de acordo com Petrini et al. (1992), Carrol (1995), Rodrigues & Petrini (1997),
25 Saikkonen et al. (1998) e Strobel (2003), a composição e a frequência destes microrganismos podem ser significativamente afetadas por fatores como:

- A espécie do vegetal e sua distribuição geográfica,
- A umidade relativa do ambiente,
- 30 • A posição relativa da planta (sua altura em relação ao solo),
- Idade e parte da planta, dentre outros.

5 Acredita-se que a elevada riqueza de fungos endofíticos associados a folhas e caules de angiospermas seja devido à ampla diversidade de suas plantas hospedeiras (SAIKKONEN et al., 1998). As florestas tropicais e temperadas constituem os ecossistemas terrestres com maior biodiversidade do planeta, porém muitos autores concordam que a diversidade fúngica atinge seu ápice em florestas tropicais (ARNOLD et al., 2000; TAN & ZOU, 2001; STROBEL & DAISY, 2003; FERRARA, 2006). Em função disto, considera-se que uma variedade de espécies de microrganismos, provavelmente, ainda não foi identificada e caracterizada, principalmente, quando se considera a enorme diversidade de plantas existentes em diferentes ecossistemas (TAN & ZOU, 2001, VIEIRA, 2012). Diferentes estudos vêm demonstrando que plantas presentes em ecossistemas tropicais abrigam comunidades de fungos endofíticos com elevada riqueza e diversidade de espécies (VAZ et al., 2009, ABREU et al., 2010; GAZIS & CHAVERRI, 2010; CARVALHO et al., 2012, VIEIRA et al., 2012, VIEIRA et al., 2014; FERREIRA et al., 2015).

15 Algumas hipóteses procuram explicar a relação endofítico-planta hospedeira. Alguns autores consideram que a distinção entre patógenos e mutualistas ainda não é clara, e que as interações entre o endofítico e a planta hospedeira podem variar entre e dentro de populações e comunidades (PETRINI, 1986; CARROL, 1995; SAIKKONEM et al., 1998; GUNATILAKA, 2005). Kogel et al. (2006) acreditam que microrganismos endofíticos podem se tornar parasitas sob determinadas condições e vice-versa, e que a interação endofítico-hospedeiro pode alterar de mutualismo para parasitismo de um modo contínuo e em função de inúmeras variáveis.

25 Strobel e Daisy (2003) consideram a hipótese de que, em função da enorme diversidade existente, os microrganismos endofíticos podem ser sapróbios ou patógenos oportunistas. O fato de alguns fitopatógenos serem de origem endofítica reforçaria essa hipótese, na medida em que tais microrganismos são capazes de causar infecções sintomáticas na planta quando esta se encontra submetida a condições de estresse.

30 Já de acordo com Schulz e Boyle (2005), a colonização assintomática de um tecido ou órgão vegetal por um endofítico resultaria de uma relação antagônica balanceada, onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do microrganismo e as respostas de defesa do hospedeiro. Esta hipótese foi inicialmente proposta para demonstrar como

um endofítico evitaria a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, garantindo assim a sua auto-resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro, além de conseguir crescer no tecido vegetal sem causar manifestações visíveis de infecção ou doença (Figura 1) (SCHULZ & BOYLE, 2006). Kusari e colaboradores (2012a) descrevem que a hipótese propõe que a colonização assintomática trata-se de um balanço de antagonismo entre o hospedeiro e o endofítico. Endofíticos e patógenos possuem muitos fatores de virulência que são neutralizados pelos mecanismos de defesa da planta. Os autores ainda relatam que se a virulência do fungo e os mecanismos de defesa da planta estão equilibrados, a associação permanece aparentemente assintomática e avirulenta (esta fase é apenas um período transitório onde fatores ambientais desempenham um papel importante para desestabilizar o delicado equilíbrio estabelecido); e que se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência do fungo, este pode morrer; inversamente, se a planta sucumbir à virulência do fungo, o relacionamento planta/patógeno pode levar a planta à doença (isto porque muitos endofíticos podem possivelmente ser patógenos latentes, os quais podem ser influenciados por certas condições ambientais ou intrínsecas para expressar fatores que conduziria a patogenicidade). Assim, a variabilidade dessa interação dependeria não só da adaptação do microrganismo endofítico a um determinado hospedeiro ou órgão em particular, mas como também de fatores como a virulência inata do endofítico, a resposta de defesa da planta e as condições ambientais.

Alguns estudos vêm mostrando as funções ecológicas da interação entre microrganismo endofítico e hospedeiro. Os fungos endofíticos beneficiam-se pela nutrição e proteção conferidos pelos hospedeiros, e podem conferir a planta tolerância ao estresse biótico e abiótico, aumentando a biomassa e diminuindo o consumo de água, reduz a herbivoria e ataque de insetos, resistência contra patógenos e captação de nutrientes (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996; TAN & ZOU, 2001; RODRIGUEZ et al., 2009; NAIR & PADMAVATHY, 2014). A proteção contra herbivoria ocorre por meio de metabólitos secundários bioativos produzidos pelos fungos, como por exemplo, a peramina e lolina (atividade inseticida), e lolitrem B e ergovalina (atividade citotóxica) (ALEXOPOULOS et al., 1996; SCHULZ & BOYLE, 2005). Como importante exemplo

desta interação, tem-se a proteção conferida por fungos endofíticos pertencentes à família *Xylariaceae* à espécies de plantas do gênero *Fagus*: metabólitos secundários produzidos por estes fungos possuem efeito repelente contra insetos, afetando as larvas do besouro *Physocnemum brevilineum*, um dos principais vetores de doenças para este gênero de planta (AZEVEDO et al., 2000).

5

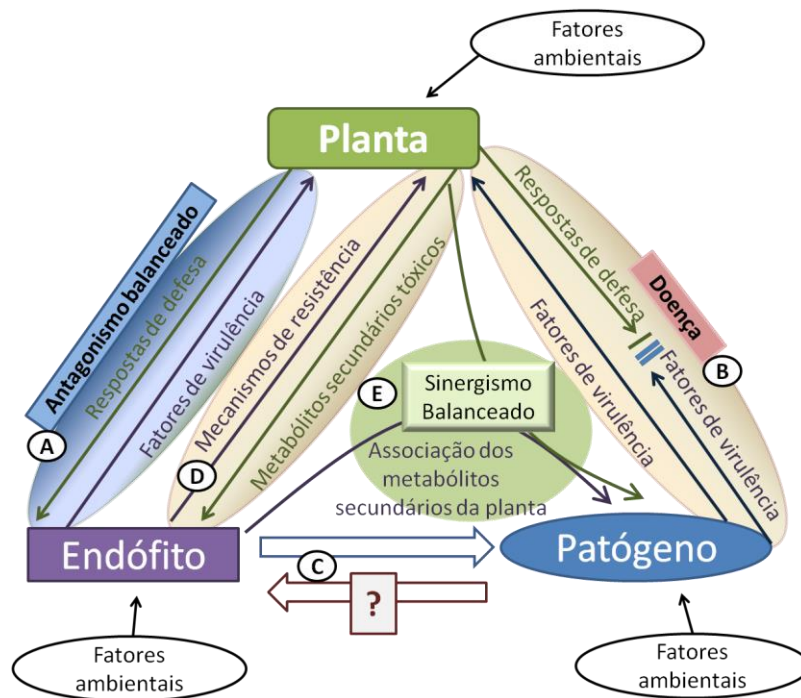


Figura 1. Esquema da interação fungo endofítico/planta hospedeira. (A) Hipótese do antagonismo balanceado. (B) Condição de doença causada por fatores de virulência do fungo. (C) Reciprocidade endofítico – patógeno. O ponto de interrogação (?) indica que o fenômeno mostrado pode não ser universal. (D)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

Além da proteção contra herbivoria, os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos podem proteger suas plantas hospedeiras frente microrganismos fitopatogênicos. Combès et al. (2012) ao estudar a diversidade de fungos endofíticos associados a planta medicinal asiática *Cephalotaxus harringtonia* (Siebold & Zucc.) Koidz, verificaram que *Paraconiothyrium variable*, endofítico específico desta planta, exercia proteção à mesma frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Tal proteção ocorreu devido à produção de metabólitos secundários da família das oxilipinas, os quais

10

exerceram importante perturbação na estrutura do micélio fúngico, além de diminuir a produção de micotoxinas a partir de *F. oxysporum*.

2.2 Fungos endofíticos: uma rica fonte de metabólitos bioativos

5

Por milhares de anos, os produtos naturais e/ou estruturas de produtos naturais desempenham um papel altamente significativo em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas, assim como no descobrimento e desenvolvimento de fármacos (CHIN et al., 2006; SURYNARAYANAN et al., 2009; NEWMAN & CRAGG, 10 2012).

Os produtos naturais são definidos usualmente como substâncias químicas isoladas de diversos seres vivos, sendo oriundos do metabolismo primário e/ou secundário (BÉRDY, 2005). Os metabólitos secundários são substâncias de baixo peso molecular (<3000) que a princípio são “dispensáveis” para a sobrevivência e 15 desenvolvimento do microrganismo; além disso, são extremamente diversos quimicamente e continuamente modificados e adaptados às contínuas mudanças por pressão seletiva ambiental (DEMAIN, 1981; BÉRDY, 2005). Entre os metabólitos secundários incluem os antibióticos, toxinas, alcalóides, fatores de crescimento para a planta e o interesse por estes metabólitos é considerável, pois muitos possuem 20 importância médica, industrial e/ou agrícola (CALVO et al., 2002).

Os microrganismos constituem uma das principais fontes de produtos naturais com propriedades bioativas desejáveis, porém constituem uma das fontes menos estudadas e que sem dúvida oferecem grandes possibilidades para obtenção de novas estruturas e atividades biológicas (BRIZUELA et al., 1998; SURYNARAYANAN et al., 25 2009). No grupo dos microrganismos, os fungos estão entre os mais importantes e que estão sendo utilizados como fonte de metabólitos com aplicações clínicas (BRIZUELA et al., 1998; SURYNARAYANAN et al., 2009). No grupo dos fungos, os endofíticos, em especial aqueles associados a plantas medicinais, têm se tornado foco de pesquisas de metabólitos bioativos (HYDE & SOYTONG, 2008, CARVALHO et al., 2012; VIEIRA 30 et al., 2014, SILVA-HUGHES et al., 2015). O percentual de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos é bem mais elevado em comparação com

outros grupos de microrganismos endofíticos, o que pode ser devido, em parte, a alta frequência de isolamento de fungos endofíticos em relação aos demais microrganismos (RADIC & STRUKELJ, 2012). Bills et al. (2010) demonstraram que endofíticos de regiões tropicais produzem maior número de metabólitos ativos quando comparados àqueles presentes em outras regiões, e que 51% das substâncias bioativas isoladas a partir de fungos endofíticos eram até então desconhecidas.

Com o avanço dos estudos da biologia molecular e, conseqüentemente, com a detecção dos fungos não cultiváveis, a nova estimativa de espécies fúngicas sugere a existência de aproximadamente 3,5 a 5,1 milhões de táxons, dos quais somente cerca de 100 mil já foram descritos até o momento (BLACKWELL, 2011). Desta forma, investigar os metabólitos produzidos por fungos, em especial os endofíticos podem aumentar as chances de encontrar novos modelos estruturais de produtos naturais bioativos (YU et al., 2010). A capacidade de produção de metabólitos secundários dentre os fungos é frequentemente descrita em táxons dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (BÉRDY, 2005). Alguns destes metabólitos têm sido úteis para o desenvolvimento de novos fármacos, dentre estes se destacam os alcalóides, terpenóides, flavonóides e esteróides. Estes metabólitos podem apresentar atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e antitumoral; e também atuar no controle biológico de agentes fitopatógenos, dentre outras aplicações; o que abre novas perspectivas para o tratamento de inúmeras doenças (STROBEL & DAYSE, 2003; STROBEL et al., 2004; JOSEPH & PRIYA, 2011). Estes metabólitos secundários são também importantes nas interações entre o endofítico e a planta hospedeira, pois podem atuar em processos de sinalização, defesa contra patógenos e regulação da simbiose (SCHULZ & BOYLE, 2005; GUO et al. 2008).

As pesquisas com fungos endofíticos na busca de moléculas protótipos aumentaram consideravelmente após a descoberta do diterpeno paclitaxel, um agente anticâncer amplamente utilizado na clínica. O taxol foi inicialmente isolado do vegetal *Taxus brevifolia*, e posteriormente do fungo endofítico *Taxomyces andrenae*, obtido a partir deste vegetal (STIERLE et al., 1995). Posteriormente, outros exemplos foram descritos como: a produção do inibidor de síntese de RNA, a **camptotecina**, obtida do fungo endofítico *Nothapodytes foetida* (PURI et al., 2005a); a **podofilotoxina**, sintetizada

por espécies vegetais do gênero *Podophyllum*, com atividades antitumoral, antiviral, antibacteriana, imunestimulante, e empregada na síntese de inibidores da topoisomerase, que é também sintetizada pelo o fungo endofítico *Trametes hirsuta*, isolado da espécie *P. hexandrum* (PURI et al., 2005b); a produção de **hipericina** com uma extensa variedade de atividades biológicas, por um fungo endofítico isolado de *Hypericum perforatum* (KUSARI et al., 2008); a **azadirachtina A**, um inseticida natural exclusivamente isolado de árvore *Azadirachta indica* A. Juss, também produzido pelo fungo endofítico *Eupenicillium parvum* isolado pela primeira vez desta espécie vegetal (KUSARI et al., 2012b); **vimblastina e vincristina**, utilizadas como fármacos anti-câncer, produzidas pela planta *Catharanthus roseus* e também por *Fusarium oxysporum*, fungo endofítico isolado desta espécie (KUMAR et al., 2013); **glicosídeo digoxina**, utilizado em tratamento cardíaco, inicialmente isolado da espécie *Digitalis lanata*, foi produzido por cinco isolados de fungos endofíticos, DL-3, DL-11, DL-12, DS-20 e DS-22 (espécies não relatadas) (KAUL et al., 2013).

É importante destacar que os fungos endofíticos também são potentes produtores de metabólitos secundários bioativos diferentes dos produzidos pelas plantas hospedeiras e de interesse para utilização na medicina e agricultura. Como exemplo, dentre as moléculas bioativas produzidas a partir deste grupo de fungos tem-se:

- **Criptocandina** (Figura 2a): lipopeptídio isolado de *Cryptosporiopsis quercina* associado à planta medicinal *Tripterigeum wilfordii*, (*Celastraceae*). Este metabólito mostrou excelente atividade antifúngica contra alguns importantes patógenos humanos como *C. albicans* e *Trichophyton* spp. (STROBEL & DAISY, 2003). Criptocandina é também ativo contra os fungos fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (STROBEL et al., 2004).

- **Pestaloσίdeo** (Figura 2b): beta-glicosídeo aromático produzido por *P. microspora* isolado de *Torreya taxifolia* (*Cephalotaxaceae*), que possui atividade antifúngica (STROBEL et al., 2004).

- **Pestacina e Isopestacina** (Figuras 2c e 2d): obtidos de *P. microspora* isolado da planta *Terminalia morobensis*, família *Combretaceae*, ambos exibem atividade antimicrobiana e antioxidante (STROBEL & DAISY, 2003).

- 5 • **Cochlioquinona A e Isocochlioquinona A** (Figuras 2e e 2f): metabólitos obtidos a partir do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. (UFMGCB 555), isolado da planta *Piptadenia adiantoides* (*Fabaceae*), ambos exibem atividade contra *Leishmania amazonensis*, com valor de CI_{50} de 1,7 μ M e 4,1 μ M, respectivamente (CAMPOS et al., 2008).

- 10 • **Altenusina** (Figura 2g): metabólito obtido a partir extrato orgânico de cultura do fungo endofítico *Alternaria* sp. (UFMGCB 55), isolado da planta *Trixis vauthieri* (*Asteraceae*), apresenta atividade inibitória frente *Trypanosoma cruzi*, sendo capaz de inibir a atividade da enzima TryR com um valor de CI_{50} de 4,3 mM
- 15 (COTA et al., 2008).

- **Ofiobolina K e 6-epi-ofiobolina K** (Figura 2h e 2i): substâncias obtidas a partir do fungo endofítico *Aspergillus calidoustus*, isolado da planta *Acanthospermum australe* (*Asteraceae*), ambos exibiram atividade antifúngica frente fitopatógenos,
- 20 atividade tripanossomicida e citotóxica frente células tumorais humanas (CARVALHO et al., 2015).

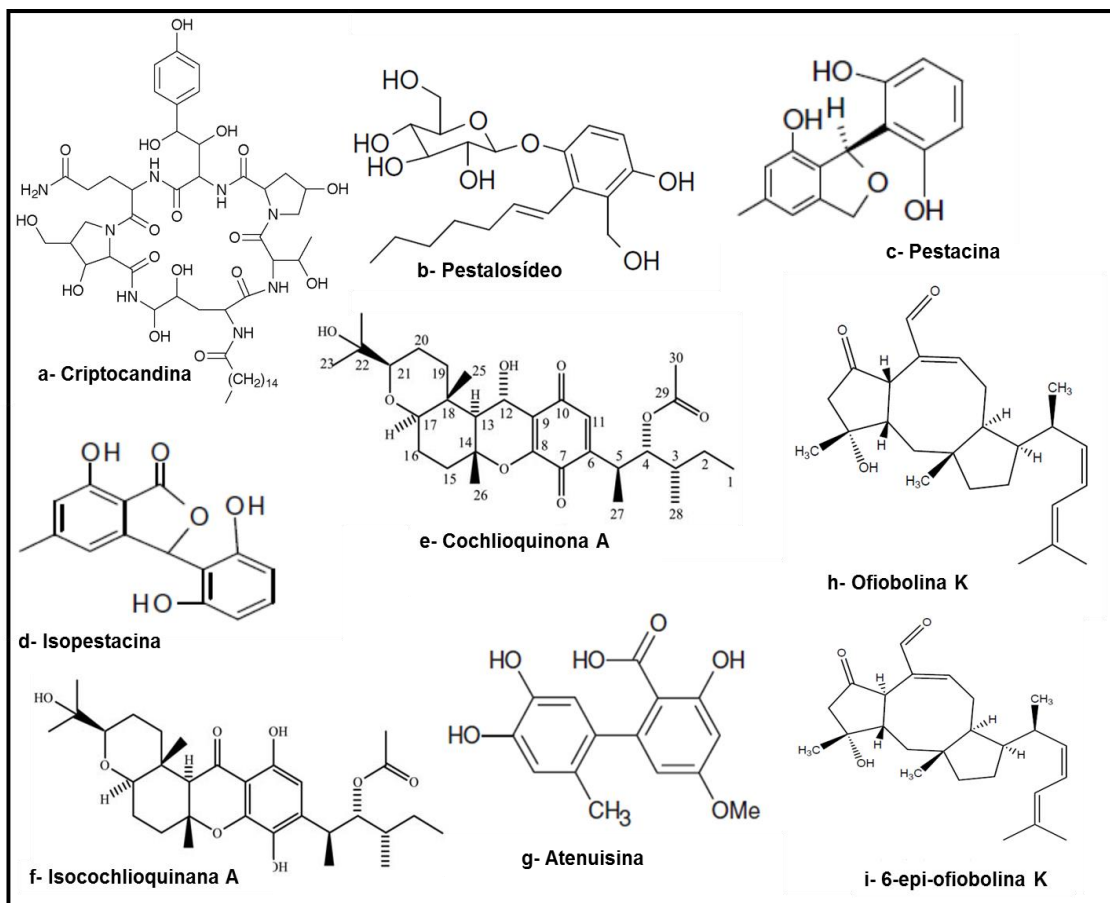


Figura 2. Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos.

2.3 Seleção de plantas para isolamento de microrganismos endofíticos

A identificação dos microrganismos endofíticos produtores da mesma substância bioativa produzida pelos vegetais, ou diferente, pode resultar em determinadas vantagens para obtenção de metabólitos bioativos de interesse tal como a eliminação das etapas de plantio, colheita e extração de plantas raras ou de crescimento lento, além de reduzir o preço do produto, uma vez que poderia ser produzido por meio de processos fermentativos (STROBEL, 2002). Ao selecionar as plantas para realizar o isolamento e identificação dos microrganismos endofíticos é importante entender os métodos e razões para fornecer as melhores oportunidades para tal isolamento, portanto é necessário observar os seguintes critérios: 1) Plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns; 2) Plantas que apresentam

histórico etnobotânico, ou seja, que são tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos, grupos étnicos e pela população de um modo geral; 3) Plantas endêmicas de determinadas regiões que apresentam longevidade incomum e que estão localizadas em ambientes ancestrais; 4) Plantas cujo desenvolvimento se dá em áreas de grande biodiversidade, tal como em florestas temperadas e tropicais; 5) Plantas que crescem rodeadas por plantas infectadas e ainda assim não apresentam sintomas (STROBEL et al., 2004; YU et al., 2010). Entre as estratégias descritas, a busca por plantas que medicinais constitui uma escolha empregada por nosso grupo de pesquisas, além de pesquisadores em todo o mundo, o que pode ser visto no levantamento de Yu e colaboradores (2010), os quais demonstraram que as plantas medicinais foram frequentemente estudadas para triagem de endofíticos capazes de produzir metabólitos antimicrobianos (Figura 3).

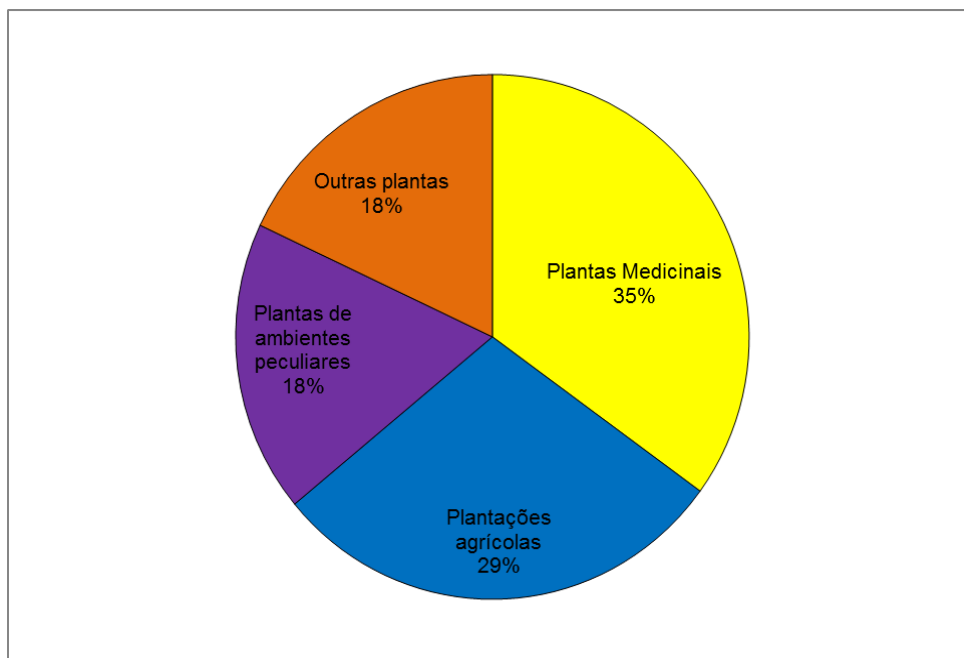


Figura 3: Proporção de isolados biologicamente ativos de diferentes fontes testados para atividade antimicrobiana em pesquisas recentes. Adaptado de Yu et al. (2010).

Ao considerar a ocorrência de quase 300 mil espécies de plantas na terra e que cada uma pode ser hospedeira de um ou mais endofíticos (STROBEL & DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004), é alta a probabilidade de se encontrar microrganismos capazes de produzir substâncias com atividade biológica. Muitas plantas endêmicas dos biomas

brasileiros, tais como Cerrado, Caatinga, floresta Amazônica e Mata Atlântica vêm sendo empregadas como medicamentos pela população no tratamento de doenças. Além disso, muitas plantas exóticas introduzidas no Brasil desde a colonização foram também incorporadas na medicina popular (MESQUITA et al., 2007). Portanto, fica clara a importância da realização de estudos de diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas medicinais.

2.4 Gênero *Copaifera* L.: *C. langsdorffii* (Desf.) Kuntze e *C. pubiflora* Benth

O gênero *Copaifera* L. (Leguminosae – Caesalpinioideae) é conhecido popularmente como copaíba, pau d'óleo, dentre outras. As copaibeiras são árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 m de diâmetro (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002). As árvores possuem folhagem densa e constituída de folhas compostas pinadas, alternas com folíolos coriáceos de 3-6 cm de comprimento (LORENZI & MATOS, 2008). Possui inflorescência branca, podendo ser ligeiramente rosadas, e sem pétalas, seus frutos são legumes deiscentes com 3,5 a 4,0 cm, ovóides, com uma única semente, negra, e cobertas com um arilo amarelo (ALMEIDA et al., 1998) ou branco. Sua floração é de novembro a fevereiro com pico em janeiro, em alguns casos entendendo-se até junho, com frutificação de maio a outubro com pico em julho, mas excepcionalmente nos primeiros meses do ano (AZEVEDO, 2003).

Os trabalhos realizados sobre o gênero *Copaifera* estão, em sua maioria, relacionados com o óleo que é exudado do tronco destas árvores, o óleo de copaíba (Figura 4). Este óleo é acumulado em cavidades do tronco da árvore de onde, pelo processo artesanal, é extraído através de furos e recolhido com auxílio de tubos ou canaletas, apenas uma vez cada ano (LORENZI & MATOS, 2008). O óleo é composto por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos (PATITUCCI et al., 1995). Em estudo realizado por Veiga Jr. et al. (1997), na análise por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR/EM) observou-se que em diversos óleos de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos analisados.

Por esta razão, este diterpeno ácido pode ser usado como biomarcador de óleos de copaíba.

Na medicina tradicional dos índios brasileiros, desde o período pré-colombiano, o óleo tem sido usado externamente, no tratamento de doenças da pele e como proteção
5 contra picada de insetos. Hoje em dia, as aplicações medicinais do óleo de copaíba atingem todas as regiões do Brasil, sendo administrados oralmente e por aplicação tópica do óleo in natura ou em pomadas (MACIEL et al., 2002). Na medicina popular é utilizado como cicatrizante e anti-inflamatório local e, internamente, como diurético, expectorante e antimicrobiano das afecções urinárias e da garganta (LORENZI & MATOS, 2008). Este óleo é utilizado contra enfermidades como hemoptises, sinusite, anti-inflamatório, anti-séptico, anti-reumático, para tratamento de asma e laxante (ALMEIDA et al., 1998). Além do óleo-resina, o extrato da casca também é utilizado na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório, antisséptico, antitumoral e como agente para tratar bronquites, úlceras e doenças de pele (VEIGA JUNIOR & PINTO, 15 2002).

Santos et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos extraídos diretamente do tronco das seguintes espécies de *Copaifera*: *C. multijuga* (Amazonas), *C. officinalis* (Rondonia), *C. reticulata* e *C. martii* (Pará), *C. reticulata* e *C. paupera* (Acre), *C. lucens* (Rio de Janeiro), *C. langsdorffii* (São Paulo), e *C. cearensis* (Minas Gerais). Os
20 autores verificaram que os óleos obtidos de *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* (Acre), exibiram boa atividade frente bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *S. epidermidis* ATCC 12228, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), incluindo *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) ATCC 33591, com CIM variando de 31,3-62,5 µg/ml. Já os óleos extraídos de *C. paupera* e *C. lucens*
25 apresentaram atividade antifúngica frente *Trichophyton rubrum* ATCC 28189 e *Microsporum canis* ATCC 32903, e o óleo de *C. cearenses*, *C. langsdorffii* e *C. multijuga* apresentaram atividade moderada somente frente *T. rubrum* (CIM = 250-500 µg/ml). Os óleos de copaíba foram inativos frente aos dermatófitos *T. mentagrophytes* ATCC 4481, *M. gypseum* ATCC 14683, as leveduras *Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis*
30 ATCC 28707 e *C. parapsilosis* ATCC 22019; e as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC

25933, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Shigella flexinerii* ATCC 12022 e *Enterobacter cloacae* ATCC 13047.



Figura 4. Processo de extração artesanal do óleo resina realizado a partir de canaletas feitas no tronco da árvore de *Copaifera pubiflora* – RR (Foto: C.R.de Carvalho – 18/01/2012).

Copaifera langsdorffii (Desf.) Kuntze, conhecida popularmente como copaíba, 5 bálsamo, pau d'óleo, óleo de copaíba e copaíba vermelha é uma espécie arbórea de grande porte podendo alcançar até 35 m de altura (Figura 5a) (LORENZI, 1992). Pode ser encontrada no Brasil, Argentina e Paraguai, sendo no Brasil particularmente importante por estar distribuída em todo o território, da Amazônia a Santa Catarina (VEIGA JR. & PINTO, 2002), ocorrendo principalmente nos estados de Minas Gerais, 10 Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (LORENZI, 1992). Habita mata de galeria, mata mesofítica de interflúvio, cerradão distrófico e cerrado (ALMEIDA et al., 1998).

Com relação aos extratos produzidos a partir das folhas e cascas de *C. langsdorffii*, poucos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar suas possíveis atividades biológicas. A atividade citotóxica de extratos metanólicos de folhas de *C. langsdorffii* coletadas em Minas Gerais foram avaliadas contra linhagens de células tumorais: B16 (modelo murino), HL-60 (leucemia humana), MCF-7 (mama) e HCT-8 (côlon humano) (SANTOS JÚNIOR et al., 2010). Na triagem inicial, os extratos metanólicos das folhas de copaíba, testados a concentração final de 125 µg/mL, inibiram em mais de 100% a proliferação de todas as linhagens tumorais alvo. Posteriormente, foi realizado o ensaio de CI₅₀ em que os valores atribuídos foram: 37,1 µg/mL para B16; 12,9 µg/mL para MCF-7; 43,3 µg/mL para HCT-8; e não foi determinado para HL-60. Os autores concluem que os extratos de *C. langsdorffii* poderiam ser utilizados no desenvolvimento de novos produtos antitumorais.

Copaifera pubiflora Benth (Figura 5b) é uma espécie de ocorrência no Brasil, Colômbia, Guiana e na Venezuela (MARTINS-DA-SILVA et al. 2008). Espécie com ampla distribuição no norte da América do Sul, sendo que na Amazônia brasileira, só foi coletada no extremo norte, no estado de Roraima, onde está amplamente distribuída. Habita várzeas e savanas, podendo também ser encontrada em matas de terra firme (MARTINS-DA-SILVA et al. 2008). De acordo com Costa et al. (2007), *C. pubiflora* é a principal espécie produtora de óleo resina no estado de Roraima e praticamente inexistem estudos ecológicos com a espécie no Brasil. Nenhuma pesquisa referente a estudos de atividade biológica utilizando extratos de folhas e/ou cascas de *C. pubiflora* foi encontrado.

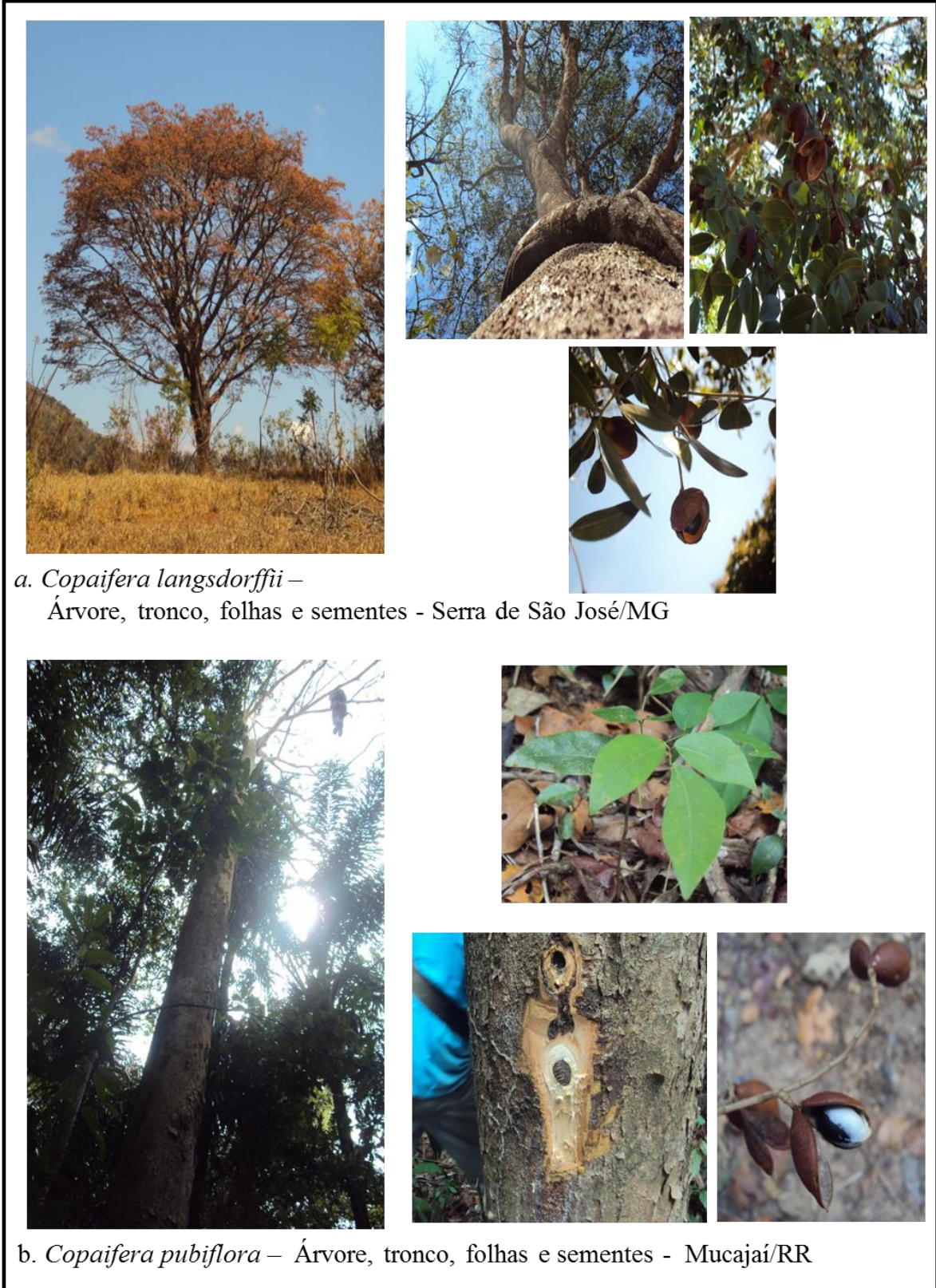


Figura 5. Espécimes de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora* (Foto: C.R.de Carvalho).

2.5 *Echinacea purpurea* L. (Moench.)

Espécies do gênero *Equinacea* (*Asteraceae*) são distribuídas em grande parte da América do Norte, desde Alberta (sul do Canadá), ao Golfo do México e oeste das Montanhas Rochosas (FLAGEL et al., 2008), sendo *Echinacea purpurea* e *E. angustifolia* as mais amplamente encontradas (AULT, 1999). *Echinacea purpurea* é a mais resistente, com a capacidade de suportar grandes variações de temperatura e umidade do solo em seu habitat (GREENFIELD & DAVIS, 2004) e é amplamente cultivada em todo território dos Estados Unidos, Canadá e Europa, especialmente na Alemanha, devido sua beleza e propriedades medicinais comprovadas (BARRETT, 2003).

Equinacea purpurea L. (Moench.) (Figuras 6a,b), conhecida popularmente como *purple coneflower*, é uma herbácea perene caracterizada por uma haste principal vertical, folhas alternadas em hastes longas, flores laranja-avermelhada cercadas por brácteas arroxeadas (BARRETT, 2003), com o período de floração de Junho a Agosto. *Echinacea purpurea* é o segundo suplemento botânico mais vendido no mercado dos EUA devido a propriedade de ser moduladora do sistema imunológico (PUGH et al., 2005) (Figura 6c). De acordo com Stanisavljevic et al. (2009), tanto as raízes, quanto as folhas ou toda a planta, podem ser utilizados na preparação de suplementos alimentares. Tais produtos e extratos compreendem um dos maiores setores no mercado de medicina herbal redendo milhares de dólares na América do Norte e Europa, logo, esta espécie tem recebido atenção global devido o aumento no valor medicinal (ABBASI et al., 2007).

A composição dos extratos das raízes é bem diferente quando comparada com a composição dos extratos da parte superior da planta. Nas raízes são encontrados mais óleos voláteis e alcalóides pirrolizidínicos, como tussilagínea e isotussilagínea, que as partes aéreas. Os principais metabólitos ativos da parte aérea são as alquilamidas e polissacarídeos, como o 4-O-metilglucoronilarabinosilanas, ramnoarabinogalactanas e arabinogalactana ácida e glicoproteínas (PERCIVAL, 2000; LU et al., 2003).

Echinacea purpurea é amplamente utilizada pela população devido sua tradição medicinal para prevenção ou redução de resfriados e gripes (GREENFIELD & DAVIS, 2004), em casos de tosse, bronquites, infecções respiratórias superiores e algumas

condições inflamatórias (PERCIVAL, 2000). Além da utilização descrita, Stanisavljevic et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos da parte aérea de *E. purpurea* pelo método de difusão em poços de ágar. Os extratos etanólicos produzidos foram testados a 20 mg/mL e inibiram o crescimento de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538, *C. albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, com diâmetro das zonas de inibição variando de 10,9 a 25,7 mm.

Com relação a interação entre microrganismos e espécies de *Echinacea*, poucos trabalhos foram realizados com o objetivo de verificar a diversidade de fungos endofíticos e sua utilização como fontes de metabólitos bioativos, por exemplo. Rosa et al. (2012) obtiveram 39 isolados de fungos endofíticos associados a folhas, brotos laterais, e raízes de quatro plantas micropropagadas de *E. purpurea*. A atividade biológica dos extratos diclorometânicos produzidos a partir dos isolados obtidos foi avaliada pelo método de bioautografia, sendo que um total de 16 (41%) extratos demonstrou atividade antifúngica quando testados a 80 e 160 µg/ponto frente espécies fitopatogências de *Colletotrichum*. Além disso, o extrato de *Mycocleptodiscus indicus* UM28 apresentou 100 e 200% de mortalidade nas concentrações de 125 e 62,5 p.p.m., respectivamente, contra larvas de *A. aegypti*.

20



a. *Echinacea purpurea* – Missouri/EUA.



b. Folhas, flor, raízes e hastes florais de *E. purpurea*.



c. Pílulas produzidas a partir da parte aérea de *E. purpurea*.

Figura 6. Espécime de *Echinacea purpurea* (Fotos: L.H. Rosa & C.R.de Carvalho).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- 5 Caracterizar a diversidade de fungos endofíticos associados às plantas medicinais *Copaifera langsdorffii* (Desf.) Kuntze, *C. pubiflora* Benth e *Echinacea purpurea* L. (Moench) presentes em ecossistemas do Brasil e Estados Unidos, bem como estudar estes microrganismos como fonte de metabólitos com atividade antimicrobiana.

10 3.2 Objetivos específicos

1. Obter fungos endofíticos associados a folhas, cascas e sementes de *C. langsdorffii* e *C. pubiflora*;
2. Obter fungos endofíticos associados a folhas e hastes florais de *E. purpurea*;
- 15 3. Depositar todos os isolados obtidos em uma coleção de culturas (Coleção de Microrganismos e Células da UFMG) para preservação *ex situ* da biodiversidade;
4. Identificar os fungos obtidos utilizando técnicas de taxonomia molecular;
5. Determinar a diversidade das espécies de fungos endofíticos associados às plantas hospedeiras;
- 20 6. Cultivar os fungos obtidos e preparar seus extratos brutos etanólicos e diclorometânicos;
7. Verificar a atividade biológica dos extratos fúngicos e vegetais obtidos contra microrganismos de interesse clínico, ambiental e agrícola;
8. Selecionar isolados fúngicos para estudo químico;
- 25 9. Identificar os metabólitos bioativos presentes nos extratos brutos e frações ativas produzidos a partir dos isolados selecionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécimes vegetais

5 Neste trabalho foram selecionadas três espécies de plantas medicinais para isolamento dos fungos endofíticos, sendo duas coletadas no Brasil e uma nos Estados Unidos da América, conforme descrito abaixo:

10 - *Copaifera langsdorffii*: 15 indivíduos foram coletados em 23/agosto/2011 no entorno da Serra de São José, localizada entre os municípios São João Del Rei, Coronel Xavier Chaves, Prados, Bichinhos e Tiradentes (21°05.105'S; 44°12.140'W), sul de Minas Gerais (Brasil). Uma exsicata representativa do material vegetal foi depositada no Herbário HUFSJ (Universidade Federal de São João Del Rei), com o número de tombamento 14283.

15 - *Copaifera pubiflora*: 15 indivíduos foram coletados em 17 e 18/janeiro/2012 na reserva ecológica experimental Serra da Prata, Mucajaí-Roraima/Brasil (2°35'59.1"N; 60°56'35.7"W). O local é mantido pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) – Roraima, para experimentos de longo período, sendo que a reserva ecológica é pertencente ao proprietário Osvaldo Antônio Sant'ana. Todas as permissões
20 necessárias foram obtidas pela Embrapa-Roraima (permissão de coleta obtida por Jerri E. Jilli) e do proprietário, para o estudo da área descrita. Os espécimes vegetais foram identificados a partir de suas estruturas vegetativas e reprodutivas, e por meio de comparações com exsicatas previamente depositadas no Herbário IAN - João Murça Pires (CPATU - Embrapa).

25 - *Echinacea purpurea*: 41 indivíduos foram coletados em 06/julho/2012 no estado de Missouri (N36.86140 W90.95036) (Estados Unidos da América). A identificação dos espécimes vegetais foi realizada com auxílio de um botânico especializado, Victor Madoxx, sendo depositados no Herbário da MSU (*Mississippi State University*), sendo registrados com os números 5582, 5583, e 5584.

30

4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Neste trabalho foram amostradas folhas, cascas e sementes dos espécimes vegetais de copaíba, bem como folhas e pedúnculos dos espécimes de *Echinacea*. Todo o material coletado foi estocado em sacos plásticos e então processado em até 24 horas para o isolamento dos fungos endofíticos. Inicialmente, folhas, cascas e pedúnculos foram limpos superficialmente em água corrente para remoção de sujidades. Em seguida, com auxílio de tesoura e pinça esterilizadas, retirou-se fragmentos de aproximadamente 5 mm de cada parte, os quais foram submetidos ao processo de desinfestação superficial a fim de eliminar os microrganismos epifíticos e contaminantes. Tal processo foi composto por extran 2%, álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio a 2% (3 minutos) e água destilada esterilizada (2 minutos) (COLLADO et al., 1996). Já as sementes, primeiramente, sofreram um processo de retirada de seus arilos e em seguida foram divididas ao meio. Posteriormente, com auxílio de tesoura e pinça esterilizadas, os dois fragmentos foram desinfestados superficialmente com extran 2%, flambadas em bico de Bunsen, álcool 70% (4 minutos), hipoclorito de sódio a 2% (5 minutos) e água destilada esterilizada (2 minutos). Após este processo, todos os fragmentos (folhas, cascas, pedúnculos e sementes) foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm) contendo Ágar Dextrose Batata (BDA; 20% batata, 2% glicose, 2% ágar) suplementado com 200 mg/L de cloranfenicol (Sigma), utilizado para inibir o crescimento de bactérias epifíticas ou endofíticas contaminantes. Alíquotas da água destilada esterilizada utilizada no processo de desinfestação também foram plaqueadas como controle para assegurar que somente os fungos endofíticos foram isolados. As placas foram incubadas a 25-28°C por um período de até 60 dias.

Os isolados de fungos filamentosos obtidos a partir das duas espécies de copaíba foram purificados utilizando placas de Petri com BDA e preservados em duplicata em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1967) e em glicerol 15% a -80 °C. As leveduras foram purificadas utilizando o meio ágar extrato de levedura e malte (YM; 1% glicose, 0,5% peptona bacteriológica, 0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 2% ágar). Para a criopreservação, as culturas puras de leveduras foram inoculadas em meio GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e de fosfato de

sódio 0,2%) a 28 °C, e após o período de 24 horas foi acrescido de 15% glicerol e armazenado no ultrafreezer a – 80 °C. Após a preservação os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Microrganismos e Células da UFMG. Já os isolados de fungos filamentosos associados à equinacea foram purificados utilizando placas de Petri com BDA, preservados em glicerol 15% e armazenados a -80 °C.

4.3 Identificação dos fungos endofíticos

As colônias dos fungos filamentosos foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Os grupos de isolados foram submetidos à análise molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se o iniciador GTG₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), de acordo com Lieckefeldt et al. (1993). Com base no perfil eletroforético dos produtos amplificados por PCR com o iniciador GTG₅, um isolado dentre os que apresentaram um mesmo padrão de bandas foi selecionado para sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região gênica do rRNA, e as identificações dos grupos foram posteriormente confirmadas por meio do sequenciamento do fragmento gênico da β-butulina. Para as leveduras foi realizado sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do rRNA utilizando os iniciadores NL1 e NL4.

4.3.1 Extração do DNA total

Com exceção dos isolados associados a *E. purpurea*, a extração de DNA dos fungos filamentosos foi realizada de acordo com Rosa et al. (2009), com modificações, sendo o DNA extraído a partir de micélio produzido em 5 mL de meio líquido (extrato de malte 2%). Os micélios foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise [Tris-HCl (trishidroximetilaminometano) 0,05 M, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,005 M, NaCl 0,1 M, SDS (sódio dodecil sulfato) 1%] e 3 esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro), sendo posteriormente submetidos a trituração no equipamento Bullet Blender TM 24 (Uniscience, EUA). Ao tubo foi

acrescido 162 μ L de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M, CTAB 0,2%), seguido de agitação em vórtex e incubação por 40 minutos a 65 °C. Em seguida, 570 μ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi acrescentado ao tubo, homogeneizado em vórtex e incubado por 30 minutos em gelo. Posteriormente, o conteúdo foi

5 centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, sendo em seguida 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 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 50% do volume de isopropanol

10 (Merck) e mantido a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, 200 μ L de etanol (Merck) 70% p/v foram adicionados e a suspensão cuidadosamente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a

15 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, repetindo novamente este último passo. A amostra foi seca e em seguida o DNA foi hidratado em 50 μ L de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,001 M) sob incubação de 65 °C por 60 minutos. Os fungos endofíticos associados a *E. purpurea* foram inoculados em tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL Caldo Batata Dextrose (Sigma) e mantidos a 25 °C por 10 dias. O DNA dos isolados foi extraído utilizando DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc.,

20 Valencia, CA), com modificações (FREDLUND et al., 2008).

O DNA genômico dos isolados de leveduras foi extraído segundo Sambrook et al. (1986), com modificações. Os isolados foram crescidos em Agar Sabouraud (Difco) por 24 horas a 25 °C. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 μ L tampão de lise, agitado em vórtex e aquecido a 65 °C por 30 minutos. Após esta etapa, foram

25 adicionados 200 μ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizados por inversão. Em seguida, centrifugou-se a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. Transferiu-se a fase superior para novo tubo e para a precipitação do DNA adicionaram-se 100 μ L de isopropanol seguido de centrifugação a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. O DNA foi lavado com 200 μ L de álcool 70% e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos. A amostra foi

30 seca por aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente e dissolvido em 100 μ L de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Todos os produtos obtidos foram quantificados em

espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Technologies, EUA) e estocados a -20 °C até sua utilização.

4.3.2 Amplificação do DNA utilizando o iniciador (GTG)₅

5

Os isolados de fungos filamentosos foram submetidos à análise molecular por meio da PCR utilizando o iniciador (GTG)₅ (5' GTGGTGGTGGTGGTG 3') (LIECKFELDT et al., 1993), a fim de confirmar os morfotipos obtidos por meio das características macromorfológicas. A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL de uma mistura 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 (Invitrogen), 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando os termocicladores Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, EUA) e Mastercycle proS (Eppendorf, EUA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 93 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida por extensão final a 72 °C por 6 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Pronadisa), em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE; 54 g Tris base, 27,5 g ácido bórico, 20 mL EDTA 0,5M, pH 8,0), resolvidos durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

25

4.3.3 Amplificação do DNA utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4

Os iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') foram utilizados para amplificação da região transcrita interna ITS-5.8S da região gênica do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de

30

50 μL contendo 1,0 a 5,0 μL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1,0 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen), 5,0 μL de tampão de PCR 10X (Fermentas), 3,0 μL de MgCl_2 25 mM, 2,0 μL de dNTP 10 mM, 2,0 μL Betaína (Sigma), 1,0 μL dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma),
5 0,2 μL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf, EUA). 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
10 uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, resolvidos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

15 Os amplicons dos isolados associados a *E. purpurea* foram obtidos a partir da PCR contendo uma mistura de 5,0 μL de DNA (~50 ng), 5,0 μL de tampão de PCR 10X, 1,5 μL de MgCl_2 50 mM, 5,0 μL de dNTP 2 mM, 2,0 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 $10 \mu\text{mol}^{-1}$, e 0,2 μL de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen), volume final completado para 50 μL com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram
20 realizadas utilizando o termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®, EUA) sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), resolvidos durante aproximadamente 1 hora a 120 V.

25 4.3.4 Amplificação do fragmento gênico da β -tubulina

Os iniciadores BT2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3') e BT2b (5' ACCCTCAGTG TAGTGACCCTTGGC 3') foram utilizados para amplificação do fragmento gênico da β -tubulina, conforme descrito por Glass e Donaldson (1995). A PCR
30 foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 1,0 a 5,0 μL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1,0 μL de

5 cada iniciador BT2a e BT2b $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen), $5,0 \mu\text{L}$ de tampão de PCR 10X (Fermentas), $3,0 \mu\text{L}$ de MgCl_2 25 mM, $2,0 \mu\text{L}$ de dNTP 10 mM, $0,2 \mu\text{L}$ de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf, EUA). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a $94 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 minuto de anelamento a $59 \text{ }^\circ\text{C}$ e 90 segundos de extensão a $72 \text{ }^\circ\text{C}$, e uma extensão final por 7 minutos a $72 \text{ }^\circ\text{C}$. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X e resolvidos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

15 **4.3.5 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4**

Os isolados de leveduras foram submetidos ao sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA utilizando os iniciadores NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') segundo Lachance et al. (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de $50 \mu\text{L}$ contendo: $1,0$ a $5,0 \mu\text{L}$ de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μL), $1,0 \mu\text{L}$ de cada iniciador NL1 e NL4 $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen), $5,0 \mu\text{L}$ de tampão de PCR 10X (Fermentas), $3,0 \mu\text{L}$ de MgCl_2 25 mM, $2,0 \mu\text{L}$ de dNTP 10 mM, $0,2 \mu\text{L}$ de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycle proS (Eppendorf, EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 segundos, anelamento a $54 \text{ }^\circ\text{C}$ por 25 segundos e extensão a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, resolvidos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. As bandas foram coradas com

solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.3.6 Purificação dos amplicons

5

Os amplicons dos isolados associados a *C. langsdorffii* e *C. pubiflora* gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando Etanol-EDTA. Ao produto de PCR (47 µL) foi adicionado 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto (Sigma), que foi homogeneizado e mantido a 25 °C por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 10 13.000 r.p.m. por 25 minutos e o sobrenadante foi retirado e descartado. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70% e o tubo foi centrifugado a 13.000 r.p.m. por 10 minutos e o etanol retirado. O tubo foi deixado à temperatura ambiente por 90 minutos para evaporação do resíduo de etanol. Adicionaram-se 10 µL de água ultrapura esterilizada e em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37 °C por 60 minutos. O 15 produto obtido foi quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Technologies, EUA) e armazenado para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

Os amplicons dos isolados de *E. purpurea* foram purificados utilizando o Kit de purificação de PCR QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia, CA). O produto obtido foi 20 quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thecnologies, EUA) e ajustado para concentração de 10 ng/µL para ser utilizado nas reações de sequenciamento, o qual foi realizado em um aparelho modelo ABI 3730XL, Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

25 4.3.7 Reação de sequenciamento e precipitação das amostras

As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons dos isolados de *C. langsdorffii* e *C. pubiflora* foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) do Instituto René Rachou/ FIOCRUZ, e no 30 Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) da UFMG, utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de

sequenciamento automatizado ABI 3730 (EUA). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 μL , em que foram colocados: 1 μL do iniciador a $5 \mu\text{mol}^{-1}$, 1 μL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 μL de Big Dye, 1 μL de DNA (com a
5 concentração do DNA entre 5 e 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e 6 μL de água ultrapura esterilizada. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a $96 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto, 35 ciclos de anelamento a $96 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 4 minutos de extensão final a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo realizado no termociclador Mastercycle proS (Eppendorf, EUA).

10 Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 μL de EDTA a 125 mM, 1 μL de acetato de amônio e 50 μL de etanol absoluto (Merck), em cada poço. A placa foi vortexada brevemente e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 4.000 r.p.m à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e o sobrenadante
15 descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 4.000 r.p.m a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado por inversão e, após a evaporação do resíduo de etanol, 10 μL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA) foram acrescentados em cada poço. A placa foi armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, protegida da luz, até injeção
20 das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

4.3.8 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou
25 referência de fungos depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology. Os fungos que apresentaram sequências com valor de $E = 0$, cobertura e
30 identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente utilizando o programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA

et al., 2013) foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de E diferente de 0 e cobertura, e identidade $\leq 98\%$, os mesmos foram identificados em nível de gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Além disso, para alguns táxons o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi utilizado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie referência.

Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥ 300 pares de bases, sendo que quando possível foram formados e utilizados os Contigs. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o algoritmo de Neighbor-joining. O modelo Maximum Composite Likelihood foi usado para estimar a distância evolucionária. Uma análise de bootstrap foi feita com 1.000 repetições utilizando os programas incluídos no MEGA 6. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Index Fungorum (<http://www.Indexfungorum.org/>) e Kirk et al. (2008).

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

A abundância de cada táxon foi calculada utilizando-se 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 de cada espécie vegetal amostrada.

Para avaliar a diversidade de espécies 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 (1-D) 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 $1 - D$ pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o mínimo de diversidade e 1 o máximo de diversidade, com as espécies distribuídas igualmente. 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. Para a construção dessas curvas foi utilizada a densidade de cada táxon obtido. 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 PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001).

4.5 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos

25

4.5.1 Extratos etanólicos

Fungos filamentosos e leveduras associados a *C. langsdorffii* e *C. pubiflora* foram cultivados em uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA a 25-28 °C com umidade de 70-80%. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi transferido para tubos cônicos de 50 mL contendo 35 mL de etanol PA

30

(Vetec). O tubo foi incubado a 10 °C e após 48 horas o sobrenadante transferido para frascos de vidro de 10 mL e para tubos de 1,5 mL (SANTIAGO et al., 2012). Folhas e cascas de todos os indivíduos de *C. langsdorffii* e *C. pubiflora* amostrados foram colocadas em tubos cônicos de 50 mL com 35 mL de etanol (PA). 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 10 mL e tubos de 1,5 mL.

Todos os extratos etanólicos brutos obtidos, dos fungos filamentosos e leveduras, assim como dos vegetais hospedeiros, foram secos em centrífuga a vácuo Savant RVT 400 (Thermo Scientific, EUA) com temperatura inferior a 35 °C, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), a uma concentração de 100 mg/mL, depositados na Extratoteca do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (ICB/UFMG) e mantidos a -20 °C até utilização nos ensaios biológicos.

4.5.2 Extratos diclorometânicos

Os fungos endofíticos associados a *E. purpurea* foram submetidos a produção de extratos brutos diclorometânicos, sendo cada isolado cultivado em uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de BDA e incubadas a 25 °C ± 2 °C por 15 dias. Após este período as placas foram congeladas a -80 °C por 48 horas e posteriormente liofilizadas (Labconco, EUA) para remoção de água (48 horas). Os fungos em meio de cultura foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para frascos de vidro tipo erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de diclorometano PA (DCM) (Fisher) (ROSA et al., 2013).

Folhas e pedúnculos de todos os indivíduos de *E. purpurea* amostrados foram secos em liofilizador por 2 dias. Posteriormente, os tecidos foram individualmente macerados e transferidos para frascos de vidro tipo erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de DCM. Após 48 horas a temperatura ambiente, a fase orgânica de todos os extratos, fúngicos e vegetais, foi retirada e seca. As alíquotas dos extratos secos foram estocadas a -20 °C para posterior utilização nos ensaios biológicos. Extração similar foi realizada utilizando meio de cultura BDA e o extrato utilizado como controle nos ensaios biológicos.

4.5.3 Cultivo dos fungos em larga escala

Após a triagem realizada com os extratos produzidos, os extratos fúngicos que apresentaram atividade biológica foram recultivados em larga escala para obtenção de novos extratos brutos diclorometânicos. Cada isolado selecionado foi cultivado em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA e incubadas a 25-28 °C com umidade de 70-80%. O número de placas de Petri utilizadas variou dependendo do rendimento obtido ao longo do experimento. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi congelado a -80 °C por 48 horas, liofilizadas (Labconco, EUA; Liotop, Brasil) por 2-3 dias para remoção da água, sendo posteriormente transferidos para frascos de vidro e adicionados diclorometano PA. O conteúdo dos frascos foi mantido a temperatura ambiente durante 2 a 5 dias. Após, os extratos foram filtrados com auxílio de filtro de papel WhatmanTM 1 (150 mm) (Sigma), concentrados com o auxílio de rota vapor (IKA RV10, Alemanha) e, então, secos. Todos os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C para análises posteriores.

4.6 Ensaio biológicos

4.6.1 Ensaio antimicrobiano de microdiluição em placa

Os extratos etanólicos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados a *C. langsdorffii* e *C. publifora*, bem como os extratos produzidos a partir das folhas e cascas dessas plantas, foram submetidos à atividade antimicrobiana avaliada pelo método de microdiluição em placa. Os ensaios foram realizados de acordo com metodologia descrita nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M7 – A6, vol. 23 n° 2) para bactérias, com modificações; *7.1 Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFTS-EUCAST, 2002) para leveduras, com modificações; e *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos* (CLSI M38 – A2, vol.22, n°16) para o fungo filamentoso, com adaptações.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais (ICB/UFMG), sendo utilizados como microrganismos alvos: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Candida albicans* ATCC 60193, *C. krusei* ATCC 6258 e *Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740 (CARVALHO et al., 2012).

4.6.1.1 Padronização dos inóculos

As bactérias testadas foram previamente crescidas em Agar Mueller-Hinton (Difco) a 35 °C por 24 horas. Após este período, uma alçada da cultura foi suspensa em solução salina esterilizada 0,85% (0,145 mol/L), e a suspensão obtida foi homogeneizada em vórtex durante 15 segundos. A densidade da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22, Brasil) para 0,08 a 0,1 de absorbância a 625 nm, o que corresponde a 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em caldo Mueller-Hinton (Difco) para utilização no ensaio.

As leveduras alvo foram inicialmente crescidas em ágar Sabouraud (Difco) 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), e a suspensão resultante foi homogeneizada em vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22, Brasil) para 70% de transmitância a 530 nm, o que corresponde a 10⁶ UFC/mL. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 10 vezes em meio de cultura RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) (suplementado com 2% de glicose) para utilização no ensaio.

Para o ensaio contra *C. sphaerospermum*, 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 esterilizada 0,85%. A suspensão resultante foi homogeneizada em vórtex durante 15 segundos. A densidade celular da suspensão foi padronizada em espectrofotômetro (Bioespectro SP-22, Brasil) para 15% de transmitância a 620 nm, o que corresponde a 10⁶ esporos/mL. Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída 50 vezes em meio de cultura RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) para utilização no ensaio.

4.6.1.2 Triagem da atividade antimicrobiana

Os ensaios de triagem foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Biosystems), utilizando-se os meios de cultura sintéticos RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (SIGMA), suplementado com 2% glicose para as leveduras; Mueller-Hinton para as bactérias, e RPMI 1640 (INLAB Diagnóstica) para o fungo filamentoso. Todos os testes foram realizados em duplicata

Para os testes com as bactérias e leveduras alvo, em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 μL do extrato (dissolvidos em DMSO a 100 mg/mL 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 os fármacos cloranfenicol (Sigma) a 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as bactérias e anfotericina B (Sigma) a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para as leveduras. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 μL e as concentrações de DMSO 0,25% e extrato 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em todos os ensaios foram feitos os controles de toxicidade do DMSO, do crescimento fúngico/bacteriano, da esterilidade dos meios de cultura e da susceptibilidade às drogas controles (Figura 7).

Ao final do processo as placas foram colocadas em agitador (Uniscience OS-10, EUA) por 20 minutos a 200 r.p.m. e então incubadas a 35 °C por 24 horas. Após incubação, em cada poço foi acrescentado 10 μL de Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), o conteúdo foi homogeneizado e as placas novamente incubadas à mesma temperatura de crescimento dos respectivos inóculos por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ 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), o conteúdo foi novamente homogeneizado e as placas submetidas a leitura dos resultados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	EX1	EX9	EX17	EX25	EX33	EX41	EX49	EX57	EX65	EX73	DMSO
B	BL	EX2	EX10	EX18	EX26	EX34	EX42	EX50	EX58	EX66	EX74	DMSO
C	BL	EX3	EX11	EX19	EX27	EX35	EX43	EX51	EX59	EX67	EX75	DMSO
D	BL	EX4	EX12	EX20	EX28	EX36	EX44	EX52	EX60	EX68	EX76	DMSO
E	CN	EX5	EX13	EX21	EX29	EX37	EX45	EX53	EX61	EX69	EX77	CP
F	CN	EX6	EX14	EX22	EX30	EX38	EX46	EX54	EX62	EX70	EX78	CP
G	CN	EX7	EX15	EX23	EX31	EX39	EX47	EX55	EX63	EX71	EX79	CP
H	CN	EX8	EX16	EX24	EX32	EX40	EX48	EX56	EX64	EX72	EX80	CP

BL – Branco (meio de cultura)

CN – Controle Negativo (meio de cultura + água + inoculo)

EX – Extrato

DMSO – Controle de DMSO 0,25% (água/DMSO + inoculo)

CP – Controle Positivo (água/droga + inoculo)

Figura 7 - Modelo da disposição dos extratos e controles na placa de 96 poços utilizada na triagem da atividade antimicrobiana

5 Para as placas teste de *C. sphaerospermum*, em cada poço utilizado para teste foram inoculados 25 µL do extrato (dissolvidos em DMSO a 100 mg/mL e diluídos em água deionizada autoclavada para a concentração de 1 mg/mL), 25 µL do meio de cultura e 50 µL do inoculo. Como controle positivo foi utilizado Benomil (Sigma) a 1,16 µg/mL. Ao final, o volume de cada poço foi de 100 µL e as concentrações de DMSO 0,25% e extrato 250 µg/mL. Posteriormente, as placas foram colocadas em agitador (Uniscience 10 OS-10, EUA) por 20 minutos a 200 r.p.m. e após, foram incubadas a 25 °C por 48 horas.

Todas as leituras foram realizadas em leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices, EUA) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices, EUA), a um comprimento de onda de 570 nm para as bactérias e leveduras, e 620 nm para o fungo filamentoso. A absorbância dos poços testes foi comparada com a absorbância do poço 15 controle contendo apenas o microrganismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula: **Porcentagem de Inibição = (Densidade óptica poço controle – Densidade óptica poço tratado) X 100/Densidade óptica do poço controle**. Arbitrariamente, os extratos com valor de inibição maior ou igual que 70% foram selecionados para o cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.6.1.3 Cálculo da concentração inibitória mínima (CIM)

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

10

4.6.2 Determinação da atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos

Os extratos diclorometânicos produzidos a partir dos fungos associados a *E. purpurea*, os produzidos a partir das folhas e pedúnculos dos indivíduos amostrados dessa planta, bem como os extratos considerados ativos dos fungos endofíticos associados a *C. langsdorffii* e *C. publifora*, foram submetidos a ensaios para avaliação da atividade antifúngica. Os ensaios de bioautografia e de microdiluição em placa descritos a seguir foram conduzidos no *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* do *United States Department of Agriculture* (ARS/NPURU/USDA) sob orientação de Dr. David Wedge (Fitopatologista), e colaboração de técnicos especializados.

15
20

4.6.2.1 Ensaios de bioautografia contra os fitopatógenos

Para os ensaios de bioautografia foram utilizados como microrganismos alvos os seguintes fungos fitopatogênicos: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloesporioides* obtidos de B.J. Smith (USDA, ARS, Small Fruit Research Station, Poplarville, MS), os quais foram isolados de morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne). Os fitopatógenos alvos foram crescidos em BDA (Difco/EUA) em placas de Petri de 9 cm e incubados a 24 ± 2 °C sob luz fluorescente branca (55 ± 5 µmol/m²/s) com 12 horas de fotoperíodo para estimulação da esporulação. Após 7 a 10 dias, 5 mL de

25
30

água destilada esterilizada foram adicionados as placas de crescimento das colônias e, com o auxílio de uma alça de plástico em formato de “L”, os conídios dos fungos alvos foram liberados. A suspensão aquosa formada com os conídios foi filtrada por meio de Miracloth (Calbiochem- Novabiochem Corporation) para remoção do micélio. A
5 concentração dos conídios foi determinada com auxílio de espectrofotômetro (WEDGE & KUHAJEK, 1998) com curva padrão baseada em absorbância a 625 nm, e as suspensões ajustadas com água destilada esterilizada a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/mL. As concentrações conidiais padrão foram determinadas por meio da curva padrão de cada espécie fúngica. Curvas padrão de turbidez foram periodicamente
10 validadas utilizando um contador de partículas *Bech- man/Coulter Z1* e por meio de contagem em hemocitômetro.

Os ensaios de bioautografia foram realizados em placa de cromatografia em camada delgada de sílica gel (UNIPLATE™). Os extratos brutos diclorometânicos foram diluídos em diclorometano (Fisher), e aplicados a 160 µg/ponto, sendo as placas
15 posteriormente secas à temperatura ambiente. Após a secagem cada placa foi borrifada com uma suspensão conidial preparada em meio líquido batata dextrose (10^5 esporos/mL) da espécie alvo e incubadas em câmara úmida a 26 °C com 12 horas de fotoperíodo durante quatro dias. Como controles positivos foram utilizados os antifúngicos pesticidas comerciais benomil (1,16 µg/ponto), ciprodinil (0,9 µg/ponto), azoxistrobilurina (1,61
20 µg/ponto) e captan (1,2 µg/ponto) (Chem Service). O diâmetro das zonas de inibição do crescimento fúngico foi avaliado após 4 – 5 dias de incubação. Zonas claras de inibição indicaram a presença de atividade antifúngica em cada extrato (WEDGE et al., 2009), e zonas não totalmente claras, consideradas difusas, indicaram atividade fungistática.

25 **4.6.2.2 Ensaio de microdiluição em placa com as substâncias antifúngicas obtidas contra os fitopatógenos**

A avaliação das substâncias antifúngicas isoladas contra a esporulação de fungos filamentosos foi realizada pelo método de microdiluição em placa, de acordo com
30 metodologia descrita nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M27-A) para leveduras, com adaptações (WEDGE & KUHAJEK 1998; WEDGE et al.,

2000). Neste ensaio foram utilizados os seguintes fitopatógenos como alvos: *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis obscurans* e *P. viticola*. As três espécies de *Colletotrichum* e *P. obscurans* foram isoladas de morango (*Fragaria x ananassa*), enquanto *P. viticola* e *B. cinerea* foram isoladas de uvas comerciais (*Vitis vinifera* L.), e *F.oxysporum* de orquídea (*Cycnoches* sp.).

As substâncias obtidas foram testadas de acordo com protocolo descrito por Wedge et al. (1998) frente as espécies fúngicas a uma concentração final de 75, 150 e 300 µM. Como controles positivos foram utilizados os fungicidas azoxistrobilurina e captan a 0,3, 3,0 e 30 µM. Todos os testes foram realizados em duplicata. O crescimento fúngico foi avaliado utilizando leitor de microplaca (Packard –SpectraCount/ Packard Instrument Co., Meriden, CT) pela absorvância de cada poço a 620 nm após 0, 24, 48 e 72 horas, exceto para *P. obscurans* e *P. viticola*, que os dados foram obtidos após 120 e 144 horas. Os valores médios de absorvância e erros padrão foram determinados e representados graficamente, sendo que os gráficos foram utilizados para avaliar a inibição do crescimento fúngico. Diferenças na germinação dos esporos e no crescimento micelial em cada poço da placa de 96 poços demonstraram a sensibilidade a cada concentração dos compostos puros, e indicaram efeitos fungicidas ou fungistáticos.

4.7 Seleção dos extratos bioativos para análise química

Os extratos considerados ativos, após a realização dos ensaios biológicos, foram inicialmente submetidos à Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, e em seguida selecionados para o Fracionamento químico biomonitorado a fim de posteriormente isolar e/ou identificar os metabólitos presentes nos extratos brutos ou frações ativas. Os experimentos descritos a seguir foram realizados nas dependências do *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* do *United States Department of Agriculture* (ARS/NPURU/USDA), sob orientação de Dr. Charles Cantrell (Químico) e colaboração de técnicos especializados.

4.8 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , e os mapas de contorno bidimensionais de COSY (*Correlation spectroscopy*) foram obtidos em um
5 aparelho Inova 600 MHz da fabricante Varian (Palo Alto, CA) ou em um aparelho Avance 400 MHz da Bruker (Billerica, MA). As amostras foram preparadas a aproximadamente 10 mg/mL em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e analisadas em tubos de RMN de 3 mm. Todos os espectros de ^{13}C foram registrados em experimentos de DEPT de 90° e 135° . Todos os espectros de RMN foram processados pelo programa
10 MestReNova v8.1.2-11880 (Mestrelab Research, S. L., 2013).

4.9 Análise quantitativa e qualitativa de ácidos graxos

Os extratos brutos e frações com presença majoritária de ácidos graxos a partir
15 dos espectros de RMN ^1H foram submetidos à análise quantitativa e qualitativa destas substâncias por Cromatografia Gasosa em análise com Detector por Ionização em Chama (CG-DIC).

4.9.1 Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

20

As análises cromatográficas foram conduzidas em um cromatógrafo a gás Varian, modelo CP-3800, o qual foi equipado com detector de ionização de chama, uma coluna capilar DB-23 Agilent Technologies (comprimento: 60 m; diâmetro interno: 0,25 mm; espessura do filme: 0,25 μm). Durante a operação utilizou-se a seguinte condição:
25 temperatura de injeção, 270°C ; temperatura da coluna, 130°C mantido por 1 minuto seguido por 130° a 170°C por $6,5^\circ\text{C}/\text{min}$ seguido por 170° a 215°C por $2,8^\circ\text{C}/\text{min}$ e mantido por 12 min seguido por 215° a 230°C por 40 $^\circ\text{C}$ min e mantido por 3 minutos; volume de injeção de 1 μL (*split* 20:1); 3,0 mL/min fluxo constante; temperatura DIC de 300°C . Os ácidos graxos das amostras em estudo foram quantificados pelo cálculo da
30 porcentagem da área baseado na combinação da área total: **a área de cada pico obtido**

foi dividida pela área total de todos os picos do cromatograma e multiplicado por 100, a fim de obter a porcentagem.

4.9.2 Identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

5

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos constituintes da amostra em questão (extratos brutos e frações ativas), com uma mistura constituída de 40 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos, os quais foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ou Nu-
10 Chek Prep, Inc. (Elysian, MN). Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês *FAME*) utilizados na análise das amostras foram ou sintetizados a partir de um ácido graxo livre correspondente (reação de diazometano) ou analisados com uma mistura de padrões de referência da Supelco (St. Louis, MO), 18919.

Os tempos de retenção dos “*FAME*” utilizados neste trabalho estão identificados
15 em parêntese: ácido capróico (6:0), ácido caprílico (8:0), ácido cáprico (10:0), ácido undecanóico (11:0), ácido láurico (12:0), ácido tridecanóico (13:0), ácido mirístico (14:0), ácido miristoléico (14:1), ácido pentadecanóico (15:0), ácido cis-10-pentadecenóico (15:1), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoléico (16:1), ácido heptadecanóico (17:0), ácido cis-10 heptadecenóico (17:1), ácido esteárico (18:0), ácido
20 oléico (18:1n9c), ácido elaídico (18:1n9t), (LA) ácido linoléico (18:2n6c), ácido linolelaídico (18:2n6t), ácido gamma-linolênico (18:3n6), ácido pinolênico (18:3n6), ácido estearidônico (18:4n3), (ALA) ácido alpha-linolênico (18:3n3), ácido nonadecanóico (19:0), ácido araquídico (20:0), ácido cis-11-eicosenóico (20:1), ácido cis-11-14-eicosadienóico (20:2), ácido heneicosanóico (21:0), ácido siadônico (20:3n6),
25 ácido cis-8-11-14-eicosatrienóico (20:3n6), ácido arachidônico (20:4n6), (ETE) cis-11,14,17-ácido eicosatrienóico (20:3n3), (EPA) ácido eicosapentaenóico (20:5n3), ácido beénico (22:0), ácido erúcico (22:1n9), ácido cis-13,16-docosadienóico (22:2), (DPA) ácido docosapentaenóico (22:5n3), (DHA) ácido docosa-hexaenóico (22:6n3), ácido tricosanóico (23:0) e ácido lignocérico (24:0).

30

4.9.3 Reação de diazotação – produção de ésteres metílicos dos ácidos graxos

Os ácidos graxos livres foram convertidos ao seu éster metílico correspondente pela reação com diazometano e éter, sendo utilizado um Mini Diazald®, aparato da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Resumidamente, a reação foi realizada por um técnico especializado, sendo que 2,5 g de KOH foi dissolvido em 4 mL de água deionizada e a mistura mantida em um recipiente, sendo posteriormente adicionados 5 mL de etanol a mistura. Um funil de separação contendo 2,5 g de *diazald* dissolvido em 22,5 mL de éter foi acoplado ao recipiente, o qual foi aquecido a 65 °C em banho maria. Durante o aquecimento, por um período de 50 minutos, a solução de *diazald* foi gotejada na mistura em aquecimento. Após este período, o frasco foi resfriado utilizando um banho de acetona e gelo seco. O diazometano co-destilado (CH₂N₂) em solução de éter foi armazenado em frasco de vidro e mantido a -20 °C para posterior uso.

Para a análise, a cada amostra de extrato ou fração ativa foram adicionados 500 µL de éter dietil e 500 µL da solução de CH₂N₂. O frasco com a solução foi mantido aberto, a temperatura ambiente e overnight em uma capela de exaustão, a fim de completar a reação e permitir a evaporação do solvente e CH₂N₂. Após a reação o produto éster metílico foi dissolvido em 500 µL de éter dietil e analisado em CG-EM.

4.10 Fracionamento químico biomonitorado

Após a análise dos espectros de RMN ¹H, os extratos selecionados foram submetidos ao fracionamento químico biomonitorado visando à purificação e identificação dos prováveis metabólitos responsáveis pela atividade biológica. Inicialmente, realizou-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do(s) extrato(s) bruto(s) a fim de selecionar os solventes para o fracionamento. As análises de CCD foram realizadas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária e um painel de misturas de solventes como fase móvel. As placas foram a princípio reveladas pela luz UV e, também pelo calor, após aplicação de spray de Godin (Godin A, 5% de H₂SO₄ em etanol +Godin B, 1 g de vanilina em 100 mL de etanol). A cromatografia em coluna dos

extratos foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia).

5 **4.11 Análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM)**

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

15 **4.12 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

20 A análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada a fim de purificar a fração bioativa sendo realizada em um cromatógrafo a líquido (Agilent 1200) que consistia em sistema de degaseificação a vácuo, bomba quaternária, ALS *autosampler*, detector de arranjos de diodos e uma coluna Agilent Zorbax RX-SIL, 9,4 mm × 250 mm, 5 µm. A injeção direta do volume das amostras foi 100 µL, analisadas a temperatura ambiente. O método analítico foi 100% Hexano/CHCl₃ a 100% CHCl₃ por 25 minutos seguido por 5 minutos de lavagem da coluna com hexano e reequilíbrio. Analitos foram detectados a 254 nm com uma referência de 450 nm por um detector de 25 arranjos de diodos.

4.13 Cromatografia Líquida acoplada a um Espectrômetro de Massas (CL-EM/EM)

30 Os metabólitos isolados das frações ativas foram submetidos às técnicas de CL-EM/EM (Cromatografia Líquida acoplada a um Espectrômetro de Massas), a qual é muito sensível e fornece informações estruturais importantes como, massa molar de alta

ou baixa resolução e fórmula molecular. As amostras foram dissolvidas em metanol e 20 µL (aproximadamente 0,1 mg/mL) injetados manualmente a 0,5 minutos, enquanto que os padrões de compensação de desvio de massa [PEG (ion positivo)] foram injetados 1,5 min após 2 minutos de corrida.

5

4.14 Elucidação estrutural dos constituintes químicos

10 A identificação da (s) molécula (s) presente(s) nas frações ativas foi realizada pelo químico Dr. Charles Cantrell (*Natural Products Utilization Research*), após a análise e junção dos dados obtidos a partir dos seguintes experimentos: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , ^1H - ^1H COSY, DEPT, cromatografia gasosa e cromatografia líquida acopladas a um espectrômetro de massas, somado a pesquisas realizadas em banco de dados comerciais, como *Dictionary of Natural Products* e *SciFinder Scholar*.

15

5 RESULTADOS

5.1 Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora*

5

5.1.1 Coleta, isolamento e identificação dos fungos endofíticos

Cinco folhas, cinco amostras de caule e cinco sementes de 15 indivíduos aparentemente saudáveis de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora* foram coletados para o isolamento de fungos endofíticos. De cada folha e caule foram retirados 5 fragmentos e as sementes divididas ao meio, sendo processados 375 fragmentos de folhas, 375 de caules e 150 de sementes, totalizando 900 fragmentos/coleta. Ao final do processo de isolamento foram obtidos 668 isolados de fungos endofíticos, dos quais 308 foram provenientes de *C. langsdorffii* e 360 de *C. pubiflora* (358 fungos filamentosos e duas leveduras). Do total de isolados associados a *C. langsdorffii*, 172 (56%) foram obtidos das folhas, 110 (36%) dos caules e 26 (8%) das sementes; já dos isolados associados a *C. pubiflora*, 225 (63%) foram obtidos das folhas, 123 (34%), dos caules e 12 (3%) das sementes (Figura 8).

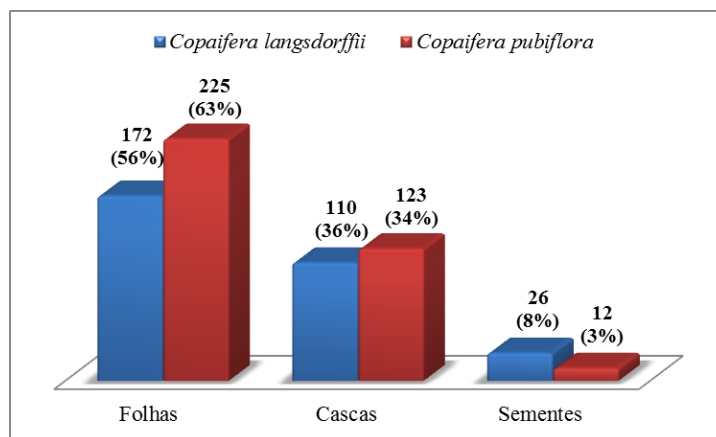


Figura 8. Número de isolados e porcentagem de fungos endofíticos associados a folhas, caules e sementes de *Copaifera langsdorffii* (Desf.) Kuntze e *Copaifera pubiflora* Benth.

20

Após o agrupamento macro-morfológico e molecular foram caracterizadas 49 unidades taxonômicas distintas (UTD) associadas à *C. langsdorffii* (Tabela 2, Figuras 9 -

15) e 27 associadas à *C. pubiflora* (Tabela 3, Figuras 19 - 20). Os táxons obtidos pertencem ao filo *Ascomycota* pertencentes às classes *Sordariomycetes* (71%), *Dothideomycetes* (19,7%), *Eurotiomycetes* (7,9%) e *Saccharomycetes* (1,3%). Setenta e dois isolados não puderam ser identificados neste trabalho, dos quais sete (2,3%)
5 associados a *C. langsdorffii* e 65 (18%) a *C. pubiflora*, pois não foi possível obter a amplificação de nenhuma das regiões propostas ou sequências de qualidade satisfatória.

Associados a *C. langsdorffii* foram identificados nove táxons em nível de espécie. Quinze táxons ocorreram como singletos (ocorrência de apenas um isolado), e nove apresentaram sequências com baixa similaridade molecular ou informação inconclusiva
10 quando comparados com sequências de espécies tipo ou referência depositadas no banco de dados GenBank. Estes fungos foram identificados em níveis de classe (*Sordariomycetes* sp. 1 UFMGCB 7330 e *Sordariomycetes* sp. 2 UFMGCB 7523), ordem (*Diaporthales* sp. 1 UFMGCB 7243, *Diaporthales* sp. 2 UFMGCB 7328, *Pleosporales* sp. 1 UFMGCB 7540, *Pleosporales* sp. 2 UFMGCB 7569) e família (*Xylariaceae* sp.1
15 UFMGCB 7546, *Xylariaceae* sp. 2 UFMGCB 7389 e *Xylariaceae* sp.3 UFMGCB 7473). Os táxons *Diaporthe* sp.6, *Xylariaceae* sp. 1, *Diaporthales* sp. 1 e *Diaporthales* sp. 2 foram dominantes com 42 (13,9%), 32 (10,6%), 28 (9,3%) e 22 (7,3%) isolados, respectivamente. Ao observar a dominância de gêneros, *Diaporthe* teve ocorrência de 41,5%.

20 Dentro da comunidade de endofíticos associada a *C. pubiflora*, *Diaporthe* sp. 5, *Guignardia* sp. 2, *Diaporthales* sp., *Diaporthe* sp. 8 e *Guignardia* sp. 1 foram os táxons dominantes, os quais apresentaram 51 (17,2%), 42 (14,2%), 35 (11,8%), 26 (8,8%) e 24 (8,1%) dos isolados identificados (Tabela 3, Figuras 16-20). Apenas uma espécie de levedura (dois isolados) foi obtida, a qual foi isolada da semente de *C. pubiflora* e
25 identificada como *Eremothecium coryli* (*Saccharomycetes*). Dentre os táxons obtidos, dois foram identificados em nível de ordem (*Diaporthales* sp. UFMGCB 7617 e *Pleosporales* sp. UFMGCB 7825) e dois em nível de família (*Amphisphaeriaceae* sp. UFMGCB 7789 e *Xylariaceae* sp. UFMGCB 7916). Somente quatro táxons ocorreram como singletos: *Aspergillus* sp. 1 UFMGCB 7937, *Chaetomium* sp. UFMGCB 7944,
30 *Diaporthe* cf. *foeniculina* UFMGCB 7873 e *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927.

Tabela 2. Identificação dos fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii* utilizando o programa BLASTn, o banco de sequências do NCBI GenBank, bem como análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 6.

^a UFMGCB	Tecido de Isolamento	Nº de isolados	Sequência tipo de referência do BLAST (Número de acesso GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº pb analisados	^d Espécie ou grupo taxonômico sugerido
7491	F, S	12	<i>Alternaria eichhorniae</i> ATCC22255 (NR111832) ^b	100	99	448	<i>Alternaria daucifolii</i>
7581	S	1	<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL315 (NR121331) ^b	84	96	462	<i>Aspergillus</i> sp. 1
			<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL25528 (EF661470) ^c	87	91	457	
7384	F	1	<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i> CBS487.65 (HQ588168) ^c	90	100	440	<i>Aspergillus</i> sp. 2
7521	C	1	<i>Chaetomium subglobosum</i> MUCL18694 (JN209930) ^b	100	99	548	<i>Chaetomium</i> sp.
			<i>Chaetomium angustispirale</i> CBS137.58 (JN256141) ^c	100	92	397	
7566	S	3	<i>Cladosporium varians</i> CPC13658 (NR119856) ^b	100	99	429	<i>Cladosporium</i> sp.
7568	S	4	<i>Cladosporium phaenocomae</i> CBS128769 (NR119950) ^b	100	100	465	<i>Cladosporium phaenocomae</i>
7371	F, C	12	<i>Colletotrichum gigasporum</i> CBS133266 (KF687715) ^b	96	99	496	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
7509	F	3	<i>Colletotrichum brisbanense</i> CBS292.67 (NR111746) ^b	99	99	491	<i>Colletotrichum</i> sp. 2
			<i>Colletotrichum limeticola</i> CBS114.14 (JQ949844) ^c	92	99	452	
7219	F	4	<i>Colletotrichum phyllanthi</i> CBS175.67 (NR111698) ^b	99	100	503	<i>Colletotrichum</i> sp. 3
			<i>Colletotrichum karstii</i> CORCG6 (HM585428) ^c	100	100	379	
7207	F	2	<i>Colletotrichum cymbidiicola</i> IMI347923 (NR111694) ^b	99	100	508	<i>Colletotrichum</i> sp. 4
			<i>Colletotrichum oncidii</i> CBS129828 (JQ005603) ^c	91	99	443	
7510	F	1	<i>Colletotrichum brevisporum</i> BCC38876 (NR111637) ^b	99	99	492	<i>Colletotrichum</i> sp. 5
7327	F	2	<i>Curvularia affinis</i> CBS154.34 (KJ909780) ^b	100	97	468	<i>Curvularia</i> sp.
7243	F,C	28	<i>Chrysocrypta corymbiae</i> CBS132528 (NR120158) ^b	94	83	610	<i>Diaporthales</i> sp. 1
7328	F, C	22	<i>Harknessia arctostaphyli</i> CPC20034 (KJ152781) ^b	77	89	496	<i>Diaporthales</i> sp. 2
			<i>Disculoides eucalypti</i> (JQ685527) ^c	93	80	401	
7457	C	2	<i>Diaporthe oxe</i> CBS133186 (NR111856) ^b	99	98	493	<i>Diaporthe</i> cf. <i>oxe</i>
			<i>Diaporthe oxe</i> CBS133186 (KC344132) ^c	83	99	502	
7296	C	3	<i>Diaporthe paranensis</i> CBS133184 (NR111857) ^b	100	98	419	<i>Diaporthe</i> sp. 1
			<i>Diaporthe acaciaram</i> CBS138862 (KP004509) ^c	100	93	403	
7210	F, C	11	<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843295) ^b	100	98	486	<i>Diaporthe</i> sp. 2
			<i>Diaporthe inconspicua</i> CBS133813 (KC344091) ^c	84	99	491	
7401	F, C	9	<i>Diaporthe inconspicua</i> CBS133813 (KC343123) ^b	99	99	485	<i>Diaporthe</i> sp. 3
			<i>Diaporthe foeniculina</i> DP0391 (KC843209) ^c	99	95	480	

7241	F, C	4	<i>Diaporthe maytenicola</i> (KF777157) ^b	99	97	492	<i>Diaporthe</i> sp. 4
			<i>Diaporthe foeniculina</i> DP0391 (KC843209) ^c	100	95	507	
7324	F, C	9	<i>Diaporthe anacardii</i> CBS720.97 (NR111841) ^b	99	99	478	<i>Diaporthe</i> sp. 5
			<i>Diaporthe anacardii</i> CBS720.97 (NR111841) ^b	100	94	463	
7377	F, C	42	<i>Diaporthe foeniculina</i> DP0391 (KC843209) ^c	99	95	357	<i>Diaporthe</i> sp. 6
			<i>Diaporthe sackstonii</i> (KJ197287) ^b	99	96	510	
7255	F, C	4	<i>Diaporthe acaciarum</i> CBS138862 (KP004509) ^c	100	91	514	<i>Diaporthe</i> sp. 7
			<i>Diaporthe kochmanii</i> BRIP54033 (NR111614) ^b	98	99	491	
7198	F, C	15	<i>Diaporthe masirevicii</i> BRIP57892a (KJ197257) ^c	100	98	520	<i>Diaporthe</i> sp. 8
			<i>Diaporthe endophytica</i> CBS133811 (NR 111847) ^b	99	99	486	
7216	F	1	<i>Diaporthe masirevicii</i> BRIP57892a (KJ197257) ^c	99	98	522	<i>Diaporthe</i> sp. 9
			<i>Diaporthe terebinthifolii</i> CBS133180 (NR111862) ^b	100	99	457	
7434	F	2	<i>Diaporthe masirevicii</i> BRIP57892a (KJ197257) ^c	100	94	508	<i>Diaporthe</i> sp. 10
			<i>Diaporthe miriciae</i> (KJ197282) ^b	100	99	497	
7200	F	2	<i>Diaporthe miriciae</i> BRIP54736j (KJ197262) ^c	97	99	468	<i>Diaporthe</i> sp. 11
			<i>Diaporthe sackstonii</i> (KJ197287) ^b	99	99	470	
7202	F, C	6	<i>Diaporthe serafiniae</i> BRIP55665b (KJ197254) ^c	98	100	485	<i>Diaporthe</i> sp. 12
			<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843295) ^b	100	93	389	
7250	F	2	<i>Diaporthe inconspicua</i> CBS133813 (KC344091) ^c	82	100	481	<i>Diaporthe</i> sp. 13
			<i>Diaporthe alnea</i> CBS146.46 (KC343008) ^b	100	93	497	
7460	F, C	13	<i>Diaporthe ovoicicola</i> CGMCC3.17092 (KF576288) ^c	99	86	366	<i>Diaporthe</i> sp. 14
7254	C, S	3	<i>Diplodia pseudoseriata</i> CBS124906 (NR121336) ^b	100	99	500	<i>Diplodia pseudoseriata</i>
7503	F	2	<i>Fusarium boothii</i> NRRL29011 (NR121203) ^b	99	100	459	<i>Fusarium</i> sp.
7304	C	1	<i>Fusarium napiforme</i> NRRL13604 (U34570) ^b	99	100	461	<i>Fusarium napiforme</i>
7502	F	10	<i>Guignardia mangiferae</i> CPC18848 (JF261465) ^b	100	100	479	<i>Guignardia</i> sp.
			<i>Hypoxyton griseobrunneum</i> (KC968918) ^b	92	90	451	
7564	S	1	<i>Hypoxyton griseobrunneum</i> (KC977303) ^c	99	88	359	<i>Hypoxyton</i> sp.
7392	C	2	<i>Lecythophora decumbens</i> CBS153.42 (HE610337) ^b	97	99	493	<i>Lecythophora</i> cf. <i>decumbens</i>
7414	F	1	<i>Muscodor equiseti</i> CMU-M2 (JX089322) ^b	100	100	535	<i>Muscodor equiseti</i>
			<i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS600.96 (KM199347) ^b	99	99	463	
7226	C	1	<i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS600.96 (KM199438) ^c	100	99	386	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>
			<i>Penicillium crustosum</i> FRR1669 (NR077153) ^b	100	100	496	
7561	F, S	10	<i>Penicillium cavernicola</i> (KJ834439) ^c	97	94	353	<i>Penicillium</i> sp.
			<i>Pestalotiopsis kenyana</i> CBS442.67 (KM199302) ^b	100	100	542	
7232	C	1	<i>Pestalotiopsis australasiae</i> CBS114126 (KM199409) ^c	100	100	395	<i>Pestalotiopsis australasiae</i>

7540	F, S	3	<i>Didymella phacae</i> CBS184.55 (EU167570) ^b	100	97	414	<i>Pleosporales</i> sp. 1
7569	S	1	<i>Peyronellaea prosopidis</i> CPC21698 (KF777180) ^b	100	96	466	<i>Pleosporales</i> sp. 2
7222	C, S	3	<i>Preussia persica</i> (GQ292750) ^b	96	98	461	<i>Preussia</i> sp. 1
7411	F, C	2	<i>Preussia flanagani</i> CBS112.73 (NR077168) ^b	100	90	494	<i>Preussia</i> sp. 2
7330	F	3	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS138.41 (KM199377) ^b	100	87	527	<i>Sordariomycetes</i> sp. 1
			<i>Pestalotiopsis</i> sp. SSNM-2012b (JQ845945) ^c	82	86	398	
7523	C	1	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS138.41 (KM199377) ^b	99		437	<i>Sordariomycetes</i> sp. 2
7306	C	1	<i>Hypocrea hispanica</i> S453 (JN715595) ^b	100	99	580	<i>Trichoderma</i> sp.
7546	F, C, S	32	<i>Anthostomella leucospermi</i> CBS110126 (EU552100) ^b	99	91	489	<i>Xylariaceae</i> sp. 1
7389	C	1	<i>Anthostomella brabeji</i> CBS110128 (EU552098) ^b	99	88	505	<i>Xylariaceae</i> sp. 2
7473	C	1	<i>Anthostomella leucospermi</i> CBS110126 (EU552100) ^b	99	89	465	<i>Xylariaceae</i> sp. 3

^aUFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Isolado submetido à análise filogenética baseada no sequenciamento da região transcrita interna (ITS) da região gênica do rRNA^b, fragmento gênico da β -tubulina^c. Posição taxonômica sugerida ^d. F: folha, C: caule, S: semente.

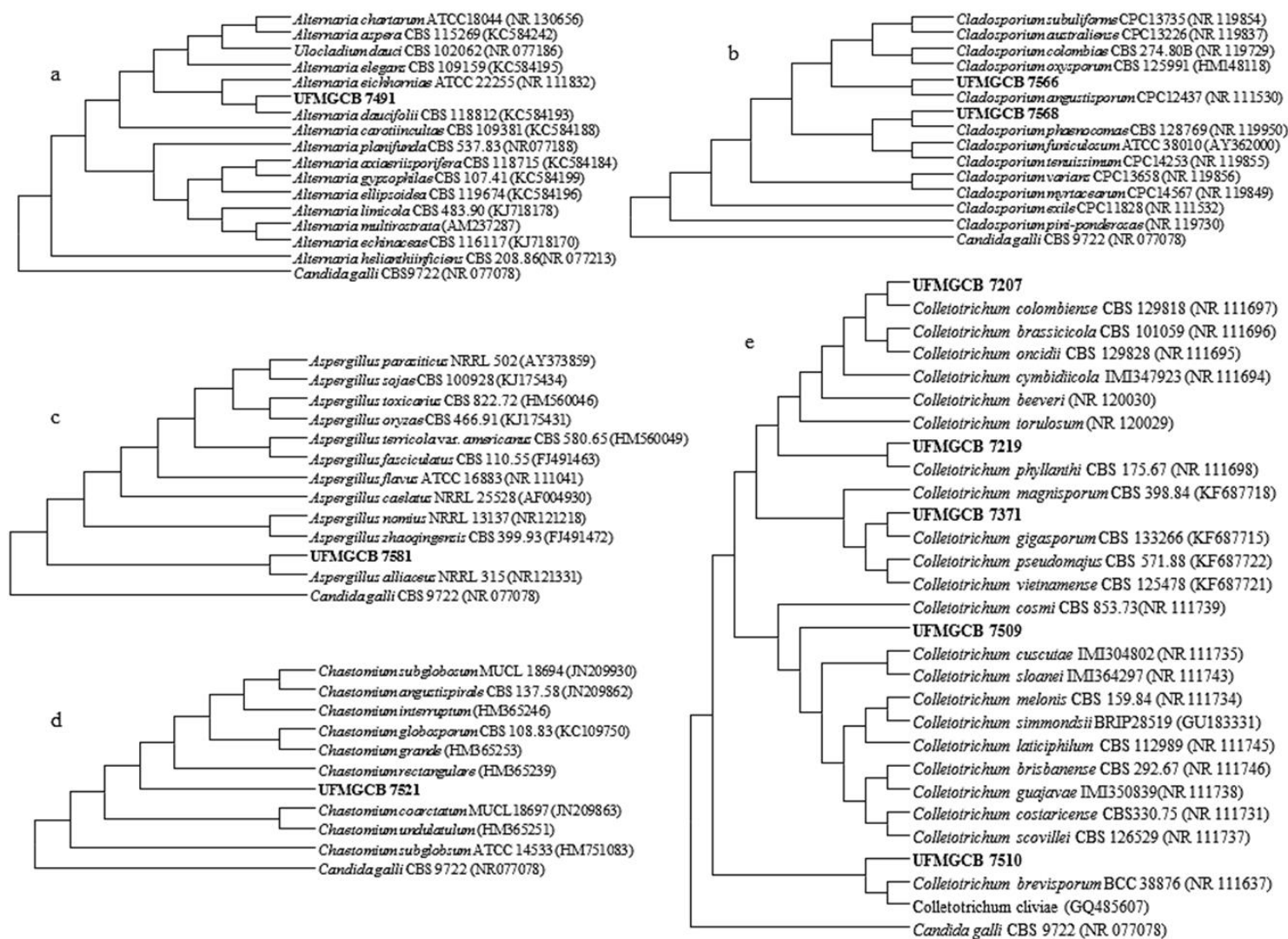


Figura 9. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Alternaria*, (b) *Cladosporium*, (c) *Aspergillus*, (d) *Chaetomium* (e) *Colletotrichum*.

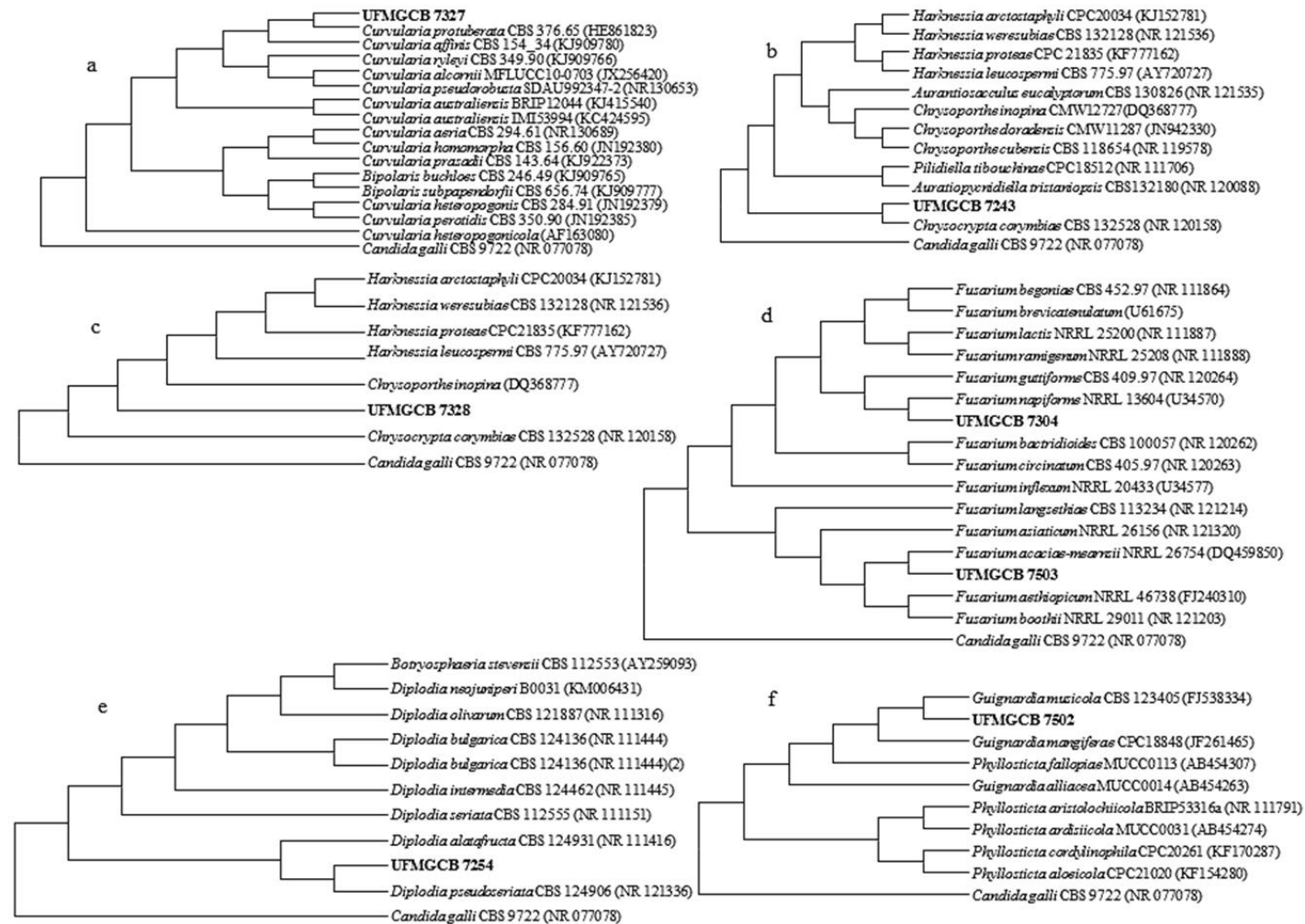


Figura 10. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Curvularia*, (b) *Diaporthales* sp.1, (c) *Diaporthales* sp.2, (d) *Fusarium*, (e) *Diplodia*, (f) *Guignardia*.

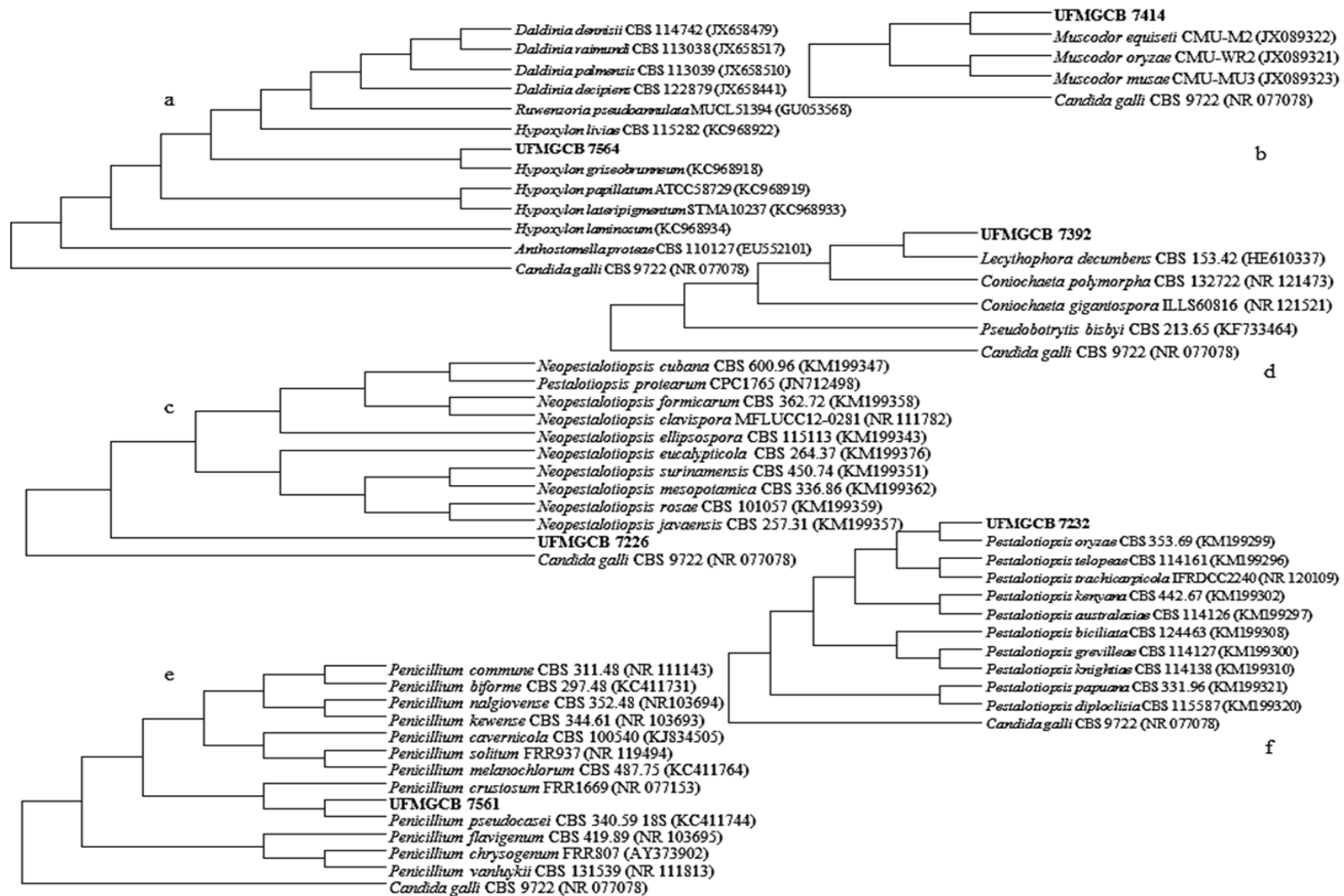


Figura 11. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Hypoxylon*, (b) *Muscodor*, (c) *Neopestalotiopsis*, (d) *Lecythophora*, (e) *Penicillium*, (f) *Pestalotiopsis*.

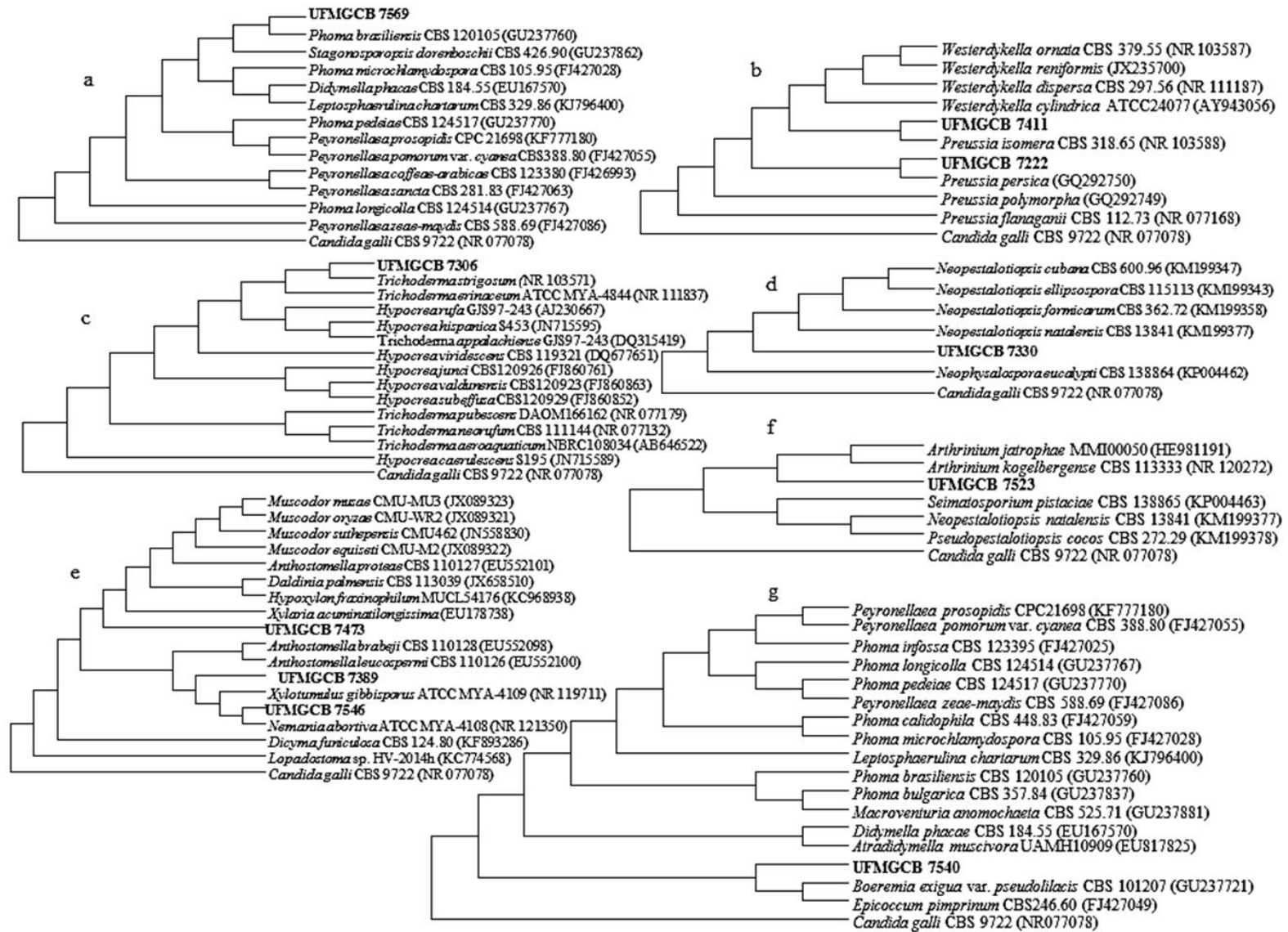


Figura 12. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Pleosporales* sp.2, (b) *Preussia*, (c) *Trichoderma*, (d) *Sordariomycetes* sp.1, (e) *Xylariaceae*, (f) *Sordariomycetes* sp.2, (g) *Pleosporales* sp.1.

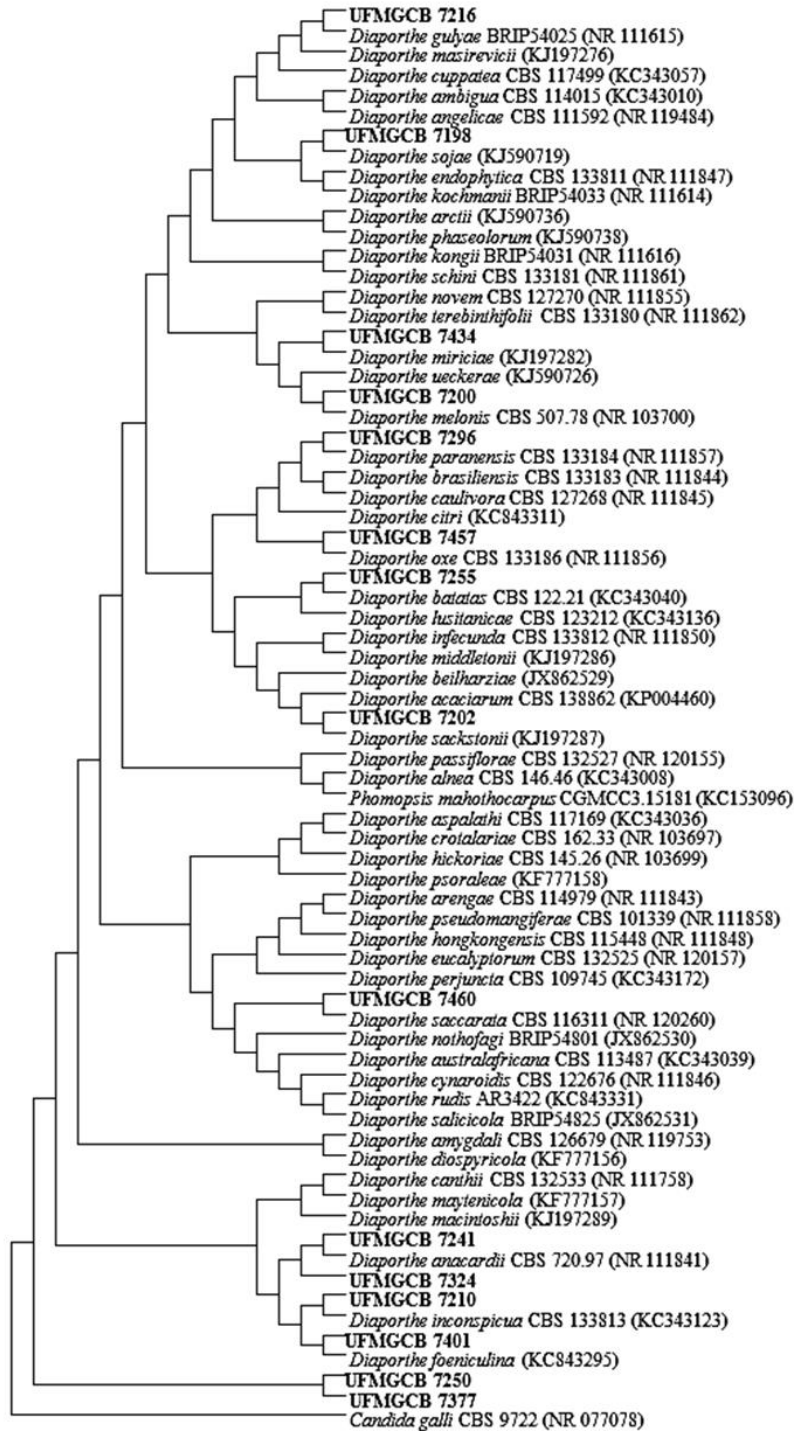


Figura 13. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises do gênero *Diaporthe*.

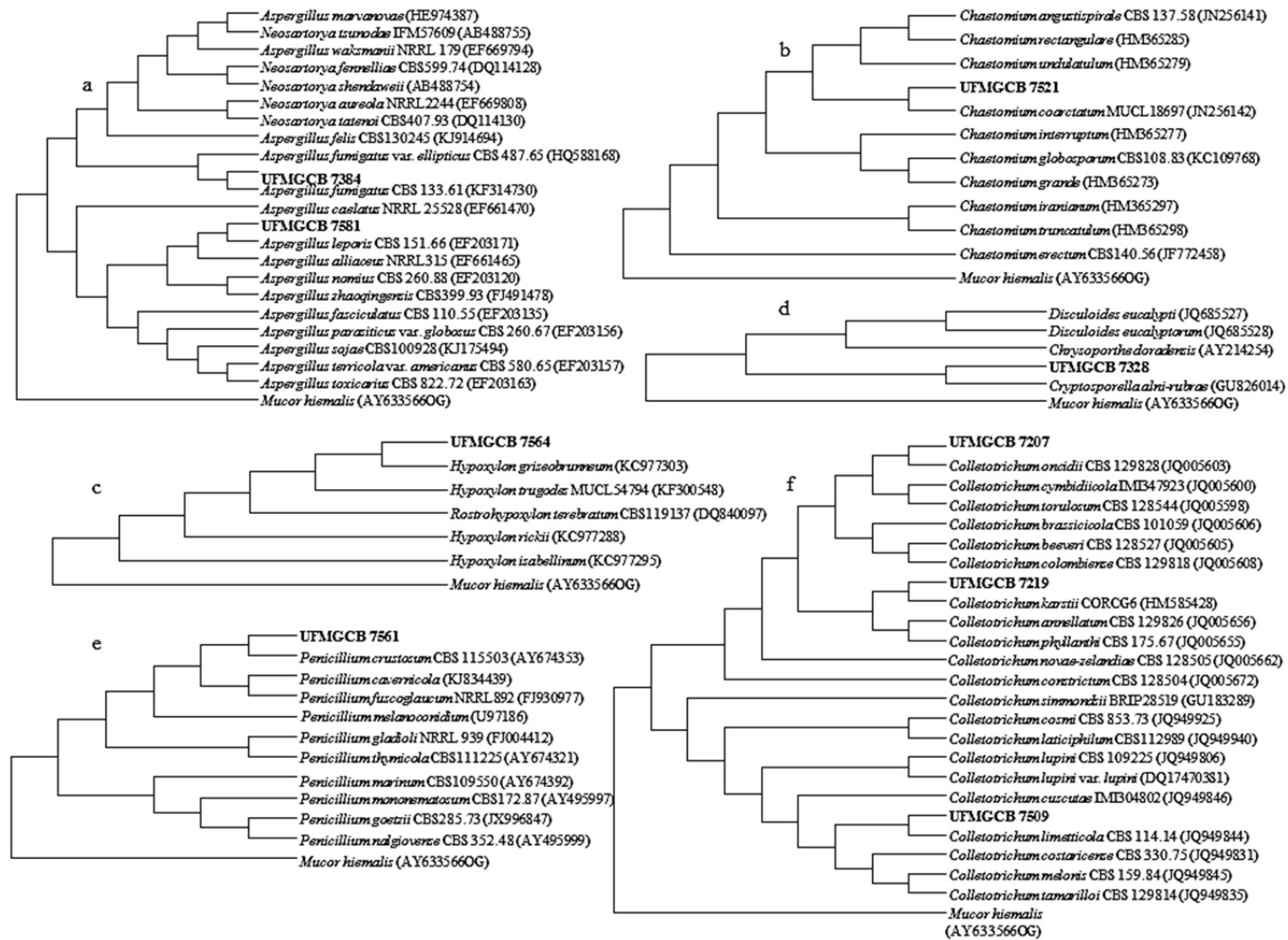


Figura 14. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Aspergillus*, (b) *Chaetomium*, (c) *Hypoxylon*, (d) *Diaporthales*, (e) *Penicillium*, (f) *Colletotrichum*.

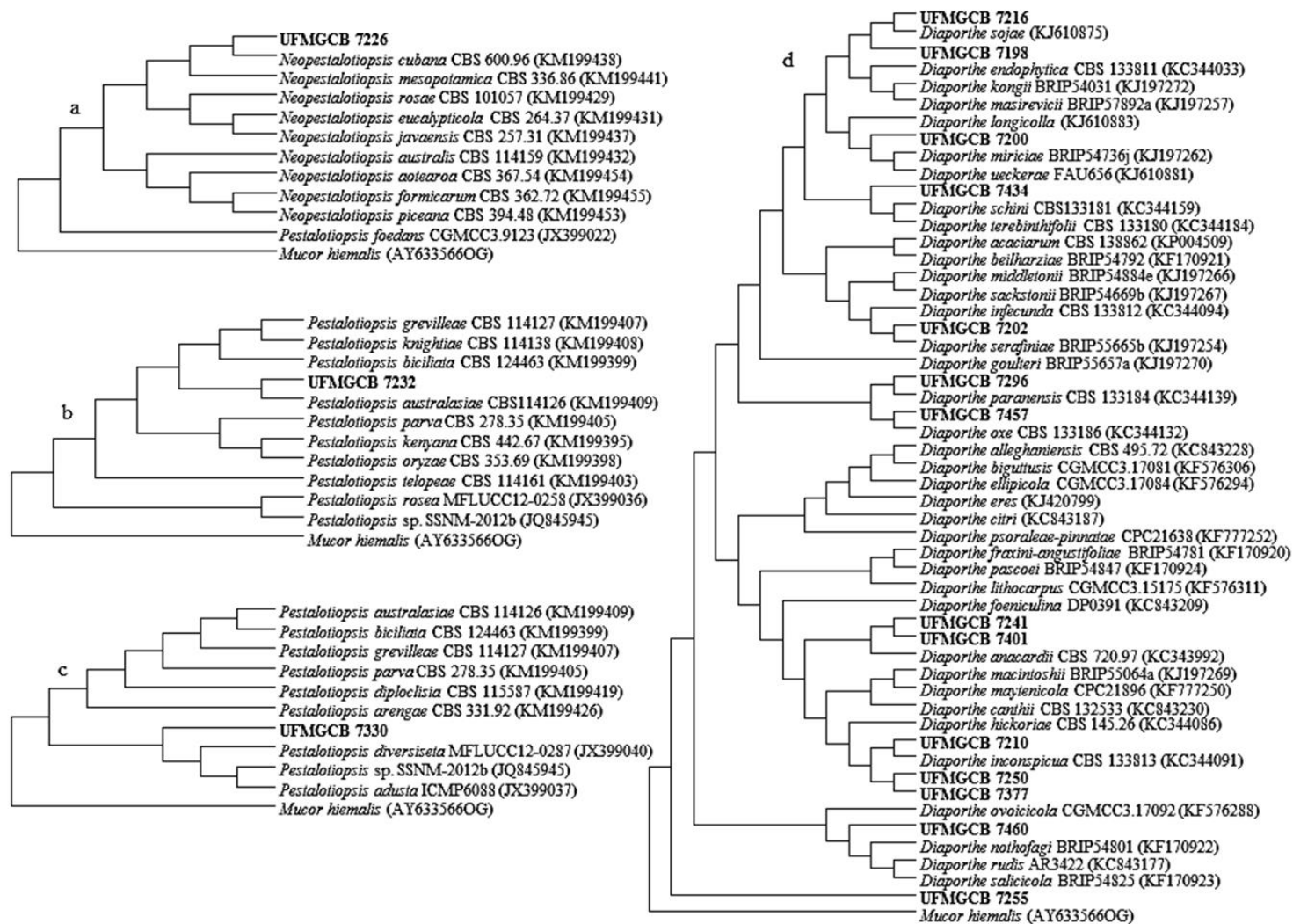


Figura 15 Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copatifera langsdorffii* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Neopestalotiopsis*, (b) *Pestalotiopsis*, (c) *Sordariomycetes*, (d) *Diaporthe*.

Tabela 3. Identificação dos fungos endofíticos associados à *Copaifera pubiflora* utilizando o programa BLASTn, o banco de sequências do NCBI GenBank, bem como análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 6.

^a UFMGCB	Tecido de Isolamento	Nº de isolados	Sequência tipo de referência do BLAST (Número de acesso GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº pb analisados	^e Espécie ou grupo taxonômico sugerido
7789	F	4	<i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS600.96 (KM199347) ^b	100	99	464	<i>Amphisphaeriaceae</i> sp.
			<i>Pestalotiopsis saprophyta</i> MFLUCC12-0282 (JX399017) ^c	89	99	443	
7937	C	1	<i>Aspergillus coremiiformis</i> CBS553.77 (FJ491474) ^b	89	91	508	<i>Aspergillus</i> sp. 1
			<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL25528 (EF661470) ^c	86	91	476	
7945	S	2	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC1022 (NR121481) ^b	100	100	507	<i>Aspergillus</i> sp. 2
			<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i> CBS487.65 (HQ588168) ^c	91	99	494	
7855	F, C	4	<i>Botryosphaeria dothidea</i> CBS115476 (KF766151) ^b	100	99	409	<i>Botryosphaeria</i> sp.
7944	S	1	<i>Chaetomium subglobosum</i> MUCL18694 (JN209930) ^b	100	98	458	<i>Chaetomium</i> sp.
			<i>Chaetomium angustispirale</i> CBS137.58 (JN256141) ^c	97	93	385	
7598	F	4	<i>Colletotrichum aescynomenes</i> ICMP17673 (NR120133) ^b	99	100	488	<i>Colletotrichum</i> sp.
7617	F, C	35	<i>Harknessia arctostaphyli</i> CPC20034 (KJ152781) ^b	89	88	438	<i>Diaporthales</i> sp.
7873	C	1	<i>Diaporthe foeniculina</i> (KC843295) ^b	100	98	499	<i>Diaporthe</i> cf. <i>foeniculina</i>
			<i>Diaporthe foeniculina</i> DP0391 (KC843209) ^c	100	96	372	
7722	F, C	14	<i>Diaporthe sclerotioides</i> CBS296.67 (KC343193) ^b	99	96	490	<i>Diaporthe</i> sp. 1
			<i>Diaporthe miriciae</i> BRIP54736j (KJ197262) ^c	99	91	477	
7609	C	2	<i>Diaporthe mayteni</i> CBS133185 (NR111852) ^b	100	91	499	<i>Diaporthe</i> sp. 2
			<i>Diaporthe acaciarum</i> CBS138862 (KP004509) ^c	97	94	350	
7908	F, C	11	<i>Diaporthe citri</i> (KC843311) ^b	99	92	489	<i>Diaporthe</i> sp. 3
			<i>Diaporthe nothofagi</i> BRIP54801 (KF170922) ^c	97	89	371	
7754	F	3	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> CBS133180 (NR111862) ^b	100	99	452	<i>Diaporthe</i> sp. 4
			<i>Diaporthe masirevicii</i> BRIP57892a (KJ197257) ^c	96	93	388	
7812	F, C	51	<i>Diaporthe miriciae</i> (KJ197282) ^b	100	96	490	<i>Diaporthe</i> sp. 5
			<i>Diaporthe kongii</i> BRIP54031 (KJ197272) ^c	99	91	460	
7720	F, C	13	<i>Diaporthe longicolla</i> (KJ590728) ^b	99	98	460	<i>Diaporthe</i> sp. 6
			<i>Diaporthe miriciae</i> BRIP54736j (KJ197262) ^c	73	100	408	
7927	F	1	<i>Diaporthe aspalathi</i> CBS117169 (KC343036) ^b	99	96	466	<i>Diaporthe</i> sp. 7
			<i>Diaporthe fraxini-angustifoliae</i> BRIP54781 (KF170920) ^c	100	86	398	
7719	F, C	26	<i>Diaporthe miriciae</i> (KJ197282) ^b	100	99	424	<i>Diaporthe</i> sp. 8

			<i>Diaporthe miriciae</i> BRIP54736j (KJ197262) ^c	97	99	472	
7933	C	2	<i>Fusarium sublunatum</i> CBS189.34 (NR111606) ^b	87	92	452	<i>Fusarium</i> sp.
7811	F	24	<i>Phyllosticta falloppiae</i> MUCC0113 (AB454307) ^b	100	100	546	<i>Guignardia</i> sp. 1
7687	F	42	<i>Guignardia mangiferae</i> CPC18848 (JF261465) ^b	100	99	553	<i>Guignardia</i> sp. 2
7613	F, C	3	<i>Hypoxyton pulvicidum</i> MUCL49879 (JX183075) ^b	94	97	457	<i>Hypoxyton</i> sp.
7794	F, C	5	<i>Neopestalotiopsis surinamensis</i> CBS 450.74 (KM199351) ^b	99	100	494	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
			<i>Neopestalotiopsis protearum</i> CBS114178 (KM199463) ^c	98	100	355	
7623	F, C, S	6	<i>Penicillium citrinum</i> NRRL1841 (NR121224) ^b	96	99	495	<i>Penicillium</i> sp.
7823	F, C	15	<i>Pestalotiopsis papuana</i> CBS331.96 (KM199321) ^b	100	99	490	<i>Pestalotiopsis colombiensis</i>
			<i>Pestalotiopsis colombiensis</i> CBS118553 (KM199421) ^c	100	100	330	
7825	C	3	<i>Darksidea alpha</i> CBS 135650 (KP183998) ^b	85	88	483	<i>Pleosporales</i> sp.
7612	F, C	3	<i>Pseudofusicoccum violaceum</i> CMW22679 (FJ888474) ^b	99	95	446	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.
7916	F, C, S	17	<i>Nemania abortiva</i> ATCCMYA4108 (NR121350) ^b	100	90	490	<i>Xylariaceae</i> sp.
CM-Y412	S	2	<i>Eremothecium coryli</i> (AY046217) ^b	92	98	630	<i>Eremothecium coryli</i>
			<i>Eremothecium coryli</i> (U43390) ^d	100	99	410	

^aUFMGCB= Código da Coleção de Cultura de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. Isolado submetido à análise filogenética baseada no sequenciamento da região transcrita interna (ITS) da região gênica do rRNA^b, fragmento gênico da β -tubulina^c e região da subunidade maior do rRNA (D1/D2)^d. Posição taxonômica sugerida^e. F: folha, C: caule, S: semente.

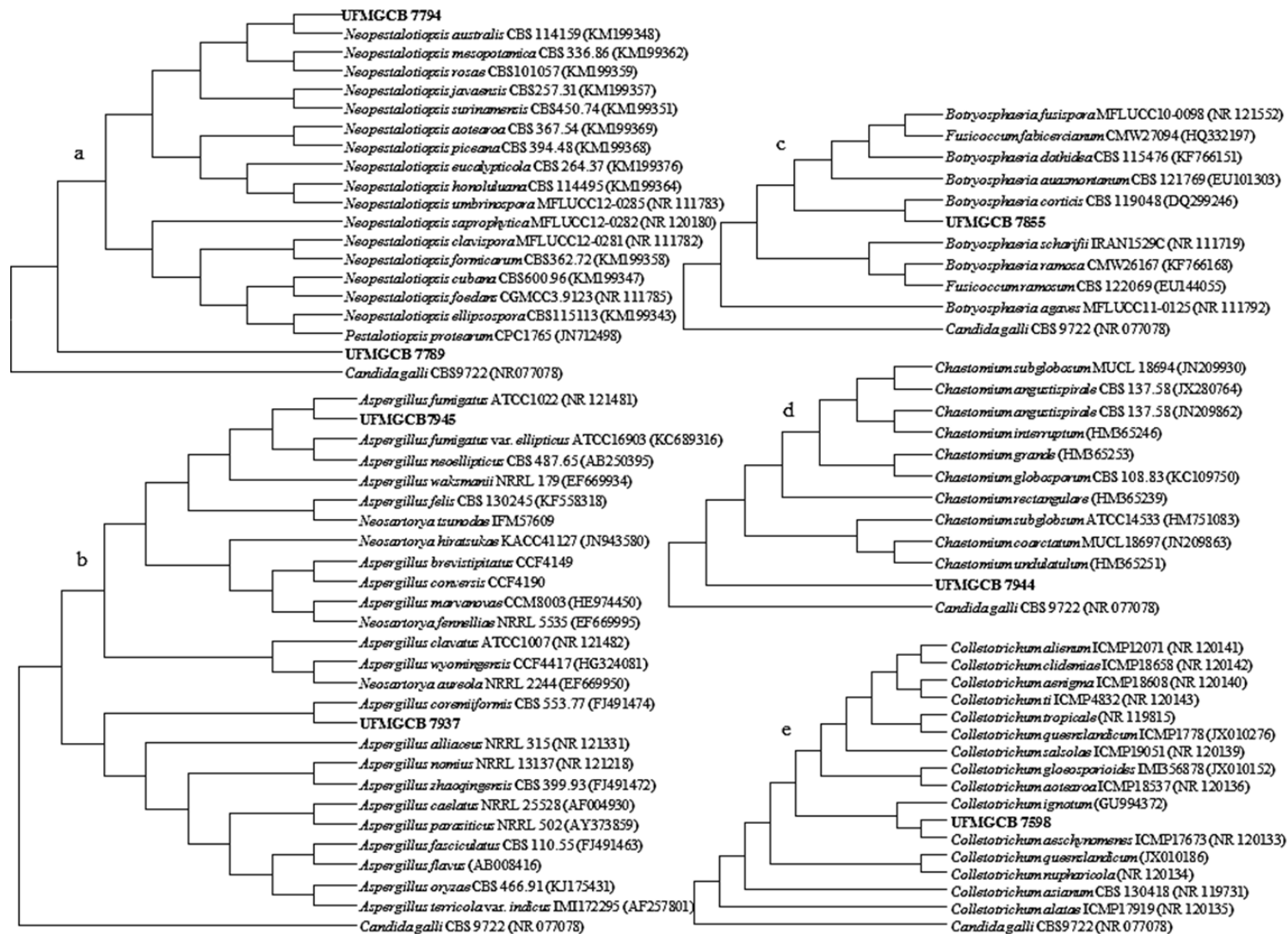


Figura 16. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Neopestalotiopsis*, (b) *Aspergillus*, (c) *Botryosphaeria*, (d) *Chaetomium*, (e) *Colletotrichum*.

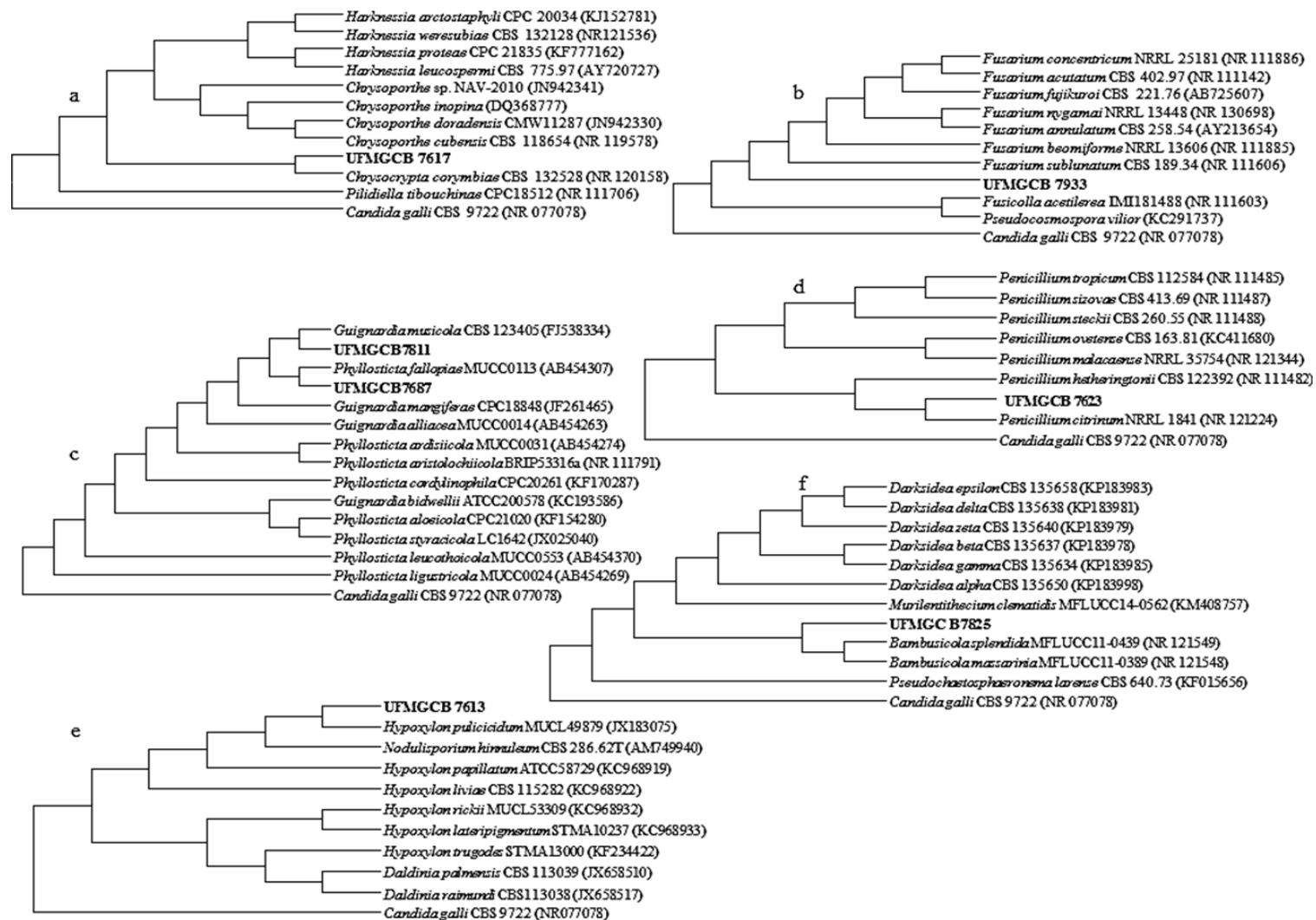


Figura 17. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Diaporthales*, (b) *Fusarium*, (c) *Guignardia*, (d) *Penicillium*, (e) *Hypoxyton*, (f) *Pleosporales*.

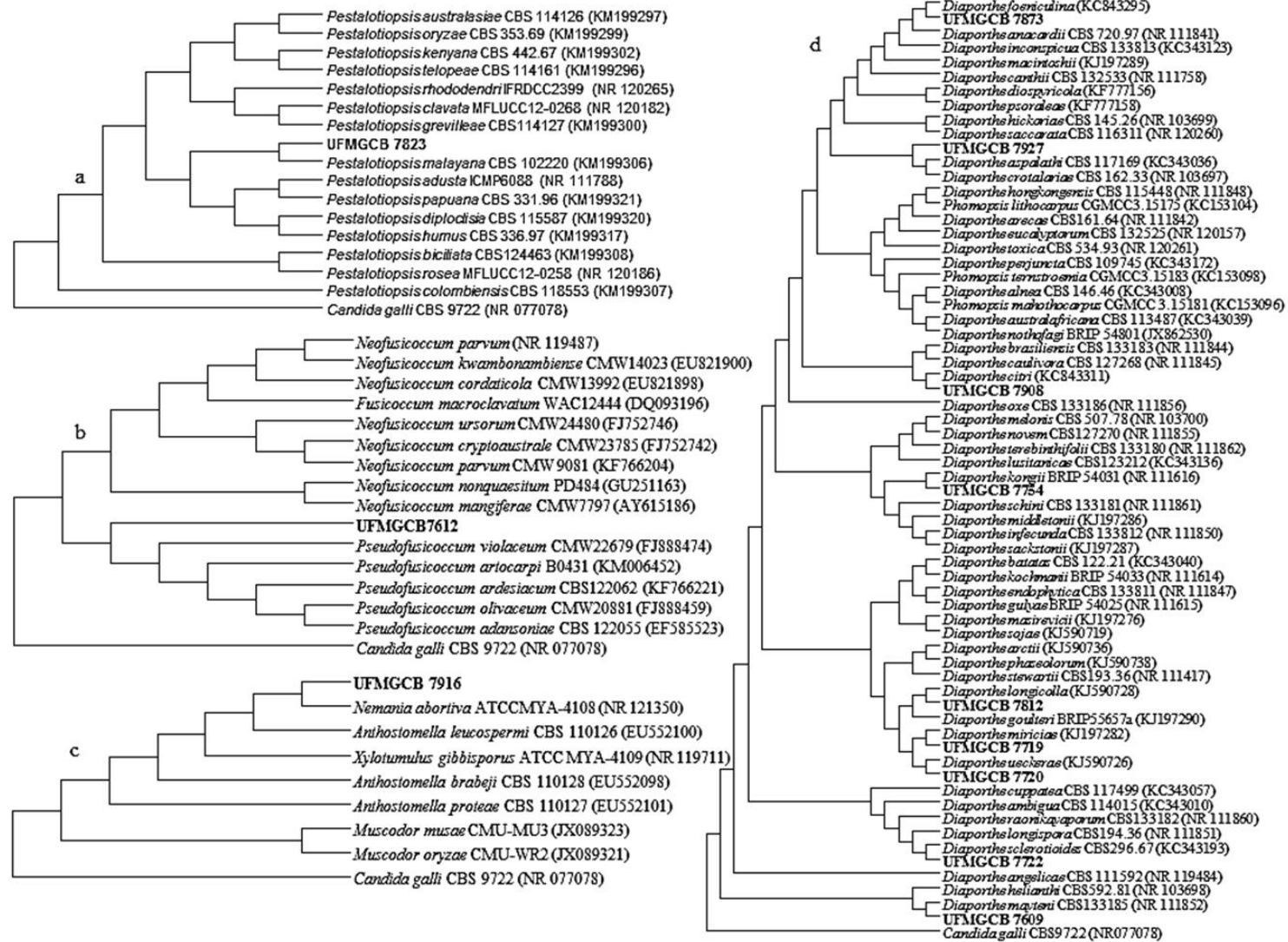


Figura 18. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Pestalotiopsis*, (b) *Pseudofusicoccum*, (c) *Xylariaceae*, (d) *Diaporthe*.

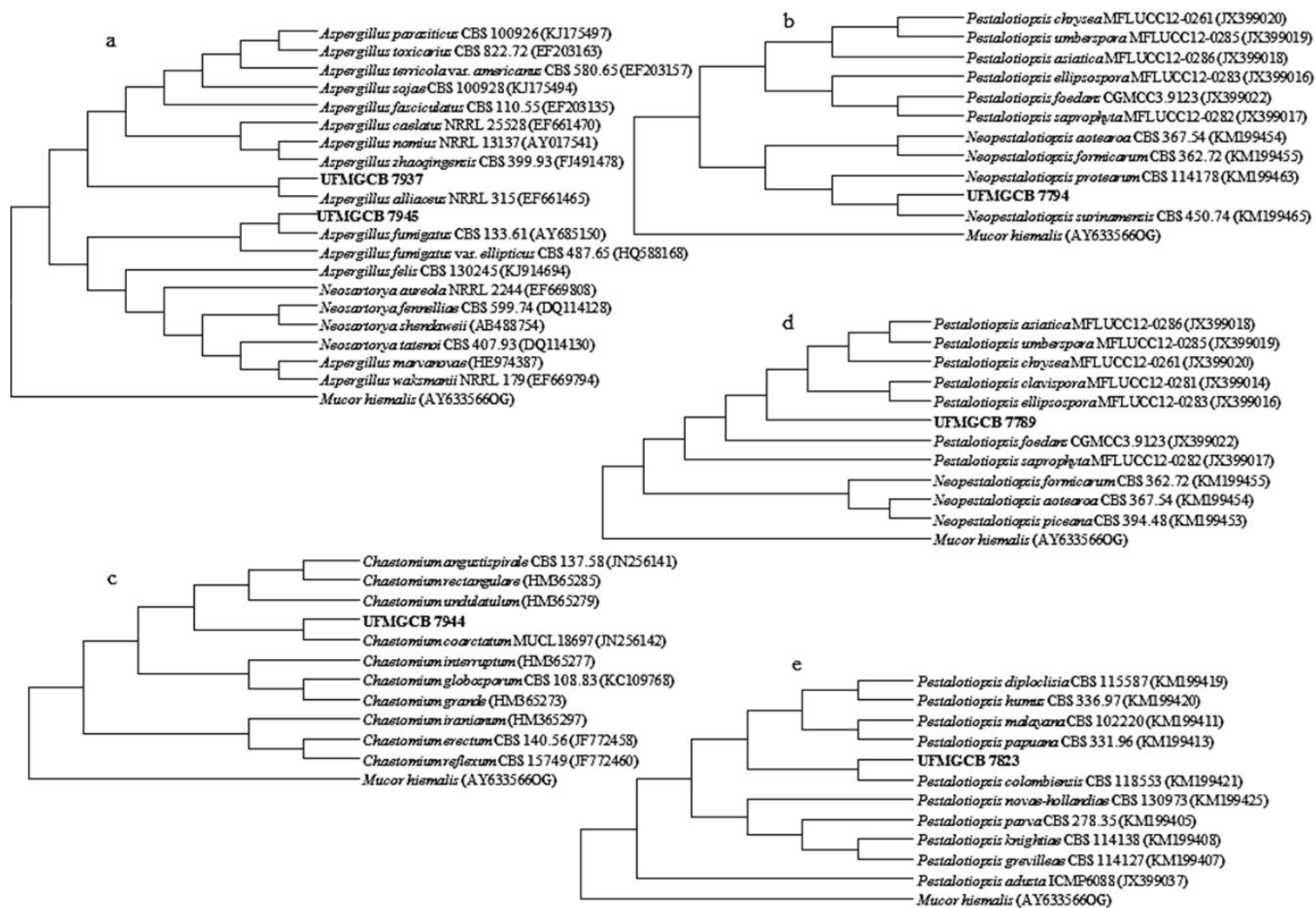


Figura 19. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Aspergillus*, (b) *Neopestalotiopsis*, (c) *Chaetomium*, (d) *Amphisphaeriaceae*, (e) *Pestalotiopsis*.

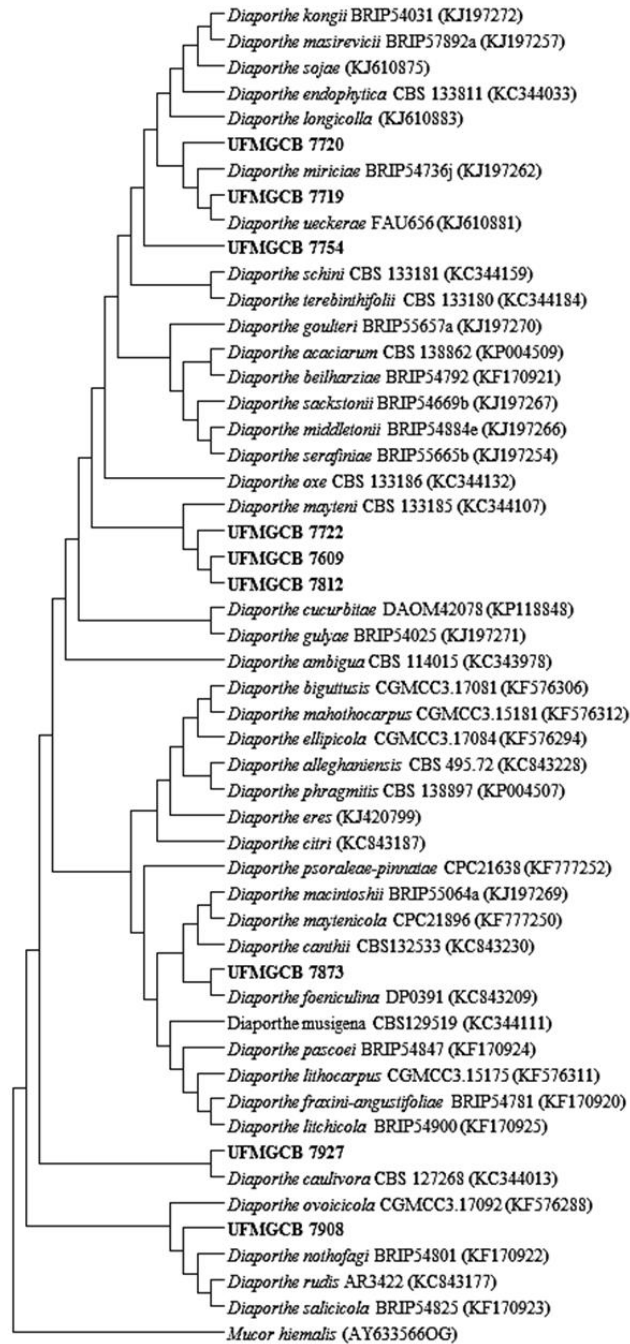


Figura 20. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Copaifera pubiflora* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências do fragmento gênico da β -tubulina, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. A árvore representa a análise do gênero: *Diaporthe*.

5.1.2 Diversidade de fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora*

A abundância dos fungos endofíticos associados a *C. langsdorffii* foi calculada utilizando 301 isolados identificados, e variou de 0,33 a 13,95% (Tabela 4). A abundância de táxons nas
5 folhas foi maior em comparação com a de caules e sementes (folhas > caules > sementes). Entretanto, alguns gêneros foram obtidos exclusivamente de um dos substratos, como por exemplo, *Cladosporium* e *Hypoxylon* que ocorreram somente das sementes; por outro lado, *Chaetomium*, *Lecythophora*, *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* ocorreram somente das amostras de caules; já *Guignardia* e *Muscodor* ocorreram somente nas folhas. A diversidade
10 de espécies encontrada nas cascas foi maior em relação às demais (Fisher α = 11,62); contudo, esse valor foi próximo ao encontrado para a diversidade das folhas (Fisher α = 11,14). O valor de Fisher- α apresentado para as sementes foi de 7,50. A riqueza de espécies associadas às sementes foi a mais baixa (Margalef = 3,10) em comparação com as demais (Folhas = 5,84, Caules = 5,56). As comunidades de fungos associados às folhas, caules e sementes apresentaram valores
15 próximos de dominância (Simpson = 0,93, 0,87 e 0,81, respectivamente) (Tabela 6).

Em relação a *C. pubiflora*, os cálculos foram realizados utilizando o total de 295 isolados, e a abundância dos táxons associados variou de 0,33 a 17,28% (Tabela 5). Ao comparar a abundância de cada táxon nos substratos selecionados para o isolamento, novamente a abundância foi maior nas folhas (folhas > caules > sementes). Diferente do observado em relação
20 a *C. langsdorffii*, o gênero *Chaetomium* isolado de *C. pubiflora* foi obtido a partir da semente. Já o gênero *Guignardia* também foi exclusivamente isolado das folhas. A diversidade de espécies associadas às folhas, amostras de caules e sementes de *C. pubiflora* calculada por meio do índice de Fisher- α exibiu de valores de 5,21, 6,23 e 4,77, respectivamente, logo se pode observar que a diversidade encontrada nas amostras de caule foi maior em relação às demais. As amostras de
25 caules de *C. pubiflora* apresentaram um índice de Margalef de 3,56, que foi mais alto que o índice apresentado para as folhas (3,41) e para as sementes (2,01). O índice de Simpson apresentou valores próximos para as comunidades associadas aos substratos amostrados: 0,88, 0,87 e 0,79, para caules, folhas e sementes, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 4. Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a folhas, caules e sementes de *Copaifera langsdorffii*.

Espécie endofítica	Folhas		Casca		Sementes		Total	
	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)
<i>Alternaria daucifolii</i>	11	3,65	0	0	1	0,33	12	3,98
<i>Aspergillus</i> sp. 1	0	0	0	0	1	0,33	1	0,33
<i>Aspergillus</i> sp. 2	1	0,33	0	0	0	0	1	0,33
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Cladosporium phaenocomae</i>	0	0	0	0	4	1,32	3	0,99
<i>Cladosporium</i> sp.	0	0	0	0	3	0,99	4	1,32
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	8	2,65	4	1,32	0	0	12	3,98
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	3	0,99	0	0	0	0	3	0,99
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	4	1,32	0	0	0	0	4	1,32
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	2	0,66	0	0	0	0	2	0,66
<i>Colletotrichum</i> sp. 5	1	0,33	0	0	0	0	1	0,33
<i>Curvularia</i> sp.	2	0,66	0	0	0	0	2	0,66
<i>Diaporthales</i> sp. 1	25	8,30	3	0,99	0	0	28	9,30
<i>Diaporthales</i> sp. 2	21	6,97	1	0,33	0	0	22	7,30
<i>Diaporthe</i> cf. <i>oxe</i>	0	0	2	0,66	0	0	2	0,66
<i>Diaporthe</i> sp. 1	0	0	3	0,99	0	0	3	0,99
<i>Diaporthe</i> sp. 2	7	2,32	4	1,32	0	0	11	3,65
<i>Diaporthe</i> sp. 3	8	2,65	1	0,33	0	0	9	2,99
<i>Diaporthe</i> sp. 4	3	0,99	1	0,33	0	0	4	1,32
<i>Diaporthe</i> sp. 5	4	1,32	5	1,66	0	0	9	2,99
<i>Diaporthe</i> sp. 6	13	4,31	29	9,63	0	0	42	13,95
<i>Diaporthe</i> sp. 7	1	0,33	3	0,99	0	0	4	1,32
<i>Diaporthe</i> sp. 8	10	3,32	5	1,66	0	0	15	4,98
<i>Diaporthe</i> sp. 9	1	0,33	0	0	0	0	1	0,33
<i>Diaporthe</i> sp. 10	2	0,66	0	0	0	0	2	0,66

<i>Diaporthe</i> sp. 11	2	0,66	0	0	0	0	2	0,66
<i>Diaporthe</i> sp. 12	4	1,32	2	0,66	0	0	6	1,99
<i>Diaporthe</i> sp. 13	2	0,66	0	0	0	0	2	0,66
<i>Diaporthe</i> sp. 14	3	0,99	10	3,32	0	0	13	4,31
<i>Diplodia pseudoseriata</i>	0	0	2	0,66	1	0,33	3	0,99
<i>Fusarium napiforme</i>	0	0	1	0,33	0	0	2	0,66
<i>Fusarium</i> sp. 1	2	0,66	0	0	0	0	1	0,33
<i>Guignardia</i> sp.	10	3,32	0	0	0	0	10	3,32
<i>Hypoxyton</i> sp.	0	0	0	0	1	0,33	1	0,33
<i>Lecytophora decumbens</i>	0	0	2	0,66	0	0	2	0,66
<i>Muscodor equiseti</i>	1	0,33	0	0	0	0	1	0,33
<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,33	0	0	9	2,99	10	3,32
<i>Pestalotiopsis australasiae</i>	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Pleosporales</i> sp. 1	1	0,33	0	0	2	0,66	3	0,99
<i>Pleosporales</i> sp. 2	0	0	0	0	1	0,33	1	0,33
<i>Preussia</i> sp. 1	0	0	2	0,66	1	0,33	3	0,99
<i>Preussia</i> sp. 2	1	0,33	1	0,33	0	0	2	0,66
<i>Sordariomycetes</i> sp. 1	3	0,99	0	0	0	0	3	0,99
<i>Sordariomycetes</i> sp. 2	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Xylariaceae</i> sp. 1	12	3,98	19	6,31	1	0,33	32	10,63
<i>Xylariaceae</i> sp. 2	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Xylariaceae</i> sp. 3	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
Total	169		107		25		301	

Tabela 5. Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a folhas, caules e sementes de *Copaifera pubiflora*.

Espécie endofítica	Folhas		Casca		Sementes		Total	
	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)
<i>Amphisphaeriaceae</i> sp.	4	1,35	0	0	0	0	4	1,35
<i>Aspergillus</i> sp. 1	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Aspergillus</i> sp. 2	0	0	0	0	2	0,67	2	0,67
<i>Botryosphaeria</i> sp.	2	0,67	2	0,67	0	0	4	1,35
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	0	0	1	0,33	1	0,33
<i>Colletotrichum</i> sp.	4	1,35	0	0	0	0	4	1,35
<i>Diaporthales</i> sp.	31	10,50	0	0	4	1,35	35	11,86
<i>Diaporthe</i> cf. <i>foeniculina</i>	0	0	1	0,33	0	0	1	0,33
<i>Diaporthe</i> sp. 1	5	1,69	9	3,05	0	0	14	4,74
<i>Diaporthe</i> sp. 2	0	0	2	0,67	0	0	2	0,67
<i>Diaporthe</i> sp. 3	7	2,37	4	1,35	0	0	11	3,72
<i>Diaporthe</i> sp. 4	3	1,01	0	0	0	0	3	1,01
<i>Diaporthe</i> sp. 5	30	10,16	21	7,11	0	0	51	17,28
<i>Diaporthe</i> sp. 6	8	2,71	5	1,69	0	0	13	4,40
<i>Diaporthe</i> sp. 7	1	0,33	0	0	0	0	1	0,33
<i>Diaporthe</i> sp. 8	11	3,72	15	5,08	0	0	26	8,81
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	2	0,67	0	0	2	0,67
<i>Guignardia</i> sp. 1	24	8,13	0	0	0	0	24	8,13
<i>Guignardia</i> sp. 2	42	14,23	0	0	0	0	42	14,23
<i>Hypoxylon</i> sp.	2	0,67	1	0,33	0	0	3	1,01
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	2	0,67	3	1,01	0	0	5	1,69
<i>Penicillium</i> sp.	1	0,33	3	1,01	2	0,67	6	2,03
<i>Pestalotiopsis colombiensis</i>	8	2,71	7	2,37	0	0	15	5,08
<i>Pleosporales</i> sp.	0	0	3	1,01	0	0	3	1,01

<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	1	0,33	2	0,67	0	0	3	1,01
<i>Xylariaceae</i> sp.	8	2,71	8	2,71	1	0,33	17	5,76
<i>Eremothecium coryli</i>	0	0	0	0	2	0,67	2	0,67
Total	194		89		12		295	

Tabela 6. Índices de diversidade dos fungos endofíticos isolados de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora*.

Índices	Planta hospedeira							
	<i>Copaifera langsdorffii</i>				<i>Copaifera pubiflora</i>			
	Folhas	Caules	Sementes	Total	Folhas	Caules	Sementes	Total
Simpson 1-D	0,93 (0,90/0,93)	0,87 (0,82/0,90)	0,81 (0,64/0,86)	0,94 (0,92/0,94)	0,87 (0,84/0,89)	0,88 (0,83/0,89)	0,79 (0,56/0,80)	0,90 (0,89/0,91)
Margalef	5,84 (4,48/5,65)	5,56 (3,63/5,13)	3,10 (1,55/2,79)	8,41 (6,30/7,88)	3,41 (2,65/3,41)	3,56 (2,67/3,56)	2,01 (0,80/2,01)	4,57 (3,69/4,57)
Fisher α	11,14 (7,64/10,6)	11,62 (6,19/10,26)	7,50 (2,50/6,17)	16,6 (11,09/15,14)	5,21 (3,79/5,21)	6,23 (4,19/6,23)	4,77 (1,28/4,77)	7,23 (5,49/7,23)

*Os números entre parênteses representam os menores e maiores valores de diversidade, respectivamente. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1.000 repetições.

5 O esforço amostral da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas, amostras de caule e sementes de *C. langsdorffii* e *C. pubiflora*, bem como a comunidade associada às duas espécies no total, foi avaliado por meio de curva de rarefação de espécies (Figura 21 e 22). Nenhuma das curvas atingiu uma assíntota, indicando que a diversidade total (riqueza e composição de espécies) não foi obtida.

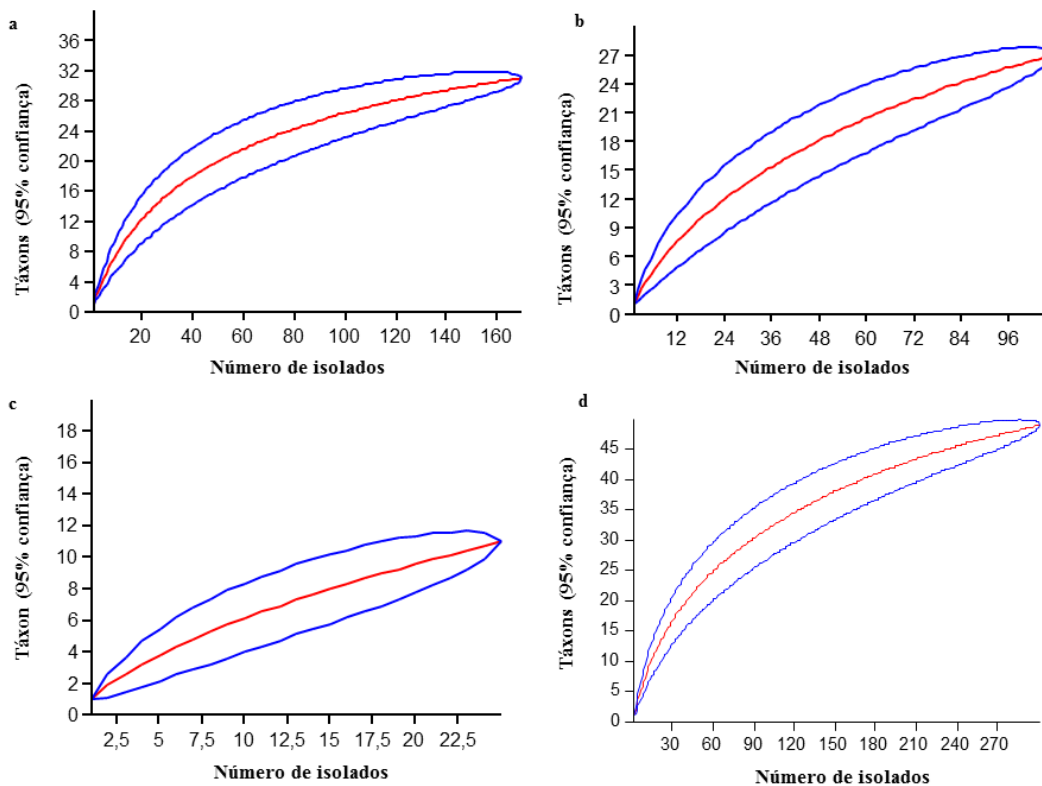


Figura 21. Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii*. As curvas foram construídas com intervalo de 95% de confiança: (a) amostragem de folhas, (b) amostragem de caule, (c) amostragem de sementes, (d) amostragem total.

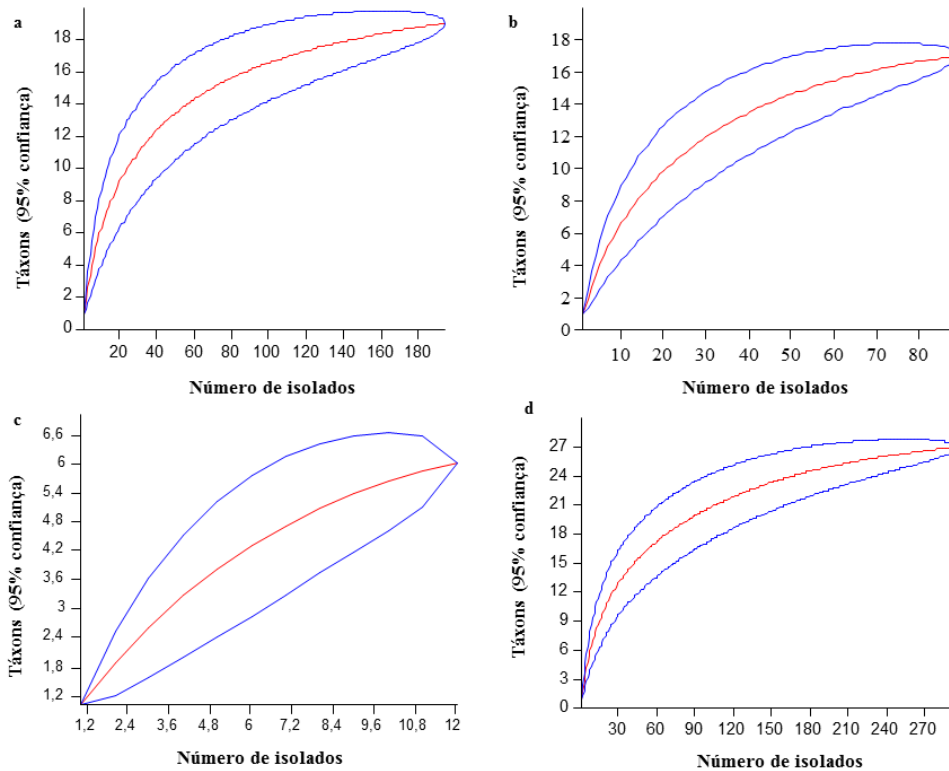


Figura 22. Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Copaifera pubiflora*. As curvas foram construídas com intervalo de 95% de confiança: (a) amostragem de folhas, (b) amostragem de caule, (c) amostragem de sementes, (d) amostragem total.

5

5.1.3 Triagem da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em placa

Setessentos e vinte e oito extratos etanólicos foram preparados para a realização dos ensaios biológicos; destes 668 extratos fúngicos, 30 de *C. langsdorffii* (15 foliares e 15 de amostras de caules) e 30 de *C. pubiflora* (15 de folhas e 15 de caules). Dos 668 extratos etanólicos obtidos a partir do cultivo dos fungos endofíticos, somente 11 (1,6%) apresentaram porcentagem de inibição de 70 a 100% frente a pelo menos um microrganismo alvo (Tabela 7). Não foi observada atividade dos extratos fúngicos frente a *P. aeruginosa*, *C. krusei* e *C. sphaerospermum*. Apenas *Hypoxylon* sp. UFMGCB 7613, isolado a partir de casca de *C. pubiflora*, apresentou atividade antifúngica seletiva frente *C. albicans* com 73% de inibição.

15

Alternaria daucifolii UFMGCB 7491, associado à *C. langsdorffii*, bem como *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7720, *Diaporthe* sp.8 UFMGCB 7770 e 7772 e *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927,

associados à *C. pubiflora*, apresentaram atividade antibacteriana seletiva frente a *E. coli* com 99 ou 100%, de inibição. Já *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719 e *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696, associados à *C. pubiflora*, apresentaram atividade antibacteriana frente *E. coli* e *S. aureus* com inibição variando entre 92 e 100% a 250 µg/mL.

5 Vinte e quatro extratos vegetais apresentaram atividade antimicrobiana. Destes, sete extratos de *C. langsdorffii* (três de folhas e quatro de caules) e 17 extratos de *C. pubiflora* (nove de folhas e oito de caules) (Tabela 8). Não foi detectada atividade de extratos vegetais frente *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Por outro lado, 11 extratos apresentaram atividade antifúngica frente *C. krusei* e oito extratos frente *C. sphaerospermum*. Após a triagem, todos os fungos que
10 apresentaram porcentagem de inibição $\geq 70\%$ foram recultivados em larga escala e produzidos seus extratos diclorometânicos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) bem como para posteriores análises químicas.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos dos fungos endofíticos associados à *Copaiifera langsdorffii* e *C. pubiflora* contra bactérias e fungos alvos.

Táxon	^a UFMGCB	Hospedeiro	Tecido/Espécime de isolamento	Atividade antimicrobiana (%)					
				^b EC	^c SA	^d PA	^e CA	^f CK	^g CS
<i>Alternaria daucifolii</i>	7491	<i>Copaiifera langsdorffii</i>	F/14	100 ± 22	21 ± 66	0 ± 10	0 ± 3	1 ± 14	0 ± 7
<i>Hypoxylon</i> sp.	7613	<i>Copaiifera pubiflora</i>	C/1	27 ± 6	2 ± 11	6 ± 2	73 ± 208	22 ± 22	0 ± 10
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7646		F/3	100 ± 139	98 ± 11	1 ± 1	0 ± 14	0 ± 21	16 ± 3
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7653		C/3	99 ± 257	98 ± 35	0 ± 0	12 ± 10	0 ± 9	7 ± 0
<i>Diaporthe</i> sp. 6	7696		C/5	100 ± 16	92 ± 1	0 ± 11	0 ± 44	0 ± 11	40 ± 36
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7701		C/5	99 ± 3	99 ± 2	0 ± 4	20 ± 6	0 ± 10	7 ± 0
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7719		C/6	100 ± 136	98 ± 1	0 ± 3	0 ± 11	0 ± 8	40 ± 2
<i>Diaporthe</i> sp. 6	7720		C/6	100 ± 153	0 ± 0	0 ± 11	0 ± 22	0 ± 14	9 ± 8
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7770		C/8	100 ± 41	21 ± 0	0 ± 12	0 ± 11	12 ± 19	9 ± 5
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7772		C/8	99 ± 43	65 ± 0	0 ± 14	0 ± 22	15 ± 17	9 ± 10
<i>Diaporthe</i> sp. 7	7927		F/15	99 ± 3	0 ± 0	0 ± 1	29 ± 7	21 ± 3	0 ± 14
Controles	Anfotericina B			--	--	--	100	100	
	Cloranfenicol			100	93	62	--	--	--
	Benomil			--	--	--	--	--	94

^aUFMGCB = Coleção de Culturas de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^b*Escherichia coli* ATCC 11775, ^c*Staphylococcus aureus* ATCC 12600, ^d*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, ^e*Candida albicans* ATCC 60193, ^f*Candida krusei* ATCC 6258, ^g*Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740. Concentrações: extratos fúngicos: 250 µg/mL, anfotericina B testada a 2 µg/mL, cloranfenicol a 32 µg/mL, benomil a 1,16 µg/mL. F: folha, C: caule, "--" não testado. Em negrito, os valores em porcentagem de inibição com o coeficiente de variação dos extratos que apresentaram porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 70% e que foram selecionados para testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Tabela 8. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas e amostras de caules de *Copaifera langsdorffii* e *C. pubiflora* contra bactérias e fungos alvos.

Código extrato	Espécime vegetal	Tecido vegetal	Atividade antimicrobiana (%)					
			^a EC	^b SA	^c PA	^d CA	^e CK	^f CS
CL1F	<i>Copaifera langsdorffii</i>	F	83 ± 0	55 ± 37	4 ± 11	0 ± 0	98 ± 82	89 ± 5
CL14F		F	70 ± 0	16 ± 2	0 ± 7	23 ± 1	0 ± 15	48 ± 1
CL15F		F	53 ± 0	72 ± 5	3 ± 15	32 ± 0	95 ± 82	87 ± 25
CL2C		C	39 ± 0	36 ± 2	16 ± 0	4 ± 1	89 ± 14	61 ± 9
CL5C		C	50 ± 0	25 ± 92	0 ± 15	26 ± 0	93 ± 70	73 ± 5
CL14C		C	43 ± 0	43 ± 50	0 ± 15	20 ± 1	72 ± 40	57 ± 7
CL15C	C	43 ± 0	55 ± 12	0 ± 10	0 ± 0	31 ± 46	75 ± 50	
CP4F	<i>Copaifera pubiflora</i>	F	75 ± 0	27 ± 22	0 ± 0	16 ± 7	0 ± 8	25 ± 6
CP5F		F	82 ± 0	21 ± 23	0 ± 3	19 ± 7	0 ± 12	37 ± 2
CP7F		F	73 ± 0	36 ± 2	0 ± 4	16 ± 20	0 ± 8	30 ± 3
CP9F		F	86 ± 0	32 ± 10	0 ± 10	24 ± 13	0 ± 5	25 ± 1
CP10F		F	84 ± 0	57 ± 8	0 ± 6	23 ± 9	0 ± 11	32 ± 6
CP11F		F	87 ± 0	78 ± 49	0 ± 2	21 ± 4	54 ± 44	35 ± 15
CP13F		F	85 ± 0	40 ± 24	0 ± 4	19 ± 3	0 ± 8	10 ± 18
CP14F		F	87 ± 0	78 ± 8	0 ± 14	31 ± 11	91 ± 11	76 ± 11
CP15F		F	84 ± 0	39 ± 22	0 ± 6	27 ± 1	0 ± 74	36 ± 4
CP1C		C	76 ± 0	72 ± 58	0 ± 0	26 ± 6	94 ± 4	84 ± 12
CP2C		C	80 ± 0	84 ± 12	0 ± 7	14 ± 7	96 ± 49	78 ± 16
CP3C		C	81 ± 2	61 ± 42	0 ± 8	27 ± 5	63 ± 43	28 ± 6
CP4C		C	82 ± 0	49 ± 10	0 ± 15	22 ± 3	0 ± 20	28 ± 19
CP5C		C	86 ± 0	76 ± 1	0 ± 12	41 ± 16	0 ± 11	47 ± 1
CP6C	C	83 ± 0	63 ± 14	0 ± 10	26 ± 3	78 ± 15	35 ± 8	

CP7C		C	83 ± 0	58 ± 26	0 ± 9	23 ± 8	95 ± 10	55 ± 39
CP8C		C	81 ± 0	63 ± 10	0 ± 9	32 ± 4	91 ± 97	81 ± 21
Controles	Anfotericina B		--	--	--	100	100	--
	Cloranfenicol		100	97	70	--	--	--
	Benomil		--	--	--	--	--	94

^a*Escherichia coli* ATCC 11775, ^b*Staphylococcus aureus* ATCC 12600, ^c*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, ^d*Candida albicans* ATCC 60193, ^e*Candida krusei* ATCC 6258, ^f*Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740. Concentrações: extratos vegetais: 250 µg/mL, anfotericina B testada a 2 µg/mL, cloranfenicol a 32 µg/mL, benomil a 1,16 µg/mL. F: folha, C: caule, "--" não testado. Em negrito, os valores em porcentagem de inibição com o coeficiente de variação dos extratos que apresentaram porcentagem de inibição do crescimento microbiano igual ou maior que 70% e que foram selecionados para testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

5.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ativos

A CIM foi determinada para os extratos etanólicos fúngicos selecionados de acordo com Tabela 7, com os extratos diclorometânicos produzidos em larga escala, bem como com os extratos etanólicos vegetais. Os extratos etanólicos vegetais exibiram valores de CIM entre 31,2 e >250 µg/mL (Tabela 9). O extrato etanólico de *Alternaria daucifolii* UFMGCB 7491 assim como o extrato da folha de *C. langsdorffii* (CL14F), tecido do qual este fungo foi isolado, apresentaram atividade frente *E. coli* a uma concentração de 125 µg/mL (Tabelas 9 e 10). Contudo, o extrato diclorometânico deste mesmo isolado apresentou valor de CIM de 7,8 µg/mL, 16 vezes menor. Nove extratos etanólicos obtidos de isolados de *Diaporthe* apresentaram valores de CIM frente *E. coli* de 62,5 a 250 µg/mL e diclorometânicos de 15,6 a 62,5 µg/mL. Destes nove extratos, cinco (*Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701 e 7719, e *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696) também apresentaram atividade frente *S. aureus* com valores de CIM de 62,5 a >250 µg/mL e 15,6 a 62,5 µg/mL para os extratos etanólicos e diclorometânicos, respectivamente (Tabela 10). No geral, os extratos fúngicos destes táxons apresentaram valores de CIM menores que os extratos dos tecidos vegetais dos quais foram isolados. Os extratos etanólico e diclorometânico de *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 apresentaram atividade contra *E. coli* nas concentrações de 250 e 15,6 µg/mL, respectivamente. Já o extrato etanólico da folha de *C. pubiflora* (CP15F), tecido do qual o isolado foi obtido, apresentou CIM de 125 µg/mL. O extrato etanólico do isolado *Hypoxylon* sp. UFMG 7613, bem como o extrato diclorometânico proveniente do seu recultivo, apresentaram CIM de >250 µg/mL frente *C. albicans*, portanto não repetiram a atividade antifúngica apresentada na triagem.

Tabela 9. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólicos vegetais bioativos.

Código do extrato	Hospedeiro	Tecido vegetal	Inibição dos microrganismos alvos (%)			
			^a EC	^b SA	^c CK	^d CS
CL1F	<i>Copaifera langsdorffi</i>	F	>250 (0 \pm 0)	--	250 (96 \pm 3)	>250 (62 \pm 27)
CL14F		F	125 (87 \pm 0)	--	--	--
CL15F		F	--	>250 (29 \pm 32)	>250 (67 \pm 11)	>250 (17 \pm 4)
CL2C		C	--	--	250 (93 \pm 20)	--
CL5C		C	--	--	>250 (56 \pm 18)	>250 (63 \pm 5)
CL14C		C	--	--	>250 (63 \pm 12)	--
CL15C		C	--	--	--	>250 (8 \pm 12)
CP4F	<i>Copaifera pubiflora</i>	F	>250 (0 \pm 3)	--	--	--
CP5F		F	>250 (0 \pm 2)	--	--	--
CP7F		F	>250 (0 \pm 1)	--	--	--
CP9F		F	>250 (0 \pm 3)	--	--	--
CP10F		F	>250 (0 \pm 2)	--	--	--
CP11F		F	>250 (0 \pm 0)	>250 (21 \pm 17)	--	--
CP13F		F	>250 (0 \pm 3)	--	--	--
CP14F		F	>250 (0 \pm 4)	>250 (35 \pm 13)	>250 (59 \pm 17)	>250 (67 \pm 16)
CP15F		F	125 (72 \pm 1)	--	--	--
CP1C		C	>250 (0 \pm 3)	250 (81 \pm 15)	250 (96 \pm 39)	>250 (59 \pm 10)
CP2C		C	>250 (0 \pm 2)	250 (85 \pm 17)	250 (95 \pm 21)	125 (70 \pm 10)
CP3C		C	125 (89 \pm 0)	--	--	--
CP4C		C	>250 (0 \pm 6)	--	--	--
CP5C		C	125 (92 \pm 0)	>250 (68 \pm 10)	--	--
CP6C		C	125 (87 \pm 0)	--	>250 (46 \pm 5)	--
CP7C	C	>250 (0 \pm 5)	--	>250 (63 \pm 11)	--	
CP8C	C	31,2 (74 \pm 2)	--	>250 (29 \pm 2)	>250 (57 \pm 4)	
Controles	Cloranfenicol		100	100	--	--
	Anfotericina B		--	--	100	--
	Benomil		--	--	--	98

^a*Escherichia coli* ATCC 11775, ^b*Staphylococcus aureus* ATCC 12600, ^c*Candida krusei* ATCC 6258, ^d*Cladosporium sphaerospermum* CCT 1740. Concentrações: cloranfenicol testado a 32 µg/mL, anfotericina B a 2 µg/mL, benomil a 1,16 µg/mL. F: folha, C: caule, "--" não testado. Em negrito, a concentração inibitória mínima (µg/mL) e em parêntese os valores em porcentagem de inibição com o coeficiente de variação.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos etanólicos e diclorometânicos dos fungos endofíticos bioativos.

Táxon	^a UFMGCB	Hospedeiro	Tecido/Espécime de isolamento	Inibição dos microrganismos alvos (%)					
				^b EC		^c SA		^d CA	
				Etanólico	Diclorometânico	Etanólico	Diclorometânico	Etanólico	Diclorometânico
<i>Alternaria daucifolii</i>	7491	<i>Copaifera langsdorffii</i>	F/14	125 (99 \pm 1)	7,8 (99 \pm 1)	--	--	--	--
<i>Hypoxylon</i> sp.	7613	<i>C. pubiflora</i>	C/1	--	--	--	--	>250 (0 \pm 0)	>250 (1 \pm 6)
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7646	<i>C. pubiflora</i>	F/3	125 (99 \pm 2)	15,6 (99 \pm 1)	250 (98 \pm 11)	15,6 (98 \pm 3)	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7653	<i>C. pubiflora</i>	C/3	250 (100 \pm 1)	31,2 (99 \pm 0)	>250 (37 \pm 11)	31,2 (98 \pm 2)	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 6	7696	<i>C. pubiflora</i>	C/5	125 (98 \pm 1)	31,2 (97 \pm 0)	250 (97 \pm 3)	62,5 (98 \pm 1)	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7701	<i>C. pubiflora</i>	C/5	62,5 (100 \pm 0)	15,6 (96 \pm 2)	62,5 (70 \pm 95)	15,6 (99 \pm 12)	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7719	<i>C. pubiflora</i>	C/6	62,5 (97 \pm 1)	15,6 (98 \pm 1)	125 (75 \pm 73)	15,6 (95 \pm 2)	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 6	7720	<i>C. pubiflora</i>	C/6	250 (98 \pm 15)	62,5 (99 \pm 2)	--	--	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7770	<i>C. pubiflora</i>	C/8	250 (99 \pm 1)	62,5 (99 \pm 1)	--	--	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 8	7772	<i>C. pubiflora</i>	C/8	125 (99 \pm 1)	31,2 (99 \pm 8)	--	--	--	--
<i>Diaporthe</i> sp. 7	7927	<i>C. pubiflora</i>	F/15	250 (100 \pm 2)	15,6 (84 \pm 0)	--	--	--	--
Controles	Cloranfenicol			100	99	100	98	--	--
	Anfotericina B			--	--	--	--	100	97

^aUFMGCB = Cultura de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^b*Escherichia coli* ATCC 11775, ^c*Staphylococcus aureus* ATCC 12600, ^d*Candida albicans* ATCC 60193. Concentrações: cloranfenicol: 32 $\mu\text{g/mL}$, anfotericina B: 2 $\mu\text{g/mL}$. F: folha, C: caule, "--" não testado. Em negrito, a concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) e em parêntese os valores em porcentagem de inibição com o coeficiente de variação.

5.1.5 Determinação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia

Os extratos diclorometânicos produzidos a partir do cultivo em larga escala dos isolados *Alternaria daucifolii* UFMGCB 7491 (*C. langsdorffii*), *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696 e 7720, 5 *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 e *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719, 7770, 7772 (*C. pubiflora*) foram selecionados para análise química a fim de caracterizar e, posteriormente, isolar e identificar seus metabólitos secundários bioativos.

Inicialmente, os extratos citados, bem como os extratos vegetais referentes aos tecidos de isolamento (CL14F, CP3C, CP5C, CP6C, CP8C e CP15F) destes fungos, foram submetidos à 10 bioautografia para avaliação da atividade antifúngica contra fungos de interesse na agricultura. Os extratos foram testados a 160 µg/ponto frente aos fitopatógenos *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*, agentes causadores da antracnose em vegetais, exibindo atividade contra pelo menos um dos alvos avaliados (Tabela 11). O extrato de *Alternaria daucifolii* 15 UFMGCB 7491 (*C. langsdorffii*) gerou zonas claras de inibição do crescimento fúngico contra *C. fragariae* e zonas difusas contra *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Resultado semelhante foi obtido ao se testar os extratos vegetais, os quais inibiram o crescimento apenas de *C. fragariae* e apresentaram zonas difusas ou sem atividade para os demais alvos.

Os extratos produzidos a partir dos fungos associados a *C. pubiflora* apresentaram zonas 20 claras de inibição frente ao crescimento de todas as espécies de *Colletotrichum* avaliadas, com diâmetro dos halos de 5 a 19 mm. Tais extratos produzidos a partir dos isolados pertencentes ao gênero *Diaporthe* apresentaram os maiores diâmetros das zonas de inibição frente a *C. gloeosporioides*, com valores de 14 a 19 mm, ao se comparar com os controles benomil e captan, fungicidas amplamente utilizados na agricultura, os quais apresentaram halo de inibição de 15 mm cada (Tabela 11).

25

Tabela 11. Atividade antifúngica de extratos diclorometânicos dos fungos endofíticos e vegetais bioativos pelo método de bioautografia contra espécies *Colletotrichum*.

Táxon	Código do extrato	Planta	Tecido/Espécime de isolamento	Inibição do crescimento fúngico (mm) ^c		
				<i>Colletotrichum fragariae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>Alternaria daucifolii</i>	^a UFMGCB 7491	<i>Copaifera langsdorffii</i>	F/14	7	zd	zd
<i>Diaporthe</i> sp. 8	UFMGCB 7646	<i>C. pubiflora</i>	F/3	6	16	6
<i>Diaporthe</i> sp. 8	UFMGCB 7653		C/3	5	16	5
<i>Diaporthe</i> sp. 6	UFMGCB 7696		C/5	6	17	5
<i>Diaporthe</i> sp. 8	UFMGCB 7701		C/5	5	14	6
<i>Diaporthe</i> sp. 8	UFMGCB 7719		C/6	6	15	6
<i>Diaporthe</i> sp. 6	UFMGCB 7720		C/6	5	19	5
<i>Diaporthe</i> sp. 8	UFMGCB 7770		C/8	5	18	5
<i>Diaporthe</i> sp. 8	UFMGCB7772		C/8	5	15	5
<i>Diaporthe</i> sp. 7	UFMGCB 7927		F/15	5	5	6
	^b CP3C	<i>C. pubiflora</i>	C/3	7	zd	zd
	CP5C		C/5	6	zd	zd
	CP6C		C/6	6	zd	zd
	CP8C		C/8	7	0	zd
	CP15F		F/15	5	zd	zd
	^b CL14F	<i>C. langsdorffii</i>	F/14	7	0	zd
		Controles	Captan	22	15	16
			Benomil	18	15	0
			Azoxistrobilurina	zd	22	zd
			Ciprodinil	zd	20	zd

^aUFMGCB = Coleção de Microrganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^bExtrato vegetal. ^cMédia das dimensões das zonas de inibição do crescimento fúngico (mm). F: folha, C: caule, zd = zona difusa. Concentrações: extratos fúngicos: 160 µg/ponto, captan testado a 1,2 µg/ponto, benomil a 1,16 µg/ponto, azoxistrobilurina a 1,61 µg/ponto, ciprodinil a 0,9 µg/ponto.

5.1.6 Análise química, fracionamento biomonitorado e identificação dos metabólitos bioativos

Os extratos diclorometânicos ativos no ensaio de bioautografia foram inicialmente submetidos à espectroscopia de RMN ^1H que representou a primeira parte dos experimentos de caracterização química. Os espectros de RMN ^1H dos extratos de *Alternaria daucifolii* UFMGCB 7491 (*C. langsdorffii*) (Anexo 20) e *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 (*C. pubiflora*) (Anexo 21), bem como do extrato vegetal CL14F exibiram sinais referentes a presença majoritária de ácidos graxos. Estes extratos foram submetidos à CG-DIC a qual confirmou a presença de uma mistura de 12 ácidos graxos (Tabela 12), que foram identificados por meio da comparação do tempo de retenção dos padrões comerciais de ésteres metílicos com o tempo de retenção dos compostos de interesse nos extratos brutos metilados. Os principais ácidos graxos identificados no extrato do fungo *A. daucifolii* UFMGCB 7491 foram os ácidos linoleico, palmítico e elaídico. Já na análise do extrato vegetal CL14F, tecido do qual foi isolado, o ácido palmítico apresentou a maior concentração, seguido pelo palmitoléico. No extrato do táxon *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 os ácidos identificados em maiores concentrações foram oléico, linoléico, estearidônico e palmítico. Os demais ácidos graxos encontraram-se em concentrações menores, abaixo de 10%.

A análise dos espectros RMN ^1H dos extratos de *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696 e 7720, e *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719, 7770, 7772 (*C. pubiflora*) exibiram sinais semelhantes referentes à presença de hidrogênios aromáticos e ausência de ácidos graxos (Figura 23). Considerando os seguintes fatores:

- 1) a semelhança dos espectros dos isolados citados;
- 2) os isolados citados pertencem ao mesmo morfotipo de acordo com as características macromorfológicas;
- 3) os isolados foram identificados como pertencentes ao mesmo gênero (*Diaporthe*);
- 4) rendimento do extrato obtido após o cultivo em larga escala.

Devido os fatores citados acima, o extrato de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719 foi selecionado para o fracionamento químico biomonitorado (Figura 24). A análise dos espectros RMN ^1H dos extratos de *C. pubiflora* também exibiram sinais referentes à presença da mesma classe de substâncias e foram mantidos para análises posteriores.

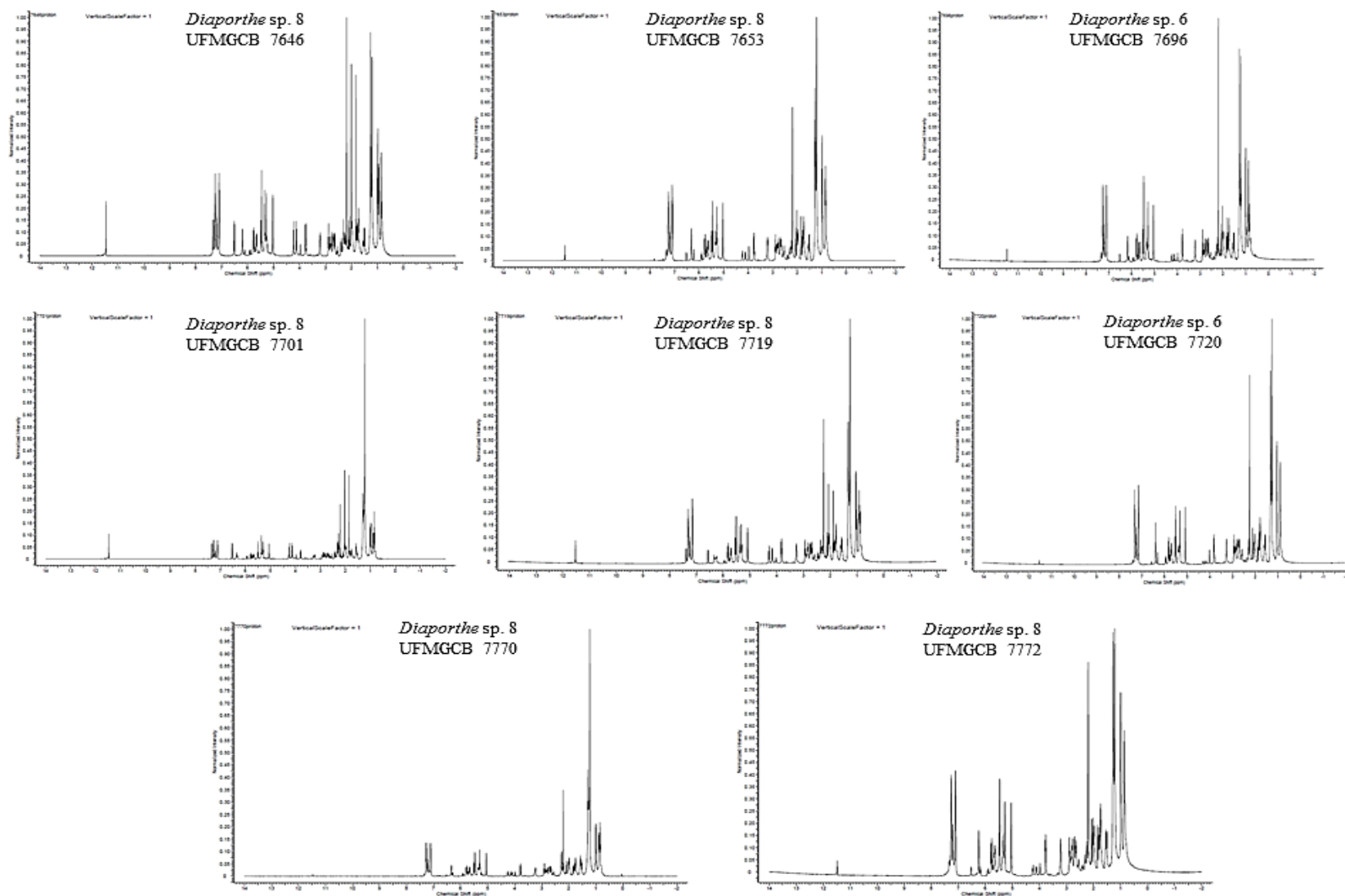


Figura 23. Espectros RMN ^1H dos extratos de *Diaporthe* sp. 6 UFMGCB 7696 e 7720, e *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7646, 7653, 7701, 7719, 7770, 7772 exibiram sinais semelhantes referentes à presença de hidrogênios aromáticos.

Tabela 12. Quantificação de ácidos graxos (em porcentagem) em extratos produzidos por fungos endofíticos e seu hospedeiro.

Ácidos graxos	Fungos endofíticos		<i>Copaifera langsdorffii</i>
	<i>Alternaria daucifolii</i> UFMGCB 7491	<i>Diaporthe sp.7</i> UFMGCB 7927	CL14F
Pentadecanóico (15:0)	^a 2,6	2,9	-
Palmítico (16:0)	25,9	18,3	50,3
Elaídico (18:1n9t)	23,6	-	-
(LA) Linoleico (18:2n6c)	47,9	23,2	-
Tridecanóico (13:0)	-	0,5	-
Mirístico (14:0)	-	0,6	-
Palmitoléico (16:1)	-	1,1	49,7
Esteárico (18:0)	-	5,3	-
Oléico (18:1n9c)	-	25,3	-
Nonadecanóico (19:0)	-	1,2	-
Estearidônico (18:4n3)	-	20,7	-
(EPA) Eicosopentaenóico (20:5n3)	-	0,8	-

^aValor em porcentagem, “-”: ausência de ácidos graxos.

5 *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719 foi recultivado obtendo-se 528 mg de extrato diclorometânico. Nas análises de CCD, o extrato bruto foi dissolvido a 1 mg/mL em DCM e conduzidas em sílica gel (UNIPLATE™) como fase estacionária, com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Hexano/Acetato de Etila 8:2, Hexano/Éter 5:5, Hexano/Acetato de Etila 5:5 e Acetato de Etila/Hexano 8:2. Após a revelação com o reagente Godin, a melhor
10 condição foi obtida com a mistura Acetato de Etila/Hexano 8:2.

A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). Quatrocentos miligramas de extrato foi dissolvido em 2 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada
15 em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge utilizando o fluxo de 40 mL/min, com detecção no UV 254 e 360 nm, tendo como gradiente Hexano/Acetato de etila, com 80:20 a 0:100 volume de 2.300 mL (57 min e 30 seg).

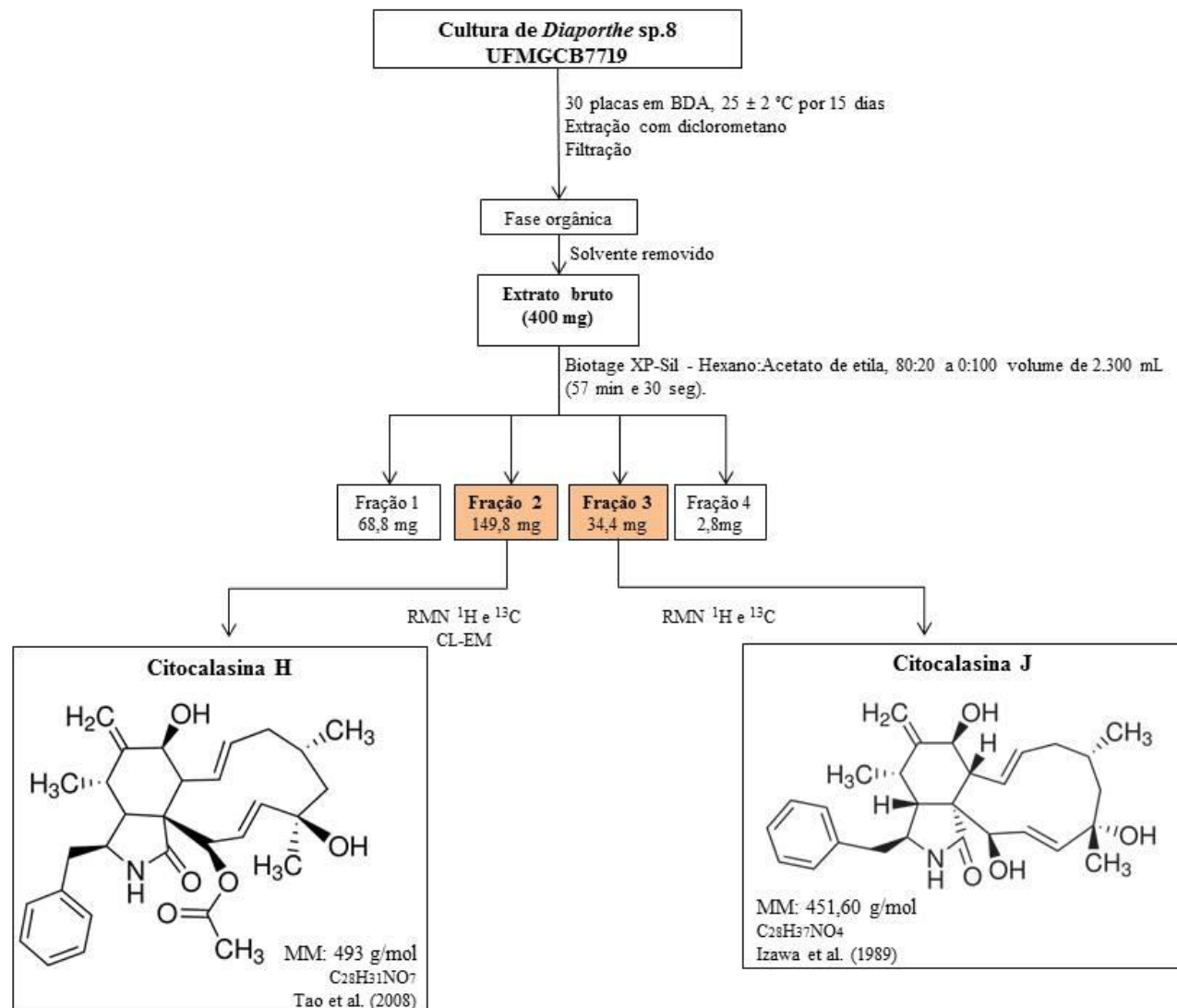


Figura 24. Fluxograma do fracionamento químico biomonitorado do extrato diclorometânico de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719.

Após o fracionamento foram coletadas porções individuais de 22 mL em 106 tubos de ensaio (16 x 150 mm). Cada porção obtida foi submetida à CCD (Acetato de etila/Hexano 8:2) e de acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em quatro frações [**1** (1-63; 68,8 mg), **2** (64-80; 149,8 mg), **3** (81-96; 34,4 mg), **4** (97-106; 2,8mg)], as quais foram concentradas em rota-evaporador e então submetidas ao ensaio antifúngico, sendo testadas a 10 e 100 µg/ponto. Quando as frações foram testadas a 100 µg/ponto, a fração 2 exibiu zonas claras de inibição do crescimento de *Colletotrichum fragariae* e *C. gloeosporioides*, com diâmetros dos halos de 12 e 10 mm, respectivamente, e zona difusa de crescimento do alvo *C. acutatum*. A fração 3 apresentou atividade antifúngica contra *C. fragariae*, halo de 8 mm de diâmetro, e atividade difusa contra *C. gloeosporioides*. As demais 1 e 4 não exibiram atividade antifúngica considerável.

As frações 2 e 3 que apresentaram atividade antifúngica foram submetidas a RMN ¹H e ¹³C. Os sinais exibidos pelos espectros da fração 2, juntamente com os dados obtidos a partir do CL-EM/EM, bem como fórmula molecular (*m/z* 494.22906 [M+H]⁺, calculado para C₂₈H₃₂N₁O₇, 494.21788; *m/z* 492.20808 [M-H]⁻, calculado para C₂₈H₃₀N₁O₇, 492.20223) permitiram identificar a molécula ativa como **citocalasina H** (Anexos 1 – 4). Os dados de RMN corroboram com os dados encontrados na literatura, descritos por Tao et al. (2007) (Figura 24). Para a fração 3, somente os dados obtidos a partir dos espectros de ¹H e ¹³C juntamente com os dados descritos por Izawa et al. (1989) permitiram finalizar a identificação da substância bioativa como **citocalasina J** (Figura 24) (Anexos 5 e 6).

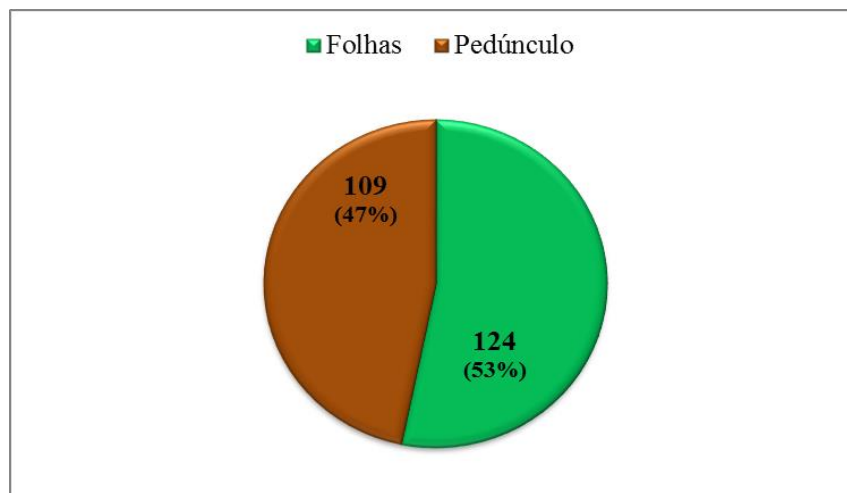
5.2 DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Echinacea purpurea* L. (Moench.)

5.2.1 Coleta, isolamento e identificação dos fungos endofíticos

5

Uma folha e um fragmento do pedúnculo saudáveis de 41 plantas de *E. purpurea* foram coletados para isolamento dos fungos endofíticos, sendo utilizados cinco fragmentos de cada. Do total de 410 fragmentos processados (10 fragmentos por indivíduo) foram obtidos 233 isolados de fungos endofíticos, 124 (53%) associados às folhas e 109 (47%) ao pedúnculo (Figura 25). Os fungos endofíticos obtidos foram preservados em glicerol 15% a -80 °C e armazenados no *Natural Products Utilization Research Unit* pertencente ao *National Center for Natural Products Research* (ARS/NPURU/USDA).

10



15 **Figura 25.** Isolados de fungos endofíticos associados a folhas e pedúnculos de *Echinacea purpurea* L. (Moench.).

Os isolados de fungos endofíticos obtidos foram agrupados em 50 morfotipos de acordo com suas características macromorfológicas. Ao final do processo de sequenciamento foram obtidas 42 unidades taxonômicas distintas (UTD) (Tabela 13, Figuras 26 e 27) e todos os táxons identificados foram classificados como pertencentes ao filo *Ascomycota*. A classe *Sordariomycetes* foi predominante com 55% dos táxons obtidos, seguida pela classe *Dothideomycetes* com 45%.

20

Tabela 13. Identificação dos fungos endofíticos associados à *Equinacea purpurea* utilizando o programa BLASTn, o banco de sequências do NCBI GenBank, bem como análises filogenéticas utilizando o programa MEGA 6.

Código do isolado ^a	Tecido de isolamento ^b	Nº de isolados	Sequência tipo de referência do BLAST (Número de acesso GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº pb analisados	^d Espécie ou grupo taxonômico sugerido
EPU10FB	F	1	<i>Alternaria alternata</i> (KF913536)	100	100	475	<i>Alternaria longipes</i> (KP057248)
EPU24CB	P	1	<i>Alternaria</i> sp. (JX909350)	100	100	496	<i>Alternaria arbusti</i> (KP057249)
EPU17FC	F, P	4	<i>Alternaria alternata</i> (JF835812)	100	100	463	<i>Alternaria arborescens</i> (KP057250)
EPU27FB	F, P	7	<i>Alternaria alternata</i> (KJ173524)	100	100	404	<i>Alternaria</i> sp. (KP127976)
EPU10CC	F, P	5	<i>Alternaria tenuis</i> (KF951007)	100	100	535	<i>Alternaria tenuissima</i> (KP127977)
EPU6CA	F, P	81	<i>Alternaria tenuissima</i> (KJ082100)	100	100	544	<i>Alternaria alternata</i> (KP127978)
EPU38CA	P	2	<i>Biscogniauxia mediterranea</i> (KF850388)	100	100	516	<i>Biscogniauxia mediterranea</i> (KP127979)
EPU26CB	P	1	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (JQ260829)	100	99	428	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (KP127980)
EPU32CA	P	1	<i>Cercospora zebrina</i> (KC172066)	100	100	502	<i>Cercospora</i> cf. <i>citulina</i> (KP127981)
EPU7FD	F	1	<i>Cercospora ariminensis</i> (KF251297)	100	100	456	<i>Cercospora</i> cf. <i>helianthicola</i> (KP127982)
EPU20CD	P	1	<i>Cladosporium</i> sp. (KC339771)	100	100	487	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (KP127983)
EPU7CB	F, P	3	<i>Cladosporium</i> sp. (KJ361498)	100	100	452	<i>Cladosporium</i> sp. (KP127984)
EPU38FC	F, P	34	<i>Colletotrichum dematium</i> (KC790957)	100	100	536	<i>Colletotrichum dematium</i> (KP127985)
EPU19FB	F	1	<i>Colletotrichum trifolii</i> (AF451909)	100	100	559	<i>Colletotrichum destructivum</i> (KP127986)
EPU6CB	F, P	4	<i>Colletotrichum</i> sp. (KC110789)	100	99	536	<i>Colletotrichum spaethianum</i> (KP127987)
EPU39FE	F, P	6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JX867216)	100	100	553	<i>Colletotrichum trifolii</i> (KP127988)
EPU12FB	F, P	4	<i>Colletotrichum truncatum</i> (KC954708)	100	100	545	<i>Colletotrichum lineola</i> (KP127989)
EPU17CA	P	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> (KF717039)	100	100	426	<i>Colletotrichum</i> sp. 1 (KP127990)
EPU3FA	F	1	<i>Colletotrichum boninense</i> (JX258781)	100	100	563	<i>Colletotrichum</i> sp. 2 (KP127991)
EPU24FB	F	2	<i>Colletotrichum destructivum</i> (KF181248)	100	99	556	<i>Colletotrichum</i> sp. 3 (KP127992)
EPU8FB	F, P	5	<i>Colletotrichum fructicola</i> (KJ185128)	100	100	359	<i>Colletotrichum</i> sp. 4 (KP127993)
EPU22FA	F, P	4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (JX258743)	100	99	569	<i>Colletotrichum</i> sp. 5 (KP127994)
EPU35CC	P	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KJ174398)	100	99	470	<i>Colletotrichum</i> sp. 6 (KP127995)

EPU24CA	P	6	<i>Diaporthe angelicae</i> (KC343027)	100	98	505	<i>Diaporthe cuppatea</i> (KP127996)
EPU5FF	F	1	<i>Diaporthe hordei</i> (KC343120)	100	97	253	<i>Diaporthe</i> sp. 1 (KP127997)
EPU32FB	F, P	5	<i>Diaporthe</i> sp. (HQ449993)	94	99	444	<i>Diaporthe</i> sp. 2 (KP127998)
EPU18FB	F, P	2	<i>Didymella</i> sp. (HQ607826)	100	99	509	<i>Didymella</i> sp. (KP127999)
EPU36CA	P	1	<i>Fusarium armeniacum</i> (KF944456)	100	100	523	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (KP128000)
EPU9CB	P	1	<i>Fusarium tricinctum</i> (KC831591)	100	100	460	<i>Fusarium</i> sp. (KP128001)
EPU13CC	P	2	<i>Nigrospora oryzae</i> (EU436680)	99	100	528	<i>Nigrospora oryzae</i> (KP128002)
EPU33CB	P	6	<i>Periconia</i> sp. (HQ607981)	100	100	534	<i>Periconia</i> sp. (KP128003)
EPU22CB	P	1	<i>Pestalotiopsis</i> (KF228021)	100	100	524	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (KP128004)
EPU34CA	P	1	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (AB714986)	100	99	518	<i>Phoma</i> sp. (KP128005)
EPU29FA	F	3	<i>Phoma</i> sp. (KF850398)	99	100	512	<i>Phoma novae-verbascicola</i> (KP128006)
EPU6FD	F	1	<i>Phomopsis</i> sp. (AY745019)	100	99	479	<i>Phomopsis</i> sp. 1 (KP128008)
EPU1CB	P	2	<i>Phomopsis</i> sp. (JF431292)	100	99	527	<i>Phomopsis</i> sp. 2 (KP128009)
EPU36FB	F	1	<i>Phyllosticta</i> sp. (DQ377928)	99	99	582	<i>Phyllosticta pyrolae</i> (KP128010)
EPU2CA	P	2	Fungal sp. (GQ996066)	97	97	475	<i>Sordariomycetes</i> sp. 1 (KP128011)
EPU30CD	P	3	<i>Sordariomycetes</i> sp. (JQ761494)	100	100	710	<i>Sordariomycetes</i> sp. 2 (KP128012)
EPU23FB	F, P	10	<i>Stagonosporopsis dennisii</i> (GU237899)	100	100	452	<i>Stagonosporopsis</i> sp. 1 (KP128013)
EPU6CC	F, P	12	<i>Stagonosporopsis heliopsisidis</i> (GU237924)	100	100	457	<i>Stagonosporopsis</i> sp. 2 (KP128014)
EPU12FC	F, P	2	<i>Phoma valerianellae</i> (GU128539)	99	99	517	<i>Stagonosporopsis valerianellae</i> (KP128007)

^aIsolado submetido à análise filogenética baseada no sequenciamento da região transcrita interna (ITS) da região gênica do rRNA. ^bTecido de isolamento, F: folha, P: pedúnculo. ^cPosição taxonômica sugerida.

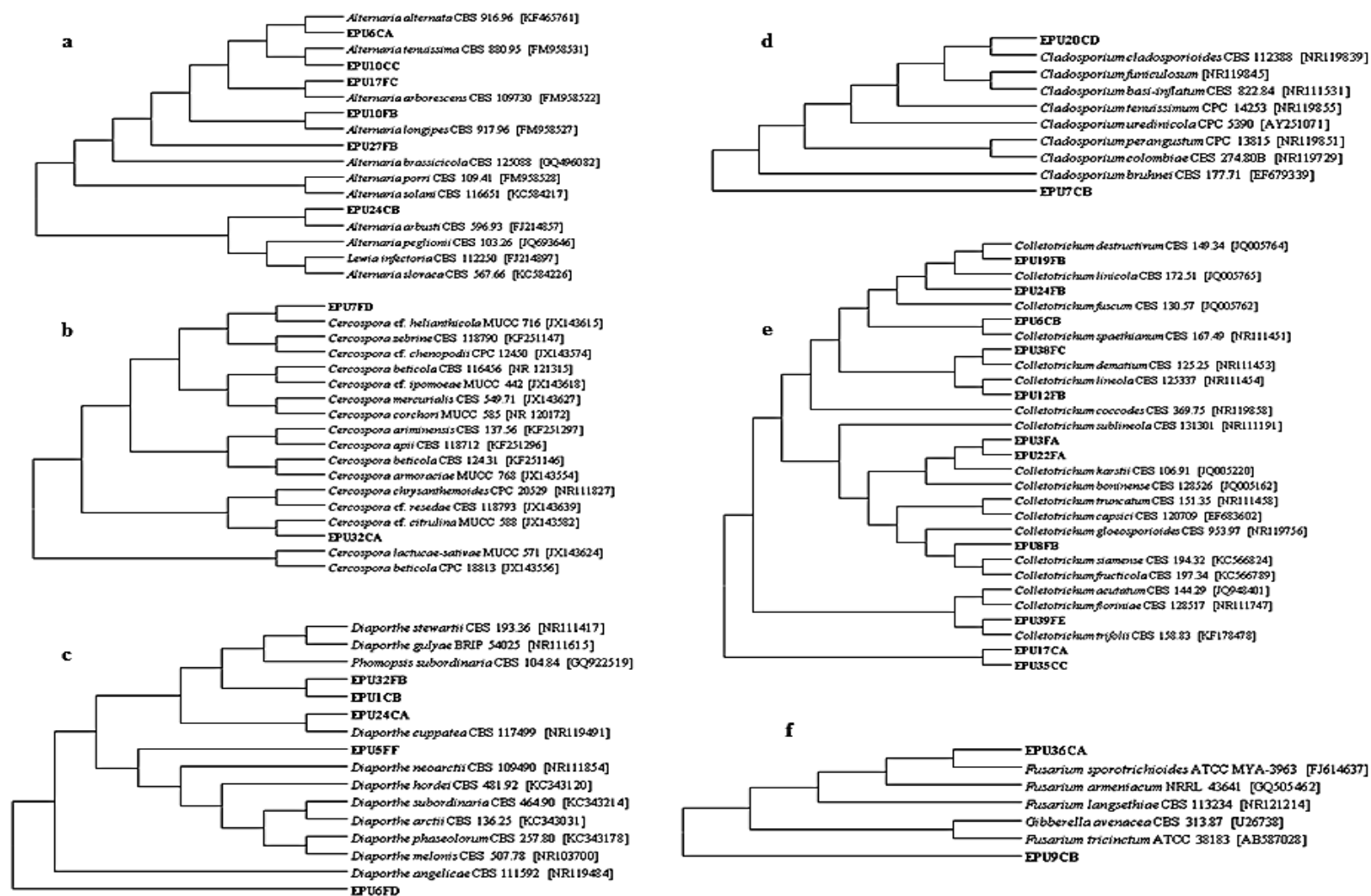


Figura 26. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Equinacea purpurea* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Alternaria*, (b) *Cercospora*, (c) *Diaporthe*, (d) *Cladosporium*, (e) *Colletotrichum*, (f) *Fusarium*.

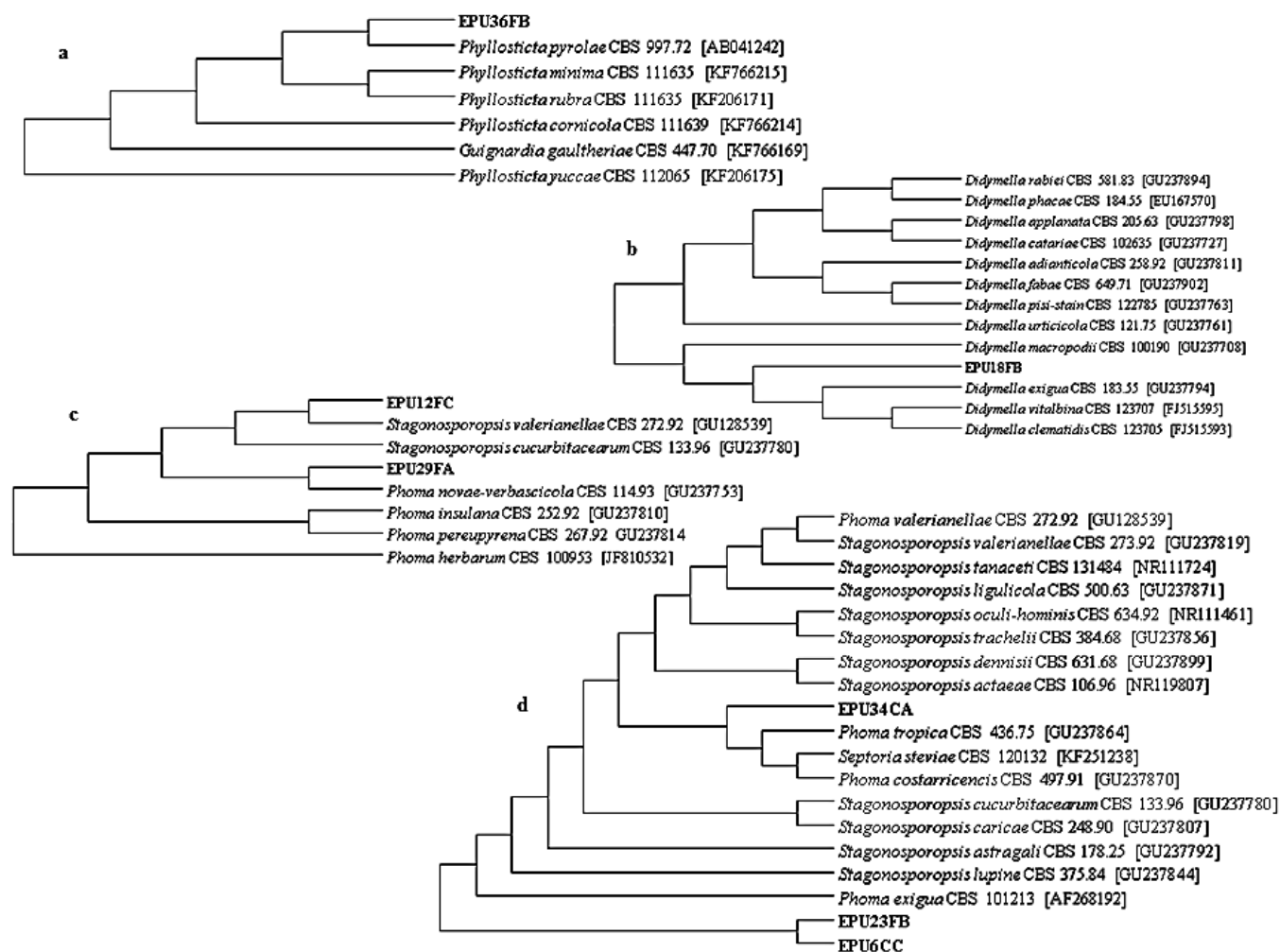


Figura 27. Análise filogenética das sequências de fungos endofíticos (em negrito) associados à *Equinacea purpurea* comparadas com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no GenBank próximas após análises realizadas utilizando o BLAST. As árvores foram construídas com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA, utilizando o método *Maximum composite likelihood*. As árvores representam as análises dos gêneros: (a) *Phyllosticta*, (b) *Didymella*, (c) *Phoma*, (d) *Stagonosporopsis*.

Dentro da comunidade endofítica, 12 táxons representaram componentes intermediários (frequência $\geq 1,71$ e $\leq 4,29$) variando de 10 a quatro isolados obtidos, 17 ocorreram como singletos, ou seja, com apenas um isolado, e dois foram identificados em nível de classe (*Sordariomycetes* sp. 1 EPU2CA e *Sordariomycetes* sp.2 EPU30CD). Os gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum* e *Stagonosporopsis* foram os dominantes com 99 (42,5%), 63 (27%) e 24 (10%) isolados, respectivamente. Destes, *A. alternata*, *C. dematium* e *Stagonosporopsis* sp. 2 representaram $\geq 54.5\%$ da frequência total de isolados dentro da comunidade.

5.2.2 Análise da diversidade de fungos endofíticos associados a *E. purpurea*

10

A abundância dos táxons endofíticos associados a *E. purpurea* variou de 0,42 a 34,96% e *A. alternata* foi o mais abundante com 34,76% (Tabela 14). A abundância de cada táxon nas partes vegetais selecionadas para o isolamento dos fungos endofíticos (folha e pedúnculos) foi maior nas folhas. A maioria dos gêneros identificados associados a *E. purpurea* foram obtidos de ambas. O gênero *Phyllosticta* foi isolado exclusivamente das folhas. Em contrapartida seis gêneros (*Biscogniauxia*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Periconia* e *Pestalotiopsis*) foram isolados somente dos pedúnculos.

15

20

O índice de Fisher- α exibiu valores de 9,43 para espécies de fungos associadas às folhas e 16,09 para os pedúnculos de *E. purpurea*, sugerindo que a diversidade de espécies associadas aos pedúnculos foi maior em relação às folhas. Os pedúnculos de *E. purpurea* apresentaram índice de riqueza de espécies mais alto (Margalef = 6,82) quando comparado com as folhas (Margalef = 4,97). O índice de dominância (Simpson) foi mais alto para a comunidade de espécies associada aos pedúnculos (0,82) em relação às folhas (0,72) (Tabela 15). Nenhuma das curvas de rarefação de espécies atingiu uma assíntota, indicando que a diversidade total (riqueza e composição de espécies) não foi obtida (Figura 28).

25

Tabela 14. Número de isolados e abundância dos fungos endofíticos associados a folhas e pedúnculos de *Equinacea purpurea*.

Espécie endofítica	Folhas		Pedúnculos		Total	
	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)	Nº isolados	Abundância (%)
<i>Alternaria longipes</i>	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Alternaria arbusti</i>	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Alternaria arborescens</i>	2	0,85	2	0,85	4	1,71
<i>Alternaria</i> sp.	5	2,14	2	0,85	7	3,00
<i>Alternaria tenuissima</i>	2	0,85	3	1,28	5	2,14
<i>Alternaria alternata</i>	48	20,60	33	14,16	81	34,76
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	0	0	2	0,85	2	0,85
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Cercospora</i> cf. <i>citulina</i>	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Cercospora</i> cf. <i>helianthicola</i>	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0,42	2	0,85	3	1,28
<i>Colletotrichum dematium</i>	27	11,58	7	3,00	34	14,59
<i>Colletotrichum destructivum</i>	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Colletotrichum spaethianum</i>	2	0,85	2	0,85	4	1,71
<i>Colletotrichum trifolii</i>	4	1,71	2	0,85	6	2,57
<i>Colletotrichum lineola</i>	3	1,28	1	0,42	4	1,71
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	2	0,85	0	0	2	0,85
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	3	1,28	2	0,85	5	2,14
<i>Colletotrichum</i> sp. 5	2	0,85	2	0,85	4	1,71
<i>Colletotrichum</i> sp. 6	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Diaporthe cuppatea</i>	0	0	6	2,57	6	2,57

<i>Diaporthe</i> sp. 1	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Diaporthe</i> sp. 2	2	0,85	3	1,28	5	2,14
<i>Didymella</i> sp.	1	0,42	1	0,42	2	0,85
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Fusarium</i> sp.	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Nigrospora oryzae</i>	0	0	2	0,85	2	0,85
<i>Periconia</i> sp.	0	0	6	2,57	6	2,57
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Phoma</i> sp.	0	0	1	0,42	1	0,42
<i>Phoma novae-verbascicola</i>	3	1,28	0	0	3	1,28
<i>Phomopsis</i> sp. 1	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Phomopsis</i> sp. 2	0	0	2	0,85	2	0,85
<i>Phyllosticta pyrolae</i>	1	0,42	0	0	1	0,42
<i>Sordariomycetes</i> sp. 1	0	0	2	0,85	2	0,85
<i>Sordariomycetes</i> sp. 2	0	0	3	1,28	3	1,28
<i>Stagonosporopsis</i> sp. 1	3	1,28	7	3,00	10	4,29
<i>Stagonosporopsis</i> sp. 2	6	2,57	6	2,57	12	5,15
<i>Stagonosporopsis valerianellae</i>	1	0,42	1	0,42	2	0,85
Total	124		109		233	

Tabela 15. Índices de diversidade dos fungos endofíticos isolados de *Equinacea purpurea*.

Índices	Planta Hospedeira		
	<i>Echinacea purpurea</i>		
	Folhas	Pedúnculos	Total
Simpson 1-D	0,79 (0,72/0,83)	0,88 (0,82/0,91)	0,84 (0,79/0,87)
Margalef	4,97 (3,31/4,77)	6,82 (4,68/6,18)	7,52 (5,32/6,97)
Fisher α	9,43 (5,33/8,86)	16,09 (8,90/13,67)	14,96 (9,16/13,39)

*Os números entre parênteses representam os menores e maiores valores de diversidade, respectivamente. Os resultados foram obtidos com um intervalo de confiança de 95% e os valores de bootstrap foram calculados a partir de 1.000 repetições.

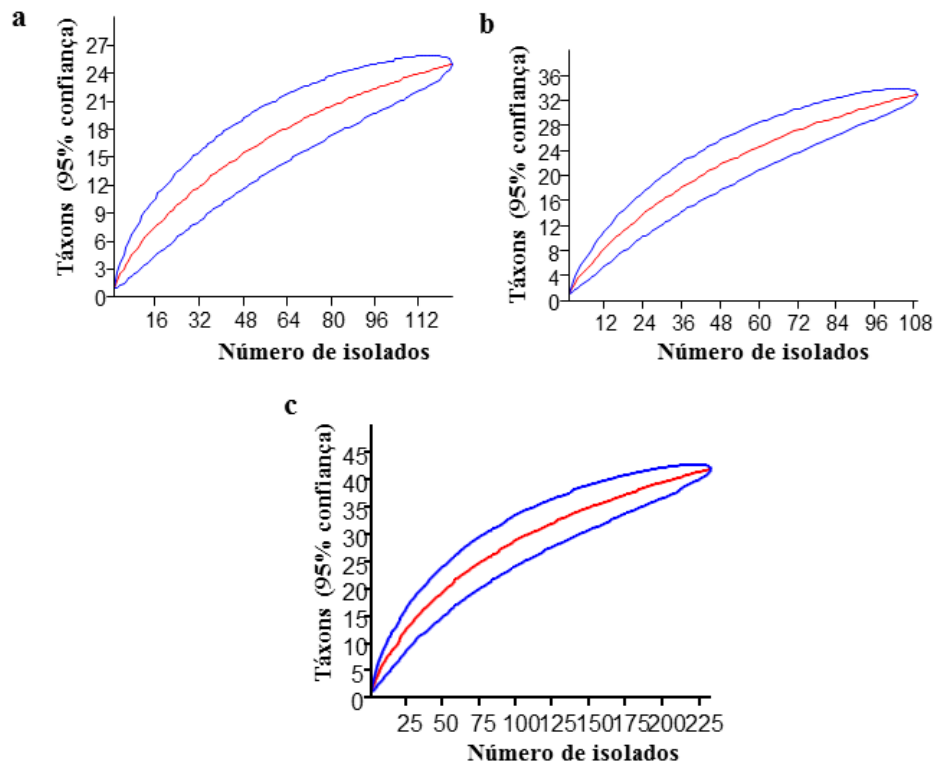


Figura 28. Curva de rarefação de espécies (Índice de Mao-Tau) da comunidade de fungos endofíticos associados à *Equinacea purpurea*. As curvas foram construídas com intervalo de 95% de confiança: (a) amostragem de folhas, (b) amostragem do pedúnculo, (c) amostragem total.

5.2.3 Determinação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia

Os 233 extratos diclorometânicos obtidos do cultivo dos fungos endofíticos foram avaliados pelo método de bioautografia. Destes, 29 extratos (12%) apresentaram atividade antifúngica contra uma ou mais espécies alvo, com halos variando de 4 a 14 mm, e 76 (33%) apresentaram zonas difusas de crescimento contra pelo menos um alvo (característica de extratos fungistáticos). Dos 29 extratos ativos, somente um extrato do fungo EPU21FC (isolado de folha de *E. purpurea*) apresentou atividade seletiva contra *C. fragarie* e inibiu o crescimento fúngico com halo de inibição de 8 mm de diâmetro. Já a espécie *C. gloeosporioides* foi menos sensível entre os demais alvos, considerando que 20 extratos apresentaram atividade antifúngica e nove atividades difusas.

Nenhum dos 41 extratos diclorometânicos produzidos a partir das folhas apresentaram atividade antifúngica na bioautografia. Entretanto, nove (11%) dos 41 extratos produzidos a partir das hastes florais apresentaram atividade frente ao crescimento de pelo menos um dos fungos alvo, com zonas de inibição variando entre 6,5 e 17,5 mm de diâmetro. Cinco extratos de hastes florais apresentaram atividade seletiva, dois frente a *C. gloeosporioides* e três frente a *C. acutatum*. De acordo com rendimento do extrato e atividade antifúngica (halo claro ou não e diâmetro), dentre os que 29 extratos considerados ativos, oito (28%) foram selecionados para análise química (Tabela 16), sendo a primeira etapa realizada a partir da triagem por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H .

Tabela 16. Atividade antifúngica de extratos diclorometânicos dos fungos endofíticos associados à *Equinacea purpurea* pelo método de bioautografia frente espécies *Colletotrichum*.

Táxon	Código do isolado	Tecido/Espécime de isolamento	Inibição do crescimento fúngico (mm) ^a ± DP ^b		
			<i>Colletotrichum fragarie</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	EPU38CA	P/38	9 ± 0,17	10 ± 1,4	8 ± 0,88
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	EPU30CA	P/30	8 ± 1,2	7 ± 0,35	7 ± 1,6
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	EPU8FB	F/8	8 ± 0	7 ± 0	7 ± 0,4
<i>Diaporthe cuppatea</i>	EPU24CA	P/24	6 ± 0	6 ± 0,35	7 ± 1
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	EPU36CA	P/36	8 ± 1,6	4 ± 6	9 ± 5
<i>Fusarium</i> sp.	EPU9CB	P/9	5 ± 0	5 ± 0,9	5 ± 0,5
<i>Nigrospora oryzae</i>	EPU13CA	P/13	8 ± 0,7	10 ± 5	8 ± 0,5
<i>Sordariomycetes</i> sp. 2	EPU40CE	P/40	9 ± 4,9	9 ± 1,6	10 ± 1,6
	Controles	Captan	13 ± 1,7	13 ± 1,5	12 ± 2,5
		Benomil	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		Azoxistrobilurina	zd	22 ± 0	zd
		Ciprodinil	zd	zd	zd

^aMédia das dimensões das zonas de inibição do crescimento fúngico (mm). ^bDP: desvio padrão. F: folha, P: pedúnculo, zd: zona difusa. Concentrações: extratos fúngicos: 160 µg/ponto, captan testado a 1,2 µg/ponto, benomil a 1,16 µg/ponto, azoxistrobilurina a 1,61 µg/ponto, ciprodinil a 0,9 µg/ponto.

5.2.4 Análise química, fracionamento biomonitorado e identificação dos metabólitos bioativos

Os extratos dos fungos, selecionados de acordo com a Tabela 16, foram submetidos à espectroscopia de RMN ^1H a fim de selecionar quais seriam utilizados no fracionamento químico visando a purificação e identificação dos metabólitos responsáveis pela atividade antifúngica. Os espectros de RMN ^1H dos extratos de *Colletotrichum* sp. 4 EPU8FB (Anexo 22), *Fusarium* sp. EPU9CB (Anexo 23), *Nigrospora oryzae* EPU13CA (Anexo 24), *Colletotrichum* sp. 4 EPU30CA (Anexo 25), *Fusarium sporotrichioides* EPU36CA (Anexo 26) e *Sordariomycetes* sp.2 EPU40CE (Anexo 27) exibiram sinais referentes a presença majoritária de ácidos graxos, os quais foram submetidos à análise de Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama (CG-DIC) e confirmada a presença de uma mistura de 16 ácidos graxos (Tabela 17). O ácido palmítico foi o predominante e encontrado em todos os extratos brutos analisados. Este ácido foi também majoritário nos extratos de *Colletotrichum* sp. 4 EPU8FB, *N. oryzae* EPU13CA e *Colletotrichum* sp. 4 EPU30CA. O ácido γ -linolênico foi majoritário nos extratos de *Fusarium* sp. EPU9CB e *F. sporotrichioides* EPU36CA e o ácido linoleico no extrato de *Sordariomycetes* sp. 2 EPU40CE. Uma mistura de 11 ácidos graxos foi identificada somente no extrato produzido a partir de *F. sporotrichioides* EPU36CA, com o ácido palmitoléico em menor porcentagem, e γ -linolênico em maior.

Os extratos de *Diaporthe cuppatea* EPU24CA e *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA exibiram sinais que indicaram a presença de hidrogênios aromáticos referentes à presença de um e dois metabólitos aromáticos, respectivamente, sendo, portanto selecionados para cultivo em larga escala e posterior fracionamento químico biomonitorado. No cultivo em larga escala do isolado *D. cuppatea* EPU24CA, 304 placas de Petri contendo o meio de cultura BDA foram utilizadas, as quais renderam 1,4785 g de extrato bruto diclorometânico. Inicialmente, o extrato foi dissolvido a 1 mg/mL em DCM e submetido a análise em CCD, a fim de selecionar o sistema de solvente da fase móvel para o fracionamento. Dentre todas as misturas testadas como fase móvel (Hexano/Acetato de Etila 5:5, Acetato de Etila/Hexano 8:2, Hexano/Éter 5:5, Hexano/Acetato de Etila 8:2 e Hexano/Éter 2:8), a que apresentou melhor resultado de separação foi Hexano/Éter 5:5.

Tabela 17. Quantificação de ácidos graxos (em porcentagem) em extratos produzidos por fungos endofíticos associados à *Echinacea purpurea*.

Ácidos graxos	Fungos endofíticos					
	<i>Colletotrichum</i> sp. 4 EPU8FB	<i>Fusarium</i> sp. EPU9CB	<i>Nigrospora</i> <i>oryzae</i> EPU13CA	<i>Colletotrichum</i> sp. 4 EPU30CA	<i>Fusarium</i> <i>sporotrichioides</i> EPU36CA	<i>Sordariomycetes</i> sp. 2 EPU40CE
Palmítico (16:0)	^a 44,0	3,6	24,2	47,4	22,1	25,9
Elaídico (18:1n9t)	29,9	-	-	-	-	-
Linoleico (18:2n6c)	26,1	-	-	11,9	-	36,1
Tridecanóico (13:0)	-	1,3	17,6	7,7	4,5	13,6
Oléico (18:1n9c)	-	2,5	6,3	19,5	4,2	16,4
γ-linolênico (18:3n6)	-	91,7	-	-	42,9	-
Araquídico (20:0)	-	0,8	-	-	2,3	-
Capróico (6:0)	-	-	7,9	-	-	-
Caprílico (8:0)	-	-	19,3	-	7,2	-
Cáprico (10:0)	-	-	12,9	-	5,2	-
Láurico (12:0)	-	-	2,2	-	-	-
Miristoléico (14:1)	-	-	5,8	6,1	2,5	4,8
Esteárico (18:0)	-	-	3,7	7,4	-	-
Undecanóico (11:0)	-	-	-	-	3,5	3,2
Mirístico (14:0)	-	-	-	-	3,6	-
Palmitoléico (16:1)	-	-	-	-	1,9	-

^aValor em porcentagem, “ - “: ausência de ácidos graxos.

A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage® Isolera™ One (Biotage, Uppsala, Suécia). Um grama de extrato bruto foi dissolvido em 4 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge correndo a 50 mL/min, com detecção no UV 254 e 360 nm, sendo o gradiente Hexano:Éter dietílico, em gradiente 100:0 a 60:40 volume de 600 mL (12 min) seguido por 60:40 a 0:100 volume de 1600 mL (32 min), finalizando com 0:100 volume de 400 mL (8 min). Após o fracionamento, porções individuais de 22 mL foram coletadas em 122 tubos de ensaio (16 x 150 mm), submetidas à CCD (Hexano/Éter 5:5) e, de acordo com os perfis apresentados, agrupadas em 10 frações [1 (1-17; 5 mg), 2 (18-19; 22,8 mg), 3 (20-24; 299,1 mg), 4 (25-34; 12,2 mg), 5 (35-37 10,2 mg), 6 (38-43; 59,8 mg), 7 (44-45; 15 mg), 8 (46-54; 122,5 mg), 9 (55-83; 26,4 mg), 10 (84-122; 13,6 mg)].

As frações obtidas foram concentradas em rota-evaporador e posteriormente submetidas ao ensaio de bioautografia sendo testadas sob as concentrações de 10 e 100 µg frente aos alvos *C. fragarie*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. No primeiro ensaio realizado, as frações 4, 9 e 10 apresentaram atividade contra pelo menos um microrganismo alvo testado. A fração F4 inibiu o crescimento das três espécies fúngicas com halos de inibição de 5 mm de diâmetro para cada uma. Contudo, no ensaio de confirmação, esta mesma fração não mais apresentou atividade antifúngica frente a nenhum alvo. Posteriormente, foram realizados novos ensaios a fim de comprovar a atividade antifúngica e os resultados foram negativos. Pode-se inferir que tenha ocorrido a perda da atividade 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 na fração, que podem ter sido degradadas ao longo do processo.

A fração 9 apresentou atividade seletiva contra *C. fragarie* a 100 µg e atividade fungistática, devido o aparecimento de halo difuso, contra os demais alvos. A fração 10 apresentou atividade antifúngica frente as três espécies alvos testadas, com halos de inibição de 3 mm de diâmetro contra *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, e 5 mm contra *C. fragarie*. Espectros de RMN ¹H e ¹³C e cromatogramas de CG-EM indicaram a presença predominante de ácidos graxos compondo as frações 9 e 10. Estas frações, juntamente com a F4, foram posteriormente submetidas a análises de CG-DIC sendo confirmada uma mistura de 36 ácidos graxos (Tabela

18). O ácido oléico foi majoritário para a fração 4, ácido pinolênico para a fração 9 e linolelaídico para a fração 10.

Tabela 18. Quantificação de ácidos graxos (porcentagem) em frações obtidas pelo fracionamento do extrato diclorometânico de *Diaporthe cuppatea* EPU24CA.

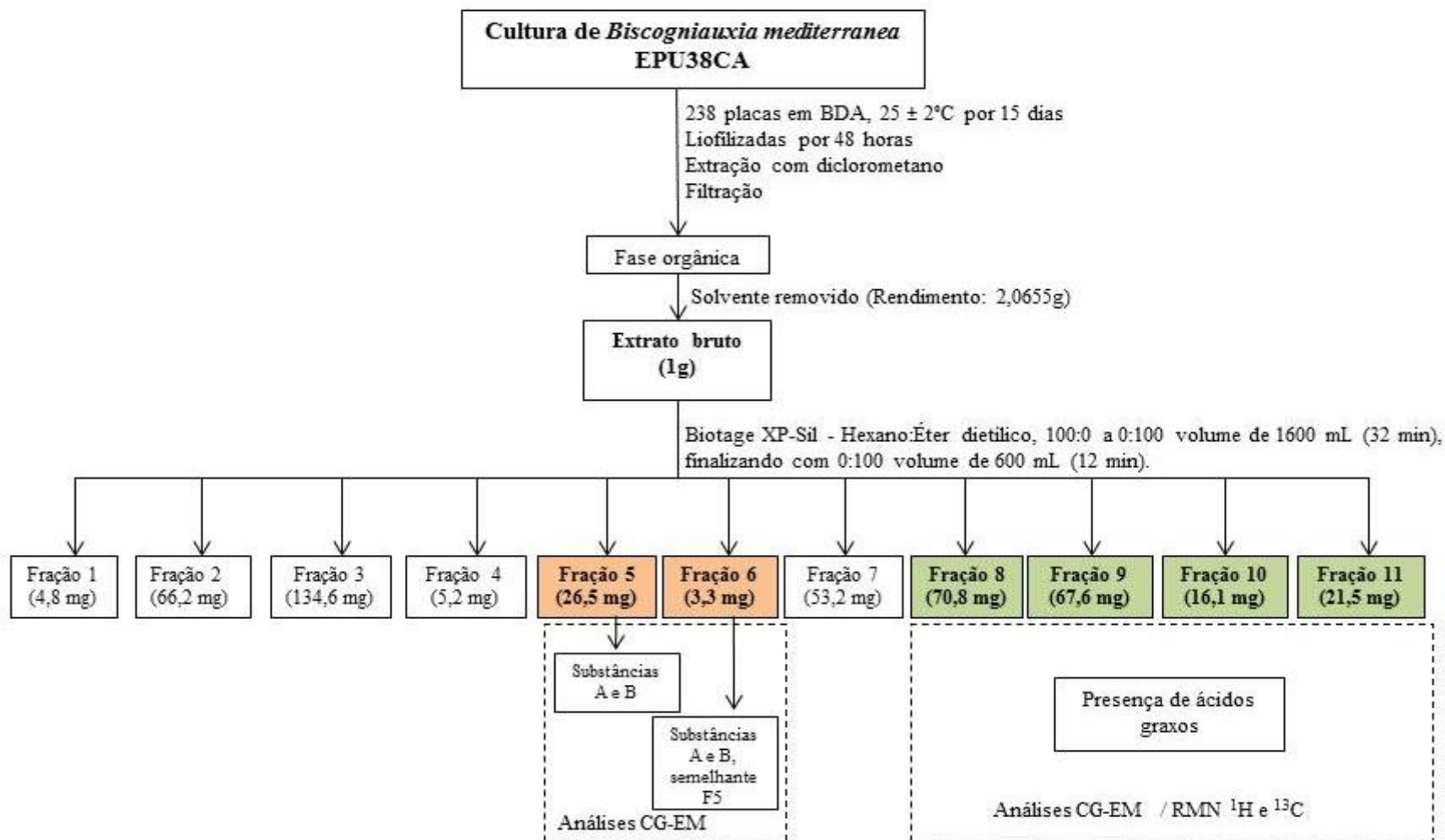
Ácidos graxos	Frações		
	F4	F9	F10
Capróico (6:0)	^a 3,2	-	-
Caprílico (8:0)	-	0,0	0,1
Cáprico (10:0)	7,3	0,1	0,1
Undecanóico (11:0)	-	-	0,3
Láurico (12:0)	-	0,2	0,3
Tridecanóico (13:0)	1,4	0,1	-
Mirístico (14:0)	1,3	0,1	0,6
Miristoléico (14:1)	0,6	0,0	0,1
Pentadecanóico (15:0)	-	-	0,1
Cis-10-pentadecenóico (15:1)	1,5	-	11,3
Palmítico (16:0)	12,8	-	1,5
Palmitoléico (16:1)	-	0,3	0,3
Heptadecanóico (17:0)	-	0,6	0,5
Cis-10-Hepadecenóico (17:1)	-	0,1	-
Estearíco (18:0)	7,5	1,5	2,2
Oléico (18:1n9c)	38,2	10,7	0,3
Elaídico (18:1n9t)	-	0,4	1,3
(LA) Linoléico (18:2n6c)	12,8	-	2,6
Linolelaídico (18:2n6t)	-	0,2	44,3
γ-Linolênico (18:3n6)	-	0,1	1,1
Pinolênico (18:3n6)	-	67,3	-
Estearidônico (18:4n3)	2,9	3,3	1,4
(ALA) α-Linolênico (18:3n3)	-	-	0,7

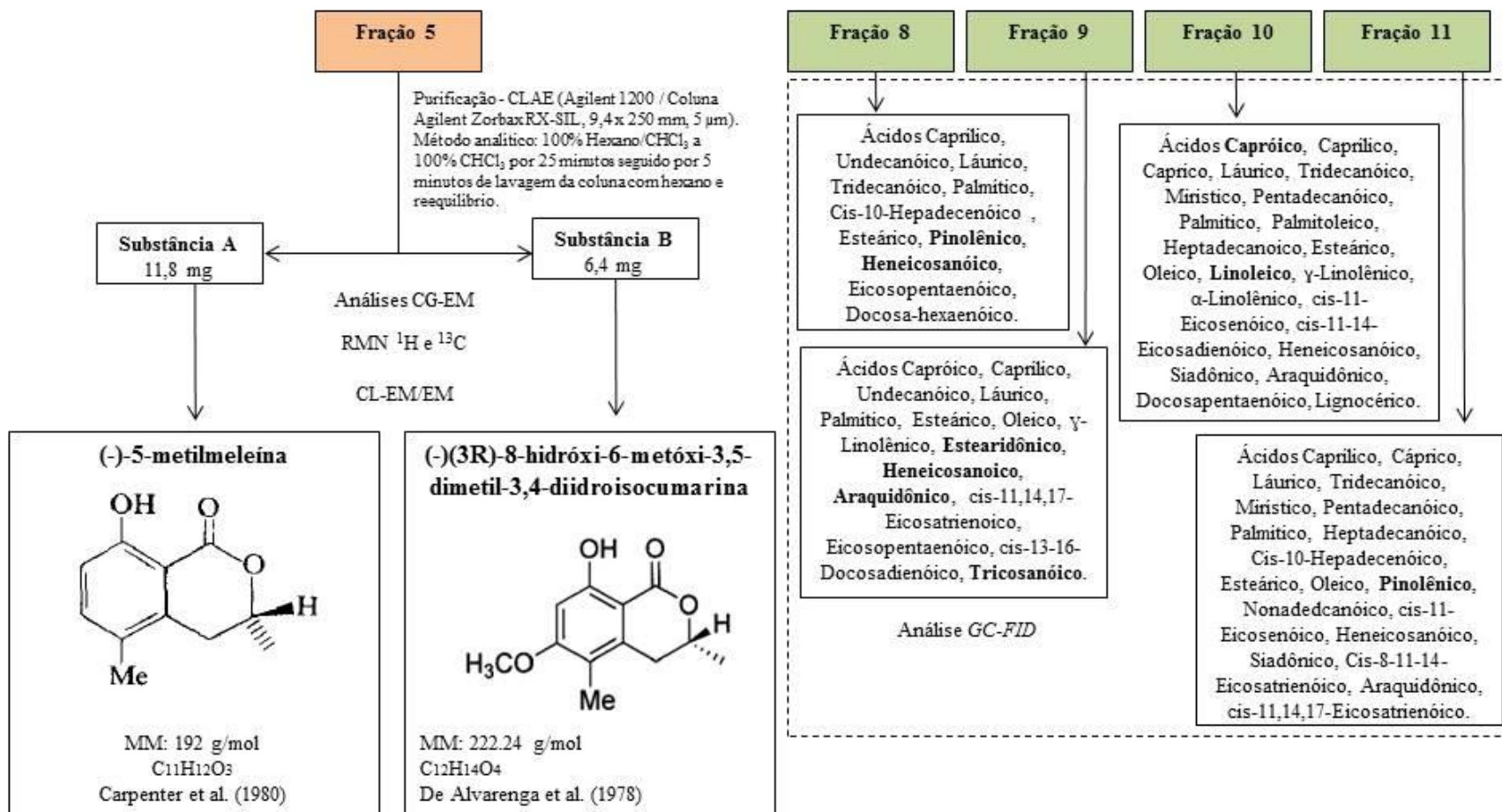
Nonadecanóico (19:0)	-	0,5	0,1
Araquídico (20:0)	-	-	1,2
cis-11-Eicosenóico (20:1)	-	2,9	-
cis-11-14-Eicosadienóico (20:2)	-	-	7,7
Heneicosanóico (21:0)	-	1,7	-
Siadônico (20:3n6)	-	1,1	0,2
Cis-8-11-14-Eicosatrienóico (20:3n6)	-	-	0,2
Araquidônico (20:4n6)	-	1,6	-
(ETE) cis-11,14,17-Eicosatrienóico (20:3n3)	1,9	2,0	0,2
(EPA) Eicosopentaenóico (20:5n3)	8,7	-	0,2
Beénico (22:0)	-	4,9	3,1
Erúcico (22:1n9)	-	-	1,5
(DHA) Docosa-hexaenóico (22:6n3)	-	-	26,9

^aValor em porcentagem, “-“: ausência de ácidos graxos.

O cultivo em larga escala de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA foi realizado em 238 placas de Petri contendo BDA, as quais renderam 2,0655 g de extrato bruto diclorometânico.

- 5 Inicialmente, o extrato foi diluído a 1 mg/mL para realização da CCD com um painel de misturas de solventes como fase móvel: Hexano/Acetato de Etila 5:5, Acetato de Etila/Hexano 8:2, Hexano/Éter 5:5, Hexano/Acetato de Etila 8:2 e Hexano/Éter 2:8. Dentre essas misturas, o melhor resultado foi Hexano/Éter 5:5 (Figura 29).





5 **Figura 29.** Fluxograma de fracionamento químico biomonitorado do extrato diclorometânico de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.

A cromatografia em coluna do extrato foi realizada em sistema automatizado de purificação utilizando o aparelho Biotage®Isolera™ One. Um grama de extrato bruto foi dissolvido em 6 mL de DCM e adsorvido a uma coluna cromatográfica de sílica gel (40-63 µm, 60 Å, 40 x 150 mm). A eluição da coluna foi realizada em um Biotage XP-Sil, 100 g, SNAP cartridge utilizando o fluxo de 50 mL/min, com detecção no UV 254 e 360 nm, tendo como gradiente Hexano:Éter dietílico, com 100:0 a 0:100 volume de 1600 mL (32 min), finalizando com 0:100 volume de 600 mL (12 min).

Após o fracionamento, 102 tubos (16 x 150 mm) foram coletados em porções individuais de 22 mL, sendo cada porção submetida à CCD (Hexano/Éter 5:5). De acordo com os perfis apresentados, as porções foram agrupadas em 11 frações [1 (1-16; 4,8 mg), 2 (17-20; 66,2 mg), 3 (21-24; 134,6 mg), 4 (25-29; 5,2 mg), 5 (30-34; 26,5 mg), 6 (35-37; 3,3 mg), 7 (38-41; 53,2 mg), 8 (42-46; 70,8 mg), 9 (47-50; 67,6 mg), 10 (51-54; 16,1 mg), 11 (55-105; 21,5 mg)], concentradas em rota-evaporador e posteriormente submetidas ao ensaio de bioautografia. As frações 5, 6, 8, 9, 10 e 11 apresentaram atividade antifúngica frente a pelo menos uma espécie alvo testada. Com destaque para a F5 que inibiu o crescimento de todos os alvos a 10 e 100 µg. As frações 9 e 11 apresentaram atividade seletiva contra *C. fragarie* e difusa contra as demais (Tabela 19).

As frações 8 a 11 foram submetidas à CG-EM e os cromatogramas demonstraram a presença de picos característicos de ácidos graxos, dados que foram confirmados a partir dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, os quais exibiram sinais também característicos deste grupo de substâncias. Posteriormente, estas frações foram submetidas à CG-DIC a fim de identificar quais ácidos graxos estavam presentes nas amostras. Uma mistura de 33 ácidos foi identificada, sendo ácido pinolênico majoritário para as frações 8 e 11, heneicosanóico para a fração 9 e capróico para a fração 10 (Tabela 20).

Na análise de CG-EM das frações F5 e F6, os cromatogramas exibiram a presença de duas substâncias semelhantes com pesos moleculares de 192 g/mol (substância A) e 222 g/mol (substância B) (Figura 30). Considerando que a fração 5 apresentou maior rendimento, esta foi selecionada para purificação por meio da CLAE, processo que resultou no isolamento de duas substâncias puras, **F5-A** (11,8 mg) e **F5-B** (6,4 mg), confirmadas a partir de nova análise de CG-EM. As sub-frações obtidas foram submetidas à espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, sendo os

espectros de ^{13}C registrados em experimentos de DEPT de 90 e 135°, experimentos de COSY, além de análises de CL-EM/EM.

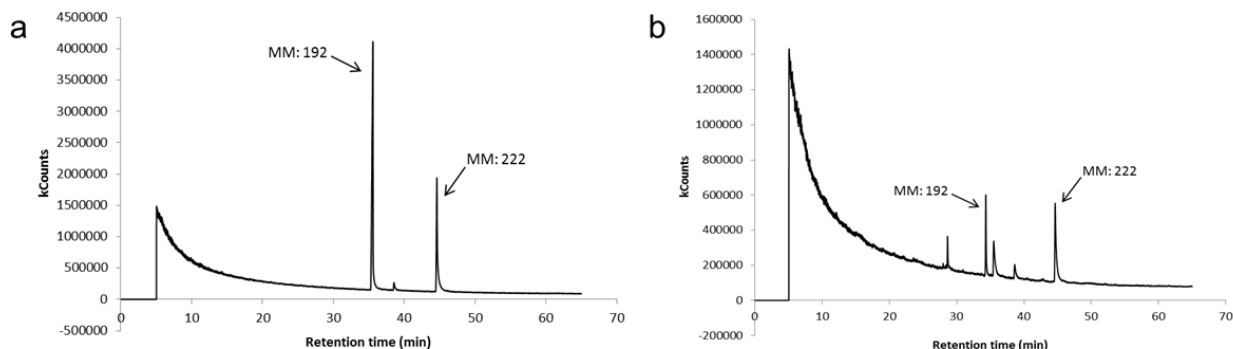


Figura 30. Cromatograma de CG-EM das substâncias A e B. **a.** Fração F5. **b.** Fração F6.

5 Os sinais exibidos pelos espectros da sub-fração F5-A, juntamente com os dados obtidos a partir do CL-EM/EM (m/z 193.09086 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3$, 193.08647; m/z 191.05360 $[\text{M}-\text{H}]^-$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3$, 191.07082), permitiram identificar a molécula ativa como **(-)-5-metilmeleína**. Os dados de RMN ^{13}C obtidos se assemelham com os dados descritos por Carpenter et al. (1980), que confirmam a estrutura descrita por estes autores com a estrutura da **(-)-5-metilmeleína** identificada neste trabalho (Figura 31).

10 Os sinais exibidos pelos espectros da sub-fração F5-B, juntamente com os dados obtidos a partir do CL-EM/EM (m/z 223.07923 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_4$, 223.09703; 245.05059 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Na}_1\text{O}_4$, 245.07898; 467.16819 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{Na}_1\text{O}_8$, 467.16819), permitiram identificar a molécula ativa como **(-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina**. Os dados de RMN ^{13}C obtidos se assemelham com os dados descritos por De Alvarenga et al. (1978), que confirmam a estrutura descrita por estes autores com a estrutura identificada neste trabalho (Figura 31).

Tabela 19. Atividade antifúngica das frações obtidas a partir do extrato bruto de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.

Código do extrato	Inibição do crescimento fúngico (mm) ^a ± DP ^b					
	<i>Colletotrichum fragariae</i>		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		<i>Colletotrichum acutatum</i>	
	10 µg	100 µg	10 µg	100 µg	10 µg	100 µg
EPU38CA/F1	0 ± 0	zd	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EPU38CA/F2	0 ± 0	zd	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EPU38CA/F3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EPU38CA/F4	zd	zd	0 ± 0	zd	0 ± 0	zd
EPU38CA/F5	4 ± 0	9 ± 0,5	2 ± 1,6	6 ± 1,4	3 ± 1,1	5 ± 0,7
EPU38CA/F6	3 ± 0,4	8 ± 0,4	zd	4 ± 2,8	0 ± 0	5 ± 1,2
EPU38CA/F7	0 ± 0	zd	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	zd
EPU38CA/F8	zd	4 ± 0,4	0 ± 0	zd	0 ± 0	3 ± 0
EPU38CA/F9	zd	3 ± 0,7	zd	zd	0 ± 0	zd
EPU38CA/F10	1 ± 2,1	11 ± 2,1	zd	9 ± 6,7	zd	6 ± 2,5
EPU38CA/F11	zd	4 ± 0,5	0 ± 0	zd	0 ± 0	zd
EPU38CA	0 ± 0	2 ± 0,4	0 ± 0	zd	0 ± 0	zd
Captan		21 ± 1,3		16 ± 5,5		15 ± 2,5
Benomil		12 ± 10,3		5 ± 8,7		zd
Azoxistrobilurina		zd		zd		zd
Ciprodinil		zd		zd		zd

^aMédia das dimensões das zonas de inibição do crescimento fúngico (mm). ^bDP: desvio padrão. Concentrações: captan: 1,2 µg/ponto, benomil: 1,16 µg/ponto, azoxistrobilurina: 1,61 µg/ponto, ciprodinil: 0,9 µg/ponto.

Tabela 20. Quantificação de ácidos graxos (porcentagem) em frações obtidas pelo fracionamento do extrato diclorometânico de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.

Ácidos graxos	Frações			
	EPU 38C-A/F8	EPU 38C-A/F9	EPU 38C-A/F10	EPU 38C-A/F11
Capróico (6:0)	-	3,6	37,2	-
Caprílico (8:0)	^a 8,3	5,4	0,1	0,2
Cáprico (10:0)	-	-	0,1	0,2
Undecanóico (11:0)	0,4	0,7	-	-
Láurico (12:0)	1,9	0,9	0,1	0,4
Tridecanóico (13:0)	3,1	-	0,1	0,1
Mirístico (14:0)	-	-	0,2	0,1
Pentadecanóico (15:0)	-	-	0,4	0,2
Palmítico (16:0)	1,2	2,9	6,5	0,1
Palmitoléico (16:1)	-	-	0,9	-
Heptadecanóico (17 :0)	-	-	0,3	0,9
Cis-10-Hepadecenóico (17:1)	4,4	-	-	0,3
Estearíco (18:0)	6,8	2,0	0,4	0,9
Oléico (18:1n9c)	-	8,0	3,3	7,2
(LA)Linoléico (18:2n6c)	-	-	33,6	-
γ -Linolênico (18:3n6)	-	0,5	0,6	-
Pinolênico (18:3n6)	55,5	-	-	75,3
Estearidônico (18:4n3)	-	12,6	-	-
(ALA) α-Linolênico (18:3n3)	-	-	6,1	-
Nonadecanóico (19:0)	-	-	-	0,8
cis-11-Eicosenóico(20:1)	-	-	2,4	0,7
cis-11-14-Eicosadienóico (20:2)	-	-	1,2	-
Heneicosanóico (21:0)	10,8	20,6	1,1	0,5
Siadônico (20:3n6)	-	-	0,6	4,9
Cis-8-11-14-eicosatrienóico (20:3n6)	-	-	-	0,1
Araquidônico (20:4n6)	-	13,9	2,7	6,6
(ETE) cis-11,14,17-eicosatrienóico (20:3n3)	-	8,9	-	0,3
(EPA) Eicosopentaenóico (20:5n3)	1,6	1,1	-	-
Cis-13,16-Docosadienóico (22:2)	-	7,3	-	-
(DPA) Docosapentaenóico (22:5n3)	-	-	1,2	-
(DHA) Docosa-hexaenóico (22:6n3)	5,8	-	-	-
Tricosanóico (23:0)	-	11,5	-	-

Lignocérico (24:0)	-	-	1,0	-
--------------------	---	---	-----	---

^aValor em porcentagem, “-“: ausência de ácidos graxos.

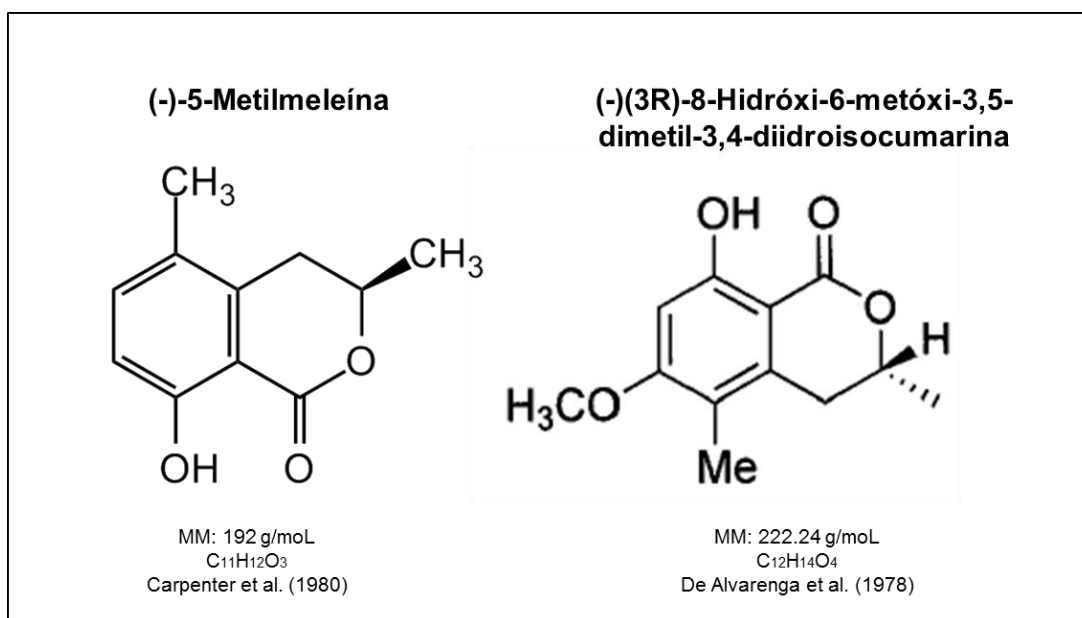


Figura 31. Substâncias isoladas a partir do fracionamento químico biomonitorado do extrato diclorometânico do fungo *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.

5.3 Ensaio de microdiluição em placa com as substâncias isoladas

As substâncias puras obtidas foram submetidas ao ensaio de microdiluição em placa frente às três espécies de *Colletotrichum* utilizadas anteriormente na bioautografia. Também foram incluídos como alvos *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis obscurans* e *P. viticola*. As espécies mais sensíveis foram àquelas pertencentes ao gênero *Phomopsis* (Figuras 32 - 38).

A **citocalasina H**, produzida pelo endofítico *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719, apresentou atividade frente *C. gloeosporioides* em 10 e 15% nas concentrações de 150 e 300 µM, respectivamente, com 48 horas de incubação. Entretanto, a atividade diminuiu após a leitura de 72 horas, passando a estimular o crescimento do alvo em ambas as concentrações. O efeito estimulatório foi observado para as demais espécies de *Colletotrichum* quando testadas as três concentrações já com 48 horas de incubação.

A **citocalasina H** não apresentou atividade contra *F. oxysporum* e *B. cinerea*, uma vez que a substância estimulou o crescimento de ambos os alvos. Após 72 horas, a substância

causou 26, 15 e 13% de estimulação no crescimento *F. oxysporum* nas concentrações de 75, 150 e 300 μM , respectivamente. Para *B. cinerea* os valores obtidos foram de 45, 42 e 6% de estimulação (75, 150 e 300 μM).

5 Frente a *P. obscurans* a substância exibiu aumento da inibição com o aumento da concentração após 144 horas, exibindo valores de 14, 45 e 73% de inibição do crescimento fúngico nas concentrações de 75, 150 e 300 μM . Entretanto as porcentagens de inibição observadas ainda foram menores que os controles utilizados, uma vez que azoxistrobilurina (fármaco controle) inibiu o crescimento fúngico a 52, 94 e 99%, e captan a 46, 99 e 99%, em ordem crescente de concentração (75, 150 e 300 μM). Efeito semelhante foi observado contra
10 *P. viticola*, em que a substância apresentou atividade inibindo o crescimento deste isolado com valores de 28, 35 e 49%.

O ensaio de bioautografia da substância isolada a partir da fração 3, **citocalasina J**, demonstrou zona clara de inibição frente ao crescimento de *C. fragarie*, com halo de 8 mm, mantendo a atividade no ensaio de microdiluição em placa, porém com baixos valores de
15 inibição. Após 48 horas de incubação, a porcentagem de inibição obtida foi 3 e 5%, e, após 72 horas de 2 e 4%, nas concentrações de 150 e 300 μM , respectivamente. Esta mesma substância estimulou o crescimento das demais espécies de *Colletotrichum*, *F. oxysporum* e *B. cinerea* em todos os intervalos de tempo. As espécies de *Phomopsis* foram mais sensíveis, sendo *P. viticola* a mais susceptível. O crescimento deste alvo foi inibido em 23, 34 e 45% (75, 150 e
20 300 μM) após 120 horas. A atividade aumentou para 53 e 58% após 144 horas para as concentrações de 150 e 300 μM . A atividade frente o crescimento de *P. obscurans* foi observada somente nas concentrações maiores, de 150 e 300 μM , com porcentagens de inibição de 6 e 61%, e 3 e 36%, em 120 e 144 horas, respectivamente.

As substâncias também foram submetidas ao ensaio de microdiluição em placa frente
25 aos microrganismos alvos *E.coli* e *S. aureus*, os quais foram susceptíveis ao extrato bruto de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719 (Tabela 7). **Citocalasina H** e **J** não apresentaram atividade frente *S. aureus* e apresentaram fraca atividade antimicrobiana frente *E. coli* a 300 mM com porcentagens de inibição de 14 e 10%, respectivamente.

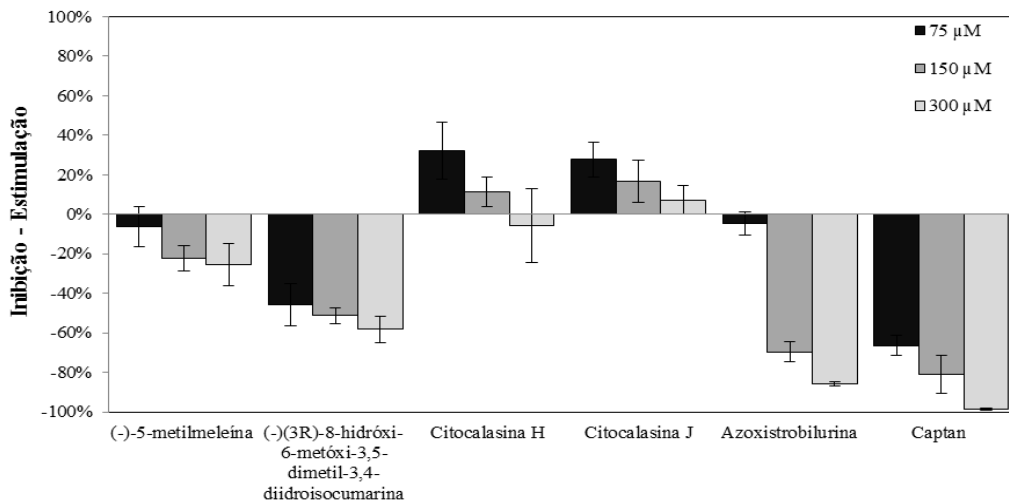
A (-)-**5-metilmeleína**, isolada a partir do extrato bruto de *B. mediterranea* EPU38CA,
30 apresentou atividade frente *B. cinerea* de 6, 22 e 26%, nas concentrações de 75, 150 e 300 μM após 48 horas, respectivamente. Porém, a atividade diminuiu após a leitura de 72 horas,

passando a estimular o crescimento do alvo em todas as concentrações. O contrário foi observado ao avaliar a substância frente ao crescimento de *F. oxysporum*. Após a leitura de 48 horas, **(-)-5-metilmeleína** estimulou o crescimento do alvo em 5, 2 e 3% (75, 150 e 300 µM). Na leitura posterior, de 72 horas, a substância apresentou 3 e 5% de inibição nas maiores concentrações (150 e 300 µM).

A **(-)-5-metilmeleína** não apresentou atividade contra as três espécies de *Colletotrichum* avaliadas, uma vez que a substância estimulou o crescimento destes alvos em todos os intervalos de tempo. Contudo, frente a *P. obscurans* a substância exibiu porcentagem de inibição nas duas leituras realizadas, inibindo o crescimento deste alvo em 27, 40 e 43%, após 120 horas; e 35, 40,5 e 43,5%, após 144 horas (75, 150 e 300 µM, respectivamente). Ao avaliar a substância frente ao crescimento de *P. viticola*, **(-)-5-metilmeleína** exibiu aumento da inibição com o aumento da dose após 144 horas, passando de 11 e 18% a 24 e 36%, nas concentrações de 150 e 300 µM, respectivamente.

Com exceção de *C. gloeosporioides*, **(-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina** apresentou atividade frente a todos os demais microrganismos alvos, em pelo menos uma concentração e intervalo de tempo avaliados. Contra as duas outras espécies de *Colletotrichum* e *F. oxysporum*, a substância apresentou valores de inibição abaixo de 20%. A substância inibiu o crescimento de *B. cinerea* nas três concentrações, porém a atividade diminuiu após 72 horas, exibindo valores de 23, 33 e 38% (75, 150 e 300 µM). As espécies de *Phomopsis* foram as mais sensíveis. Após 144 horas, o crescimento de *P. viticola* foi inibido em 50% na concentração de 300 µM. Frente a *P. obscurans*, o mais susceptível nesta avaliação, a substância apresentou valores de 58, 66 e 76%, após 120 horas, diminuindo na leitura seguinte (144 horas) para 22, 42 e 70% nas três concentrações utilizadas. Nenhuma das substâncias exibiu atividade superior aos valores de inibição obtidos para os controles utilizados, azoxistrobilurina e captan.

% Inibição - Estimulação *Botrytis cinerea* 48 horas



% Inibição - Estimulação *Botrytis cinerea* 72 horas

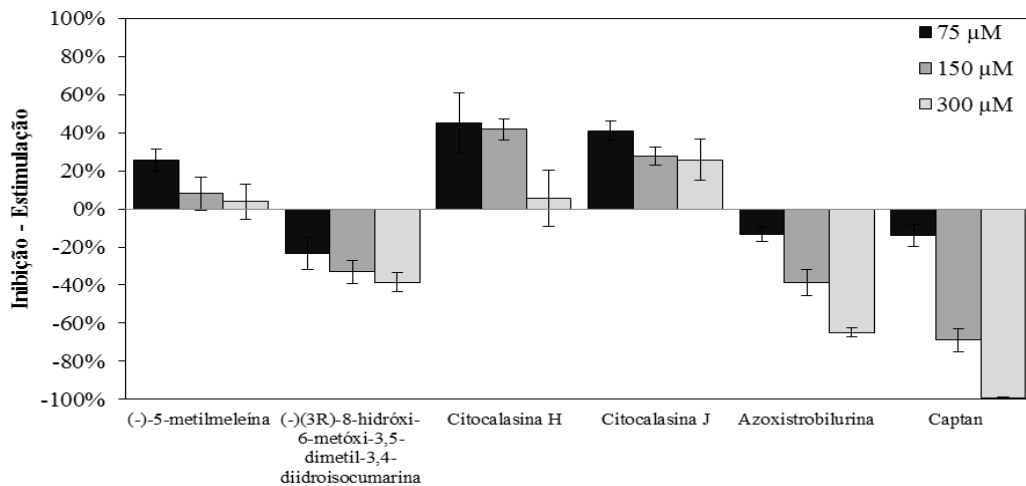
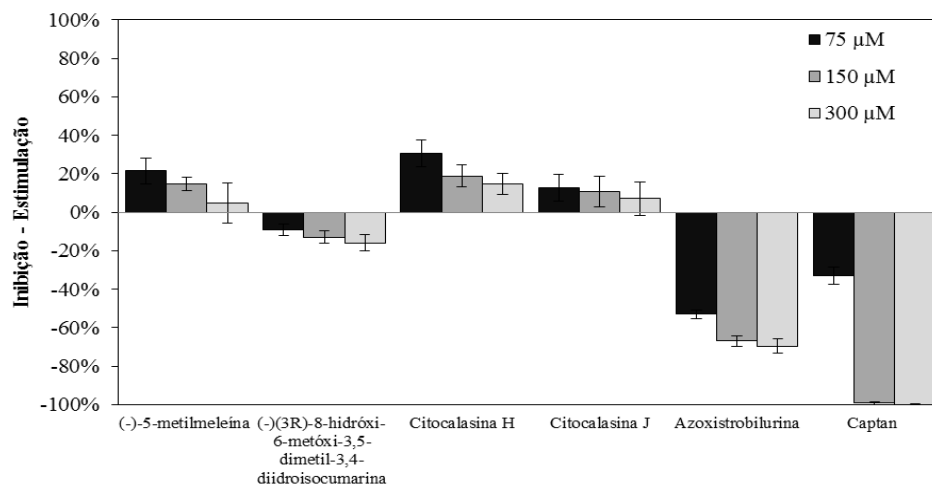


Figura 32. Médias de inibição do crescimento (%) de *Botrytis cinerea* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

% Inibição - Estimulação *Colletotrichum acutatum* 48 horas



% Inibição - Estimulação *Colletotrichum acutatum* 72 horas

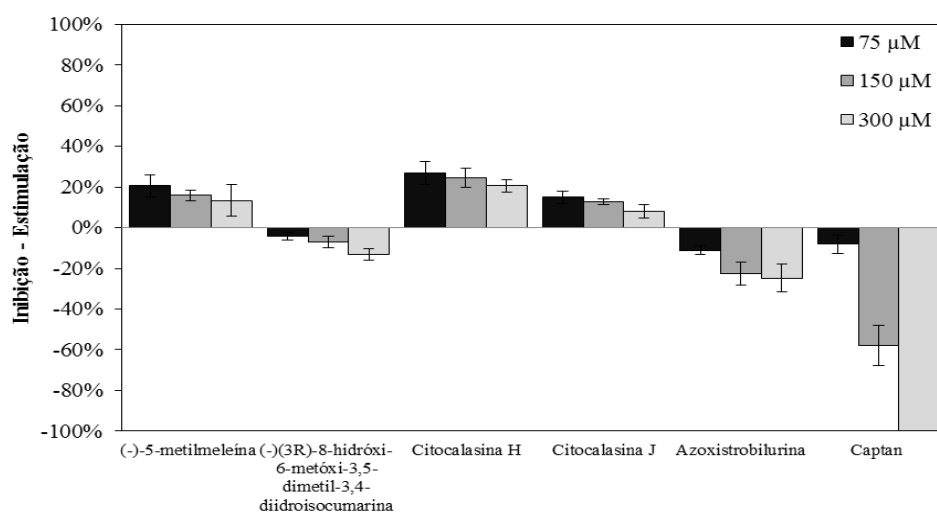


Figura 33. Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum acutatum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM. As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

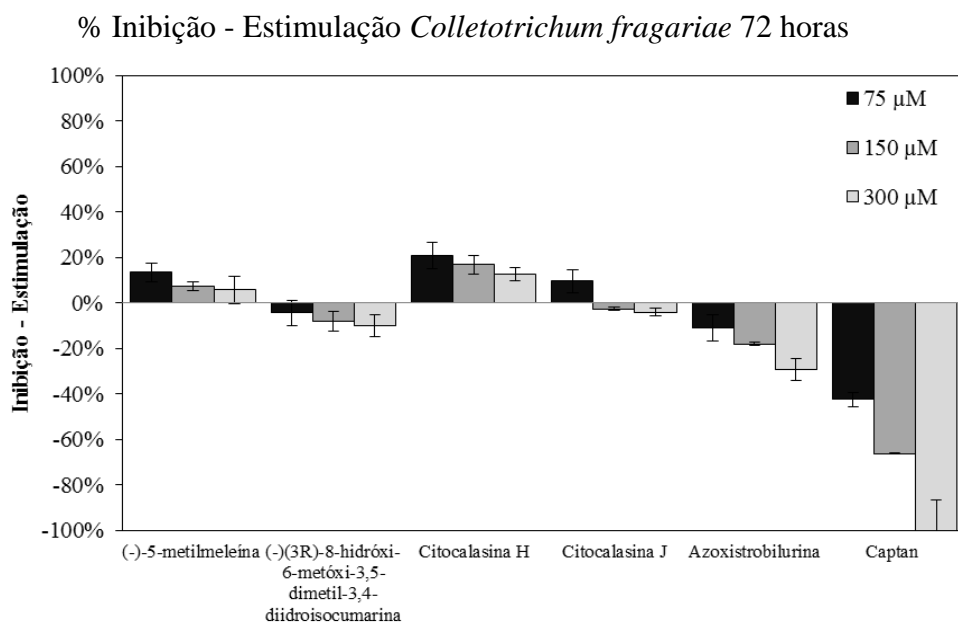
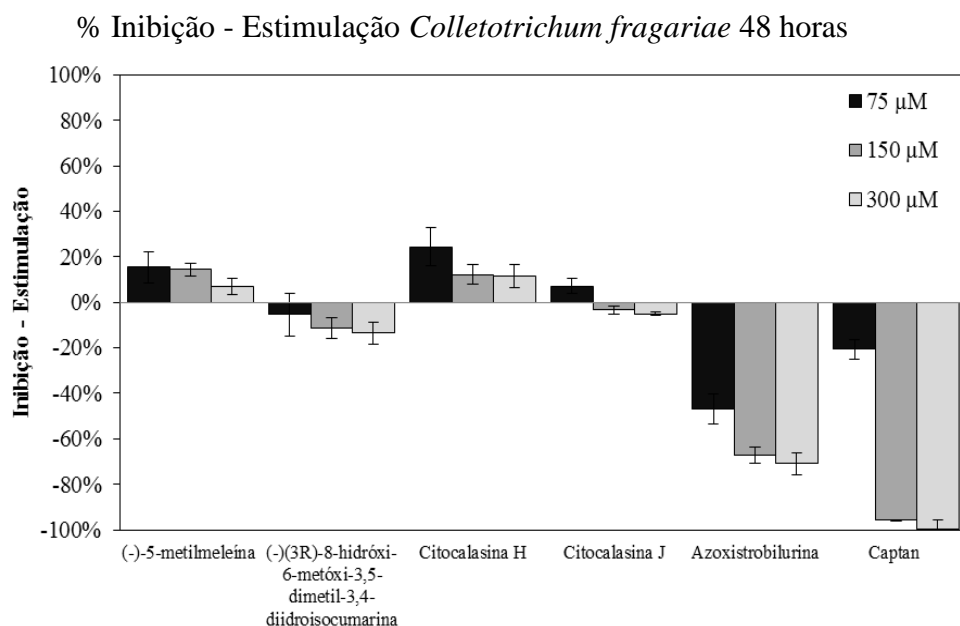
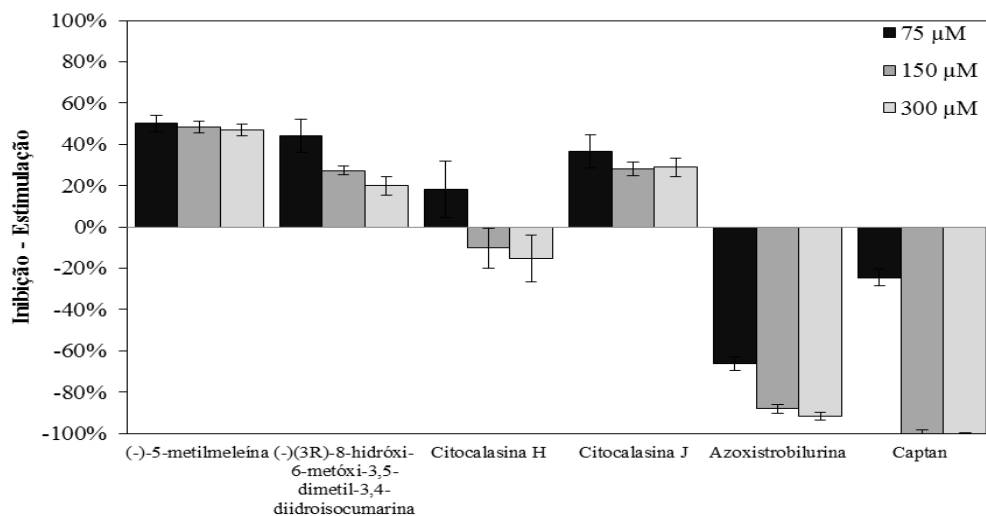


Figura 34. Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum fragariae* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 µM. As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

% Inibição - Estimulação *Colletotrichum gloeosporoides* 48 horas



% Inibição - Estimulação *Colletotrichum gloeosporoides* 72 horas

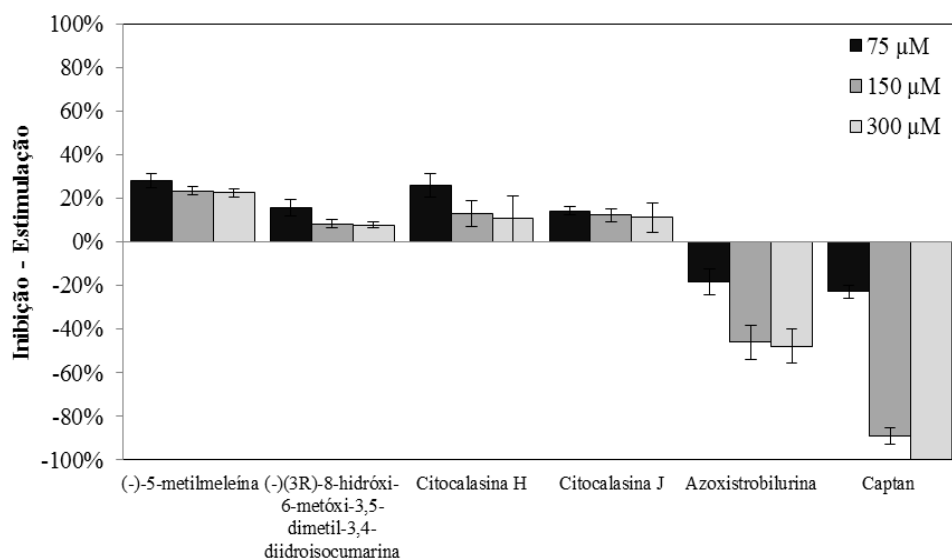
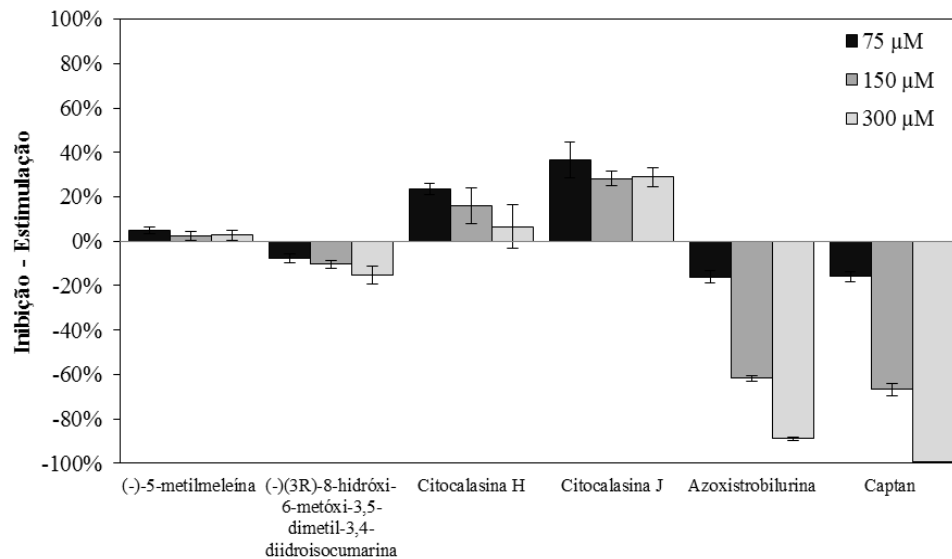


Figura 35. Médias de inibição do crescimento (%) de *Colletotrichum gloeosporoides* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

% Inibição - Estimulação *Fusarium oxysporum* 48 horas



% Inibição - Estimulação *Fusarium oxysporum* 72 horas

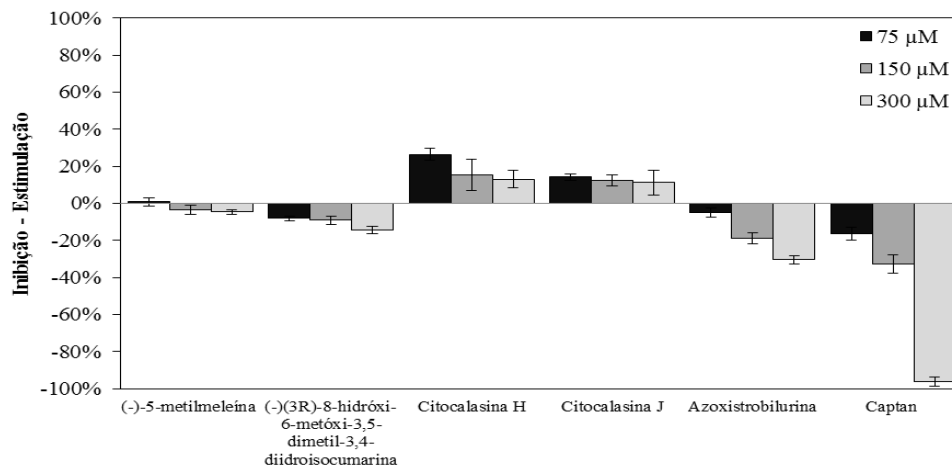
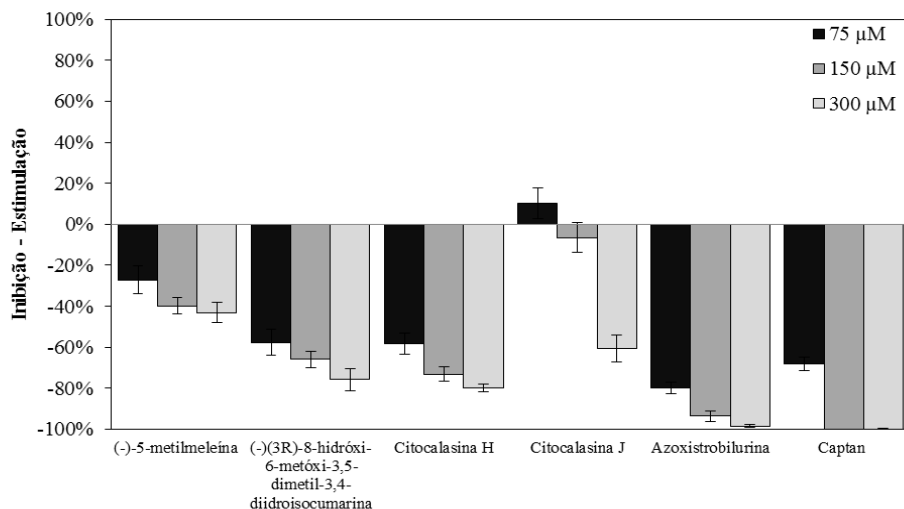


Figura 36. Médias de inibição do crescimento (%) de *Fusarium oxysporum* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 48 e 72 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM . As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

% Inibição - Estimulação *Phomopsis obscurans* 120 horas



% Inibição - Estimulação *Phomopsis obscurans* 144 horas

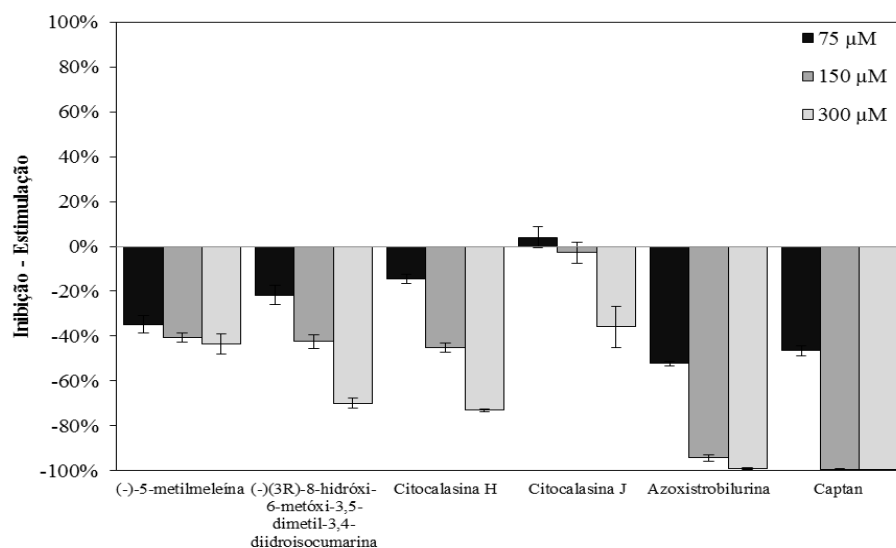
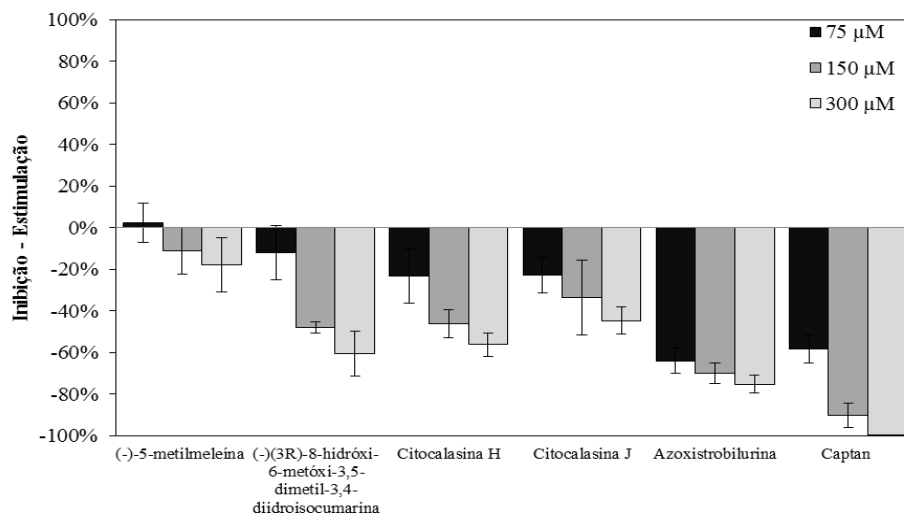


Figura 37. Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis obscurans* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Concentrações dos controles positivo: azoxistrobilurina e captan: 0,3, 3 e 30 μM. As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

% Inibição - Estimulação *Phomopsis viticola* 120 horas



% Inibição - Estimulação *Phomopsis viticola* 144 horas

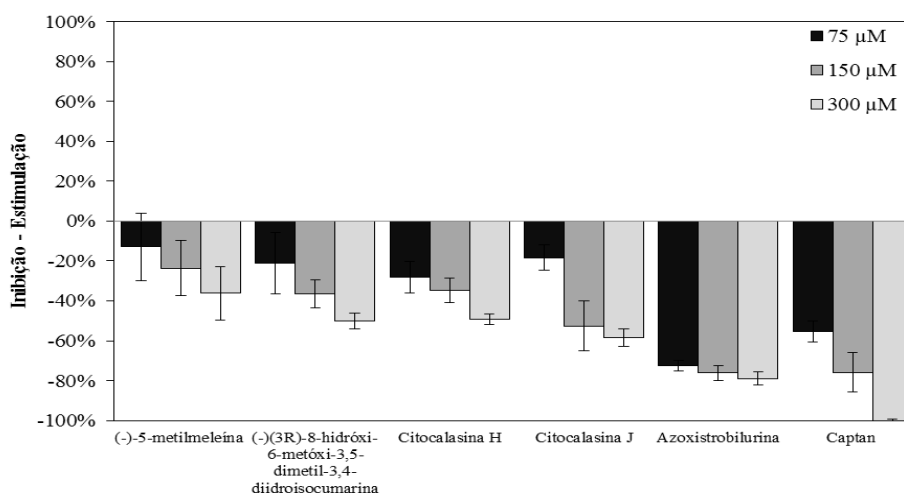


Figura 38. Médias de inibição do crescimento (%) de *Phomopsis viticola* depois de expostos aos metabólitos (-)-5-metilmeleína, (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, citocalasina H e citocalasina J utilizando dose-resposta a 120 e 144 horas, respectivamente. Controles positivo: azoxistrobilurina e captan nas concentrações de 0,3, 3 e 30 μM. As médias de porcentagem de inibição foram realizadas a partir de duas réplicas do experimento.

6 DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii*, *C. pubiflora* e *Echinacea purpurea*

5

A escolha por plantas medicinais para o isolamento de fungos endofíticos é um dos critérios adotados nas pesquisas recentes (GUIMARÃES et al., 2008; ROSA et al., 2010; CARVALHO et al., 2012; ROSA et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; KAUL et al., 2013; QADRI et al., 2014; VIEIRA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015; FERREIRA et al., 2015; HUGHES et al., 2015; PEREIRA et al., 2015). No presente trabalho, ao final do processo de isolamento foram obtidos 901 isolados de fungos endofíticos associados às plantas medicinais *C. langsdorffii* (n= 308), *C. pubiflora* (n= 360) (Brasil) e *E. purpurea* (n= 233) (Estados Unidos da América), o que comprova a eficiência da metodologia utilizada. O processo de desinfestação superficial e inóculo dos fragmentos vegetais representam uma metodologia tradicional para a detecção e quantificação dos fungos endofíticos cultiváveis (TAYLOR et al., 1999; STONE et al., 2000; TAN & ZOU, 2001), bem como a utilização do meio de cultura BDA (SOUZA et al., 2004; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005; MARINHO et al., 2007; ROSA et al., 2010, CARVALHO et al., 2012). Neste estudo, somente dois isolados de levedura foram obtidos de sementes de *C. pubiflora*, os quais foram identificados em uma espécie do gênero *Ermothecium*. Este gênero foi previamente obtido de sementes de mostarda e são conhecidos pela habilidade de produzir riboflavina (GASTMANN et al., 2007). A baixa frequência de leveduras obtida dentro da comunidade de fungos endofíticos, em comparação com os fungos filamentosos, pode ser devido à metodologia escolhida para o isolamento dos fungos. O processo de isolamento utilizado neste estudo é amplamente utilizado para isolamento de fungos filamentosos, uma vez que o plaqueamento dos fragmentos de tecido vegetal possibilita a migração das hifas para o meio de cultura. Porém, as leveduras não são organismos móveis e somente aquelas que estiverem nas bordas das amostras, ou forem capazes de produzir filamentos, entrariam em contato com o meio de cultivo. Além disso, uma vez que os fungos filamentosos crescem no meio de cultura, torna-se difícil isolar as leveduras; desta forma, a diversidade de leveduras endofíticas associadas às plantas estudadas pode ter sido subestimada (PINOTTI, 2010).

Do total de fungos obtidos, 57,8% foram obtidos das folhas das plantas hospedeiras. De acordo com Stone et al. (2004), o tipo de tecido do hospedeiro utilizado é um importante fator que exerce influência na detecção e distribuição de fungos endofíticos. Arnold et al. (2000) examinaram a comunidade de fungos endofíticos associados a folhas de *Heisteria concinna* (Olacaceae) e *Ouratea lucens* (Ochnaceae) em florestas tropicais no Panamá e obtiveram 1.472 isolados fúngicos de 83 folhas, sendo que 100% delas continham fungos endofíticos. García et al. (2012) observaram elevada taxa de colonização de endofíticos em folhas de *Sapindus saponaria*, considerando que 100% dos fragmentos exibiram crescimento fúngico. De acordo com Gamboa et al. (2002), folhas individuais podem abrigar mais de um isolado por 2 mm² de tecido foliar.

Os 901 isolados de fungos filamentosos obtidos foram inicialmente separados em 154 grupos, dos quais 64 associados a *C. langsdorffi*, 40 a *C. pubiflora* e 50 a *E. purpurea*, de acordo com as suas características macromorfológicas das colônias tais como cor (frente e verso), textura da superfície, aspecto da borda, velocidade de crescimento, produção de pigmentos e exsudatos. Os endofíticos são frequentemente agrupados em “morfotipos” com base nas características da colônia e posteriormente identificados utilizando dados de taxonomia molecular a partir do sequenciamento do DNA (ARNOLD, 2008). Após obtenção das sequências de nucleotídeos dos fungos obtidos houve um reagrupamento dos morfotipos, uma vez que pertenciam ao mesmo táxon, resultando no total de 118 táxons identificados, pertencentes ao filo *Ascomycota*. De acordo com Arnold (2007), os fungos endofíticos são representados, principalmente, por espécies de *Ascomycota* em sua maioria incluídos nas classes *Dothideomycetes* e *Sordariomycetes*. Contudo, representantes da classe *Eurotiomycetes*, como *Aspergillus* e *Penicillium*, também podem ser obtidos como endofíticos de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2012). Fungos endofíticos pertencentes aos gêneros: *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Guignardia/Phyllosticta* e *Pestalotiopsis* foram os únicos obtidos em comum das três plantas hospedeiras neste estudo.

A classe *Sordariomycetes* foi a mais abundante no atual trabalho. Como representantes dessa classe, espécies do complexo *Diaporthe/Phomopsis* (teleomorfo/anamorfo) foram obtidas dos tecidos das três plantas estudadas. O complexo inclui espécies que ocorrem como fitopatógenas, endofíticas, sapróbias, patógenos de humanos e outros mamíferos (VAN NIEKERK et al., 2005; SANTOS et al., 2010; IRIART et al., 2011; UDAYANGA et al.,

2011; GOMES et al., 2013). O gênero *Diaporthe*, representado principalmente pela espécie *D.* cf. *phaseolorum*, foi o táxon predominante associado à planta medicinal *Stryphnodendron adstringens* estudada por Carvalho et al. (2012). Resultados semelhantes foram obtidos por
5 Vieira et al. (2012), que também obtiveram *D. phaseolorum* como espécie dominante associada a planta medicinal *Bacharris trimera*. Ferreira et al. (2015), dos 162 isolados associados a planta medicinal amazônica *Carapa guianensis*, obtiveram 62 isolados pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis*.

Gomes et al. (2013), após pesquisa realizada no Mycobank e com acesso em setembro/2012, encontrou mais de 100 espécies compreendidas dentro do gênero *Phomopsis*,
10 enquanto *Diaporthe* continha 860 espécies. Neste trabalho, 262 isolados de fungos endofíticos, sendo 125 associados a *C. langsdorffii* (compreendidos em 15 táxons diferentes do total identificado), 122 associados a *C. pubiflora* (compreendidos em nove diferentes táxons do total identificado) e 15 associados a *E. purpurea* (compreendidos 5 táxons do total
15 identificado) pertencem ao complexo *Diaporthe/Phomopsis*. Algumas das sequências obtidas de *Diaporthe/Phomopsis* podem representar espécies novas dentro deste complexo, porém estudos taxonômicos mais detalhados serão necessários para a correta caracterização destes isolados.

Certas espécies de *Colletotrichum* interagem com diferentes espécies de plantas se manifestando como patógenos sintomáticos ou como endofíticos assintomáticos (ROJAS et
20 al., 2010). Para Damm et al. (2012), mais pesquisas acerca das estratégias de vida e relações parasita-hospedeiros dos fungos pertencentes aos clados de *Colletotrichum* são necessárias, uma vez que como endofíticos este gênero não parece ter uma especificidade de hospedeiro. No atual trabalho, o gênero *Colletotrichum* também foi isolado das três plantas hospedeiras, representando o segundo gênero mais predominante associado à *E. purpurea*, com 63 isolados
25 compreendidos em 11 táxons. *Colletotrichum* já foi relatado como endofítico de diferentes plantas, tais como *Theobroma cacao* (ROJAS et al., 2010), *Stryphnodendron adstringens* (CARVALHO et al., 2012), *Solanum cernuum* (VIEIRA et al., 2012), folhas de *Citrus limon* (DOUANLA-MELI et al., 2013), *Carapa guianensis* (FERREIRA et al., 2015), *Phaseolus vulgaris* (GONZAGA et al., 2015) e *Silene dioica* (YAN et al., 2015).

30 O gênero *Pestalotiopsis* ocorre em diferentes substratos, tanto em plantas vivas como patógenos e endofíticos, quanto como sapróbios na casca e material vegetal em decomposição

(METZ et al., 2000; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011). Nos últimos anos, *Pestalotiopsis* tem recebido cada vez mais atenção, não somente devido o impacto econômico como fitopatógeno, mas também como endofíticos frequentemente obtido de diferentes espécies vegetais, o qual parece incluir várias espécies produtoras de metabólitos secundários bioativos (WANG et al., 2015). Wei et al. (2007) obtiveram 302, 365 e 198 isolados de *Pestalotiopsis*, compreendidos em 18, 16 e quatro espécies, a partir de plantas das famílias *Podocarpaceae*, *Theaceae* e *Taxaceae*, respectivamente. Espécies de *Pestalotiopsis* endofíticas também já foram isoladas de *Azadirachta indica*, *Holarrhena antidysenterica*, *Terminalia arjuna* e *T. chebula* (TEJESVI et al., 2009), *Phoradendron perrottettii* e *Tapirira guianensis* (ABREU et al., 2010), bem como *Pinus wallichiana* (QADRI et al., 2014).

Maharachchikumbura et al. (2014) investigaram 91 isolados de *Pestalotiopsis* depositados no CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (CBS) culture collection e, baseados na combinação de análises moleculares e morfológicas, propuseram a divisão de *Pestalotiopsis* em três novos gêneros: *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. No atual trabalho, cinco isolados de *Neopestalotiopsis*, combinados em dois táxons, foram obtidos: *Neopestalotiopsis cubana* UFMGCB 7226, associado a *C. langsdorffii*; e *Neopestalotiopsis* sp. UFMGCB 7794, associados a *C. pubiflora*. Além dos táxons citados, *Amphisphaeriaceae* sp. UFMGCB 7789, *Sordariomycetes* sp. 1 UFMGCB 7330 e *Sordariomycetes* sp. 2 UFMGCB 7523 apresentaram baixa identidade ou cobertura com sequências de *Neopestalotiopsis* depositadas no GenBank, os quais podem representar possíveis espécies desse novo gênero proposto.

De acordo com Walsh et al. (2010), o gênero *Fusarium* é um dos mais notáveis de fungos. Espécies representativas desse gênero podem ser encontradas em diferentes regiões do mundo e obtidas do solo ou associadas a plantas como fitopatógenas e endofíticas (LESLIE & SUMMERELL, 2006; WALSH et al., 2010; DEMERS et al., 2014; NALINI et al., 2014). Rosa et al. (2012) reportaram o isolamento de *Fusarium* sp., *F. oxysporum* e *F. solani* de *E. purpurea* micropropagadas. No presente estudo, *Fusarium* sp. e *F. sporotrichioides* foram obtidas dos pedúnculos de *E. purpurea*.

A classe *Dothideomycetes* foi a segunda com maior frequência de ocorrência e representada, principalmente, pelo gênero *Alternaria*. *Alternaria* é um gênero ubíquo que inclui representantes sapróbios, endofíticos e patogênicos em associação com uma ampla

variedade de substratos incluindo sementes, plantas, produtos agrícolas, animais, solo e atmosfera (WOUDENBERG et al., 2013). Espécies de *Alternaria* são bem conhecidos como fitopatógenos, mas também comumente obtidos como endofíticos (STROBEL & DAISY, 2003; ARNOLD, 2008; CARVALHO et al., 2012). Dentre os fungos identificados associados a *E. purpurea*, *Alternaria* foi o dominante com 99 isolados compreendidos em seis táxons, sendo *A. alternata* a espécie dominante. JianQiu et al. (2008) também relataram *A. alternata* como espécie dominante isolada a partir de seis plantas medicinais coletadas no Jardim Botânico de Pequim. Doze isolados de *A. daucifolii* foram obtidos de *C. langsdorffii*, destes 11 associados às folhas e apenas um da semente. Hodgson et al. (2014) demonstraram que *A. alternata* foi encontrada dentro de sementes, cotilédones e folhas verdadeiras de *Plantago lanceolata*, *Rumex acetosa* e *Senecio vulgaris*. Estes autores relataram que a consistente ocorrência de *A. alternata* em todas as partes das plantas fornece uma evidência de sua transmissão vertical (via sementes). Os dados do nosso trabalho assemelham-se aos resultados de Hodgson et al. (2014) ao considerar que *A. daucifolii* foi obtida de folha e semente de um mesmo espécime de *C. langsdorffii*.

Além dos dados citados acima, isolados de *Pleosporales* sp. 1 e *Xylariaceae* sp. 1 foram obtidos de sementes e folhas de um mesmo espécime de *C. langsdorffii*, assim como *Diaporthales* sp., *Penicillium* sp. e *Xylariaceae* sp. foram obtidos de sementes e folhas de um mesmo espécime de *C. pubiflora*. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de confirmar o tipo de transmissão destes fungos na planta hospedeira. Alguns autores consideram a transmissão vertical como um exemplo de mutualismo em que o endofítico nunca deixa seu hospedeiro, sendo transmitido verticalmente da planta parental via sementes, enquanto sua presença renderia resistência aos tecidos hospedeiros. Estes fungos são frequentemente referidos como “true endophytes” ou endofíticos verdadeiros (SAIKKONEN et al. 2010; HODGSON et al., 2014).

Dentro de *Dothideomycetes*, *Guignardia* (e seu anamorfo *Phyllosticta*) foi o segundo gênero mais frequente. Setenta e sete fungos foram isolados, todos obtidos das folhas. *Guignardia* já foi relatado como dominante em folhas de *Dendrobium nobile* (*Orchidaceae*) (YUAN et al., 2009), *Garcinia mangostana* e *G. parvifolia* (*Clusiaceae*) (SIN et al., 2010). Carvalho et al. (2012) obtiveram 23 isolados de *Guignardia* cf. *camelliae* e sete de *G. mangiferae* de folhas de *S. adstringens*. Xiong et al. (2014) relataram *Guignardia* como

gênero dominante (36,8%) em folhas de *Huperzia serrata*. Diferentes espécies de *Guignardia* são endofíticos que podem permanecer latentes em seus hospedeiros por períodos prolongados ou desenvolver sintoma de doenças quando seus hospedeiros estão crescendo sob condições ambientais adversas (RODRIGUES et al., 2004).

5 *Eurotiomycetes* foi obtida somente das espécies de copaíba e representada pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, os quais foram isolados em sua maioria associados às sementes. Estes gêneros já foram isolados como endofíticos (TEJESVI et al., 2011; QADRI et al., 2014), sendo *Penicillium* isolado como endofítico de sementes de bambu na China por Shen et al. (2014).

10 Alguns táxons encontrados neste trabalho apresentaram baixa similaridade ou informação inconclusiva quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank sendo identificados em nível de classe, ordem e família. Análises moleculares, filogenéticas e morfológicas complementares serão necessárias para concluir a identificação destes isolados em nível de espécie.

15

6.2 Diversidade dos fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii*, *C. pubiflora* e *Echinacea purpurea*

Do total de 49 táxons associados à *C. langsdorffii*, *Diaporthe* sp. 6 e *Xylariaceae* sp. 1
20 foram os mais abundantes com 13,95 e 10,63%, respectivamente. Dos 27 táxons associados à *C. pubiflora*, *Diaporthe* sp. 5 e *Guignardia* sp. 2 foram os mais abundantes, com 17,28 e 14,23%, respectivamente. E dos 42 táxons associados à *E. purpurea*, *A. alternata* foi o mais abundante com 34,76%. Espécies de *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Trichoderma*, *Alternaria* e *Phomopsis* são comumente encontrados como endofíticos (RODRIGUES &
25 SAMUELS, 1999; SURYANARAYANAN et al., 2002; SCHULZ & BOYLE, 2005; ARNOLD, 2008; RAJAGOPAL et al., 2012). Taylor et al. (1999) obtiveram espécies de *Phomopsis* (anamorfo de *Diaporthe*) como táxon dominante associados com *Trachycarpus fortunei* (*Arecaceae*). Xing et al. (2010) isolaram *Phomopsis* sp. como táxon predominante em raízes de *Sonneratia caseolaris* e *Diaporthe* sp. em caules de *S. hainanensis* (*Lythraceae*) na
30 China. *Xylariaceae* é uma das maiores e mais diversas do filo *Ascomycota* (BITZER et al., 2008) e foi relatada por Vieira (2012) como uma das famílias mais frequentes associadas a

Acanthospermum australe. Já foram isoladas também de *Dendrobium nobile* (Orchidaceae) por Vaz et al. (2009) e *Phoradendron perrottettii* e *Tapirira guianensis* por Abreu et al. (2010).

5 Quinze táxons associados à *C. langsdorffii*, quatro à *C. pubiflora* e 17 à *E. purpurea* apresentaram baixos valores de abundância (0,33 e 0,42%), os quais fazem parte da porção minoritária da comunidade de fungos endofíticos associados às suas respectivas plantas hospedeiras. Carvalho et al. (2012) sugerem que estes singletos podem incluir espécies raras, endêmicas, espécies novas ou produtoras de substâncias bioativas e capazes de exercer um importante papel ecológico nas plantas hospedeiras.

10 As comunidades de fungos endofíticos variaram de acordo com a parte da planta utilizada para o isolamento. Segundo Yuan et al. (2009) existem diferenças na composição de espécies e frequência de endofíticos obtidos de diferentes tipos de tecidos de um hospedeiro. A maior abundância ocorreu nas folhas, entretanto alguns gêneros foram obtidos exclusivamente apenas de uma das partes vegetais amostradas. Quando associado a *C.*
15 *langsdorffii*, o gênero *Cladosporium* foi isolado somente das sementes, porém associado a *E. purpurea* foi obtido de folhas e pedúnculos. Rosa et al. (2012) relataram o isolamento de *C. cladosporioides* de folhas de *E. purpurea* micropropagadas. Collado et al. (2001) mostraram que a frequência de colonização do endofítico *Biscogniauxia mediterranea* foi mais alta na casca do caule, menor nas folhas e intermediária nos galhos de *Quercus ilex* (Fagaceae).
20 Associado a *E. purpurea*, obtivemos dois isolados dessa espécie do pedúnculo.

 Uma das formas pela qual se pode mensurar diversidade de uma comunidade se dá pelo uso de índices de diversidade (MELO, 2008). O emprego de índices proporciona vantagens como combinar diferentes componentes de diversidade, expressar matematicamente os resultados, além da independência em relação ao esforço amostral. Os valores do índice de
25 Fisher α demonstraram que a comunidade endofítica com maior diversidade foi aquela associada a *C. langsdorffii* (Fisher α = 16,6), seguida por *E. purpurea* (Fisher α = 14,96) e *C. pubiflora* (Fisher α = 7,23), demonstrando uma distribuição das abundâncias mais uniforme em *C. langsdorffii*. A diferença entre estes valores pode ser devido a diferentes fatores, tais como as espécies de plantas hospedeiras e localização geográfica, condições climáticas dos
30 locais de coleta, parte da planta utilizada, tamanho dos fragmentos inoculados, idade dos órgãos coletados, entre outros fatores (VIEIRA, 2012).

O cálculo de dominância (índice de Simpson) exibiu valores próximos para as comunidades endofíticas associadas às três plantas hospedeiras (*C. langsdorffii* = 0,94, *C. pubiflora* = 0,90, *E. purpurea* = 0,84). Tais valores sugerem que poucos táxons foram dominantes e se distribuíram de forma homogênea dentro da comunidade.

5 Nenhuma das curvas de rarefação atingiram uma assíntota, indicando que as diversidades totais (riqueza e composição de espécies) podem não ter sido obtidas, logo sugere-se que o aumento da amostragem poderia levar a obtenção de outros táxons de fungos associados às plantas bioativas estudadas neste trabalho.

10 **6.3 Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Copaifera langsdorffii*, *C. pubiflora* e *Echinacea purpurea***

A produção de metabólitos secundários por plantas medicinais, bem como por seus fungos endofíticos, forneceu diferentes fármacos como importantes opções terapêuticas para
15 várias doenças (GLIENKE et al., 2012). Neste trabalho, as espécies medicinais de *C. langsdorffii*, *C. pubiflora* e *E. purpurea* foram selecionadas para o isolamento de fungos endofíticos e detecção de seus metabólitos bioativos. Novecentos e um extratos foram produzidos pelo cultivo dos fungos por meio de fermentação no estado sólido. Esta técnica de fermentação geralmente fornece um ambiente favorável à produção de diferentes metabólitos
20 pelos microrganismos, principalmente aos fungos filamentosos, devido ao crescimento de suas hifas, que tem a capacidade de crescer não apenas sobre a superfície das partículas do substrato, mas também de penetrar no meio de cultura (PANDEY, 2008), a qual vem sendo utilizada em diferentes estudos (CARVALHO et al., 2012, SANTIAGO et al., 2012; VIEIRA et al., 2012, VIEIRA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015, FERREIRA et al., 2015;
25 GONÇALVES et al., 2015).

Os extratos etanólicos produzidos a partir do cultivo dos fungos endofíticos associados às copaíbas foram submetidos ao ensaio de triagem da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em placa. Destes, somente 1,6% apresentou percentual $\geq 70\%$ contra pelo menos um dos microrganismos alvos. Uma vez considerados ativos, os fungos foram
30 recultivados para produção em larga escala de extratos diclorometânicos. Os extratos dos recultivos, bem como aqueles produzidos a partir dos fungos endofíticos associados à *E.*

pupurea, foram submetidos à avaliação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia. A bioautografia é um método sensível para a detecção de metabólitos antimicrobianos, mesmo em pequenas quantidades (PATIL et al., 2013). Setenta e sete extratos, 76 associados a *E. purpurea* e um associado a *C. langsdorffii*, geraram zonas difusas para o crescimento de pelo menos um dos fitopatógenos alvos. Zonas difusas de inibição são regiões na placa de bioautografia onde o crescimento fúngico é visualmente reduzido e intercalado com pouco micélio e estruturas reprodutivas, fenômeno característico dos compostos fungistáticos (CANTREL et al., 2008; WEDGE et al., 2009; ROSA et al., 2012).

Alternaria daucifolii UFMGCB 7491, obtido da folha de *C. langsdorffii*, apresentou atividade contra *E. coli* com CIM de 125 (extrato etanólico) e 7,8 µg/mL (extrato diclorometânico), respectivamente, pelo método de microdiluição em placa e gerou zonas claras de inibição do crescimento de *C. fragarie* no ensaio de bioautografia. Espécies de *Alternaria*, além de serem comumente isolados como endofíticos (STROBEL & DAISY, 2003; ARNOLD, 2008), são potentes produtores de metabólitos bioativos. Cota et al. (2008) e Johann et al. (2012) verificaram que a altenusina, substância produzida pelo endofítico *Alternaria* sp. UFMGCB 55, isolado de *Trixis vaughieri* apresentou potente atividade inibitória sobre atividade da enzima TryR de *Trypanosoma cruzi* com um valor de CI₅₀ de 4,3 mM, bem como atividade antifúngica frente *P. brasiliensis* com valores de CIM de 1,9 a 31,2 µg/mL. Vieira et al. (2014) também observaram que o extrato de *Alternaria* sp. UFMGCB 4425 foi ativo frente *Paracoccidoides brasiliensis* com CIM de 31,2 µg/mL.

Hypoxyylon sp. UFMGCB 7613 foi seletivamente ativo frente ao crescimento de *Candida albicans*. Tomscheck et al. (2010) reportaram a produção de substâncias voláteis por *Hypoxyylon* sp., endofítico de *Persea indica*, com atividade antifúngica frente *Phytophthora* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus fumigatus* e *Cercospora beticola*.

Isolados pertencentes ao complexo *Diaporthe/Phomopsis*, caracterizado como grande produtor de substâncias bioativas, apresentaram atividade em ambos os ensaios realizados neste trabalho. Os extratos exibiram atividade antibacteriana com valores de CIM entre 62,5 e >250 µg/mL (extratos etanólicos), entre 15,6 e 62,5 µg/mL (extratos diclorometânicos) e halos com diâmetros de inibição de 5 a 19 mm. Carvalho et al. (2012) observaram que o extrato etanólico de *Phomopsis* sp. UFMGCB 5061, endofítico de *S. adstringens*, exibiu atividade antifúngica seletiva com CIM de 250 µg/mL frente a levedura patogênica *C. albicans*. Vieira

et al. (2014) também relataram atividade antifúngica de *D. phaseolorum* UFMGCB 4475, *Diaporthe* sp. 1 UFMGCB 4453, *Diaporthe* sp. 2 UFMGCB 4580 e *Phomopsis* sp. UFMGCB 4451, endofíticos de *Baccharis trimera*, frente *Cryptococcus neoformans* com valores de CIM >500, 500, >500 e 125 µg/mL, respectivamente, e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) com CIM de 62,5; 62,5; 125 e 62,5 µg/mL, respectivamente.

Colletotrichum sp. 4 (isolados EPU8FB e EPU30CA), *Fusarium sporotrichioides* (EPU36CA), *Fusarium* sp. (EPU9CB), *Nigrospora oryzae* (EPU13CA) e *Sordariomycetes* sp. 2 (EPU40CE) exibiram atividade antifúngica frente *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. Rosa et al. (2012) observaram atividade semelhante por parte dos endofíticos *Nigrospora sphaerica* UM106, *Fusarium oxysporum* UM 110 e 121, ambos obtidos de *Smallanthus sonchifolius*. *Nigrospora sphaerica* apresentou halos de inibição de 3 e 4 mm (80 e 160 µg/ponto) frente ao crescimento de *C. gloeosporioides*; os dois isolados de *F. oxysporum* apresentaram zonas de inibição frente a todos os alvos com halos variando de 3 a 6,5 mm (80 µg/ponto) e 3,75 a 8,75 mm (160 µg/ponto).

Quarenta e dois ácidos graxos foram identificados dos extratos e frações ativas dos fungos endofíticos das plantas medicinais estudadas neste trabalho. Ácidos graxos são ácidos orgânicos caracterizados pela presença de um grupo carboxila (-COOH) em uma extremidade e um grupo metil (-CH₃) na outra extremidade (POHL et al., 2011). Os ácidos graxos são ubíquos na natureza (LIU et al., 2008) e podem variar em tamanho (cadeia de quatro até 28 carbonos) e grau de saturação podendo ser saturados (cadeia de carbono com ligações simples) ou insaturados (cadeia de carbono com duplas ligações) (SADO-KAMDEM et al., 2009). Diversos estudos demonstram o uso de ácidos graxos como agentes antimicrobianos, em especial como antifúngicos (KABARA et al., 1972; AVIS & BÉLANGER, 2001; AGORAMOORTHY et al., 2007, CANTRELL et al., 2008, CARBALLEIRA, 2008; LIU et al., 2008; SADO-KAMDEM et al., 2009; ROSA et al., 2013), os quais podem atuar de diferentes maneiras, sendo a membrana plasmática o alvo mais importante (POHL et al., 2011). Os ácidos graxos antifúngicos naturalmente se inserem na bicamada lipídica das membranas de fungos e fisicamente a perturbam, resultando no aumento da sua fluidez, o que conseqüentemente causa uma desorganização generalizada da membrana celular levando a alterações de conformacionais das proteínas de membrana, o extravasamento de componentes

intracelulares, desordem citoplasmática e, eventualmente, a desintegração da célula (AVIS & BÉLANGER, 2001).

A utilização de ácidos graxos como agentes antifúngicos pode oferecer algumas vantagens como o uso combinado a substâncias antifúngicas que são propensas a resistência dos patógenos e que tenham ação na membrana, já que o sinergismo pode proporcionar o uso prolongado; além de poderem ser usados como ingredientes ativos nas preparações de uso tópico no tratamento de dermatomicoses, por exemplo (POHL et al., 2011). A identificação e/ou isolamento dessas substâncias pode ser realizada a partir de fungos endofíticos, como demonstrado por Sukrutha et al. (2012) ao observarem a produção dos ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico, linoléico, α -linoléico e araquidônico por fungos endofíticos isolados de diversas plantas como: *Portulaca oleracea*, *Helianthus annuus*, *Eucalyptus globules*, *Cymbopogon flexuosus*, *Cicer arietinum*, *Vigna unguiculata*, *Arachis hypogaea*, *Ricinus communis*, *Plectranthus amboinicus* e *Glycine max*. Rosa et al. (2013) também relataram uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados produzidos pelo fungo endofítico *Coniochaeta ligniaria* (capróico, caprílico, láurico, mirístico, pentadecanóico, pentadecenóico, palmítico, palmitoléico, heptadecanóico, esteárico, oleico e linoléico) e por sua planta hospedeira *Smallanthus sonchifolius* (capróico, caprílico, cis-11-eicosenóico, beénico, cis-10-pentadecenóico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico, α -linolênico e eicosopentaenóico).

No presente trabalho, o ácido palmítico, um ácido graxo saturado, foi identificado como majoritário no extrato das folhas de *C. langsdorffii* CL14F, *Colletotrichum* sp. 4 EPU8FB, *N. oryzae* EPU13CA, *Colletotrichum* sp. 4 EPU30CA, os quais exibiram atividade antifúngica. O ácido palmítico apresentou efeito inibitório significativo em estudo conduzido por Liu et al. (2008), ao reduzir o crescimento dos fitopatógenos *Alternaria solani*, *Colletotrichum lagenarium*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em 42, 52, 40, e 36%, respectivamente, na concentração de 3,900 $\mu\text{mol/L}$. O ácido palmítico é antifúngico frente *A. niger*, *A. terreus* e *Emericella nidulans* (ALTIERI et al., 2007).

O ácido linoléico, ácido graxo insaturado, já foi descrito como antifúngico frente a *A. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *C. albicans*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* e *Crinipellis perniciosus*

(KABARA et al., 1972, WALTERS et al., 2004, LIU et al., 2008). No presente trabalho, o ácido linoléico foi identificado em elevada porcentagem nos extratos de *A. daucifolii* UFMGCB 7491, *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927, *Sordariomycetes* sp. 2 EPU40CE e fração 10 do extrato de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA. Além disso, o ácido oléico foi majoritário no extrato de *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927 e na fração F4 de *D. cuppatea* EPU24CA e apresentou atividade antifúngica contra *C. pernicioso* e *P. ultimum* (WALTERS et al., 2004) e frente espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* (HUGHES et al., 2015). Embora os resultados obtidos nesse trabalho acerca dos ácidos graxos e mesmo com todos os relatos de atividade antifúngica frente fungos fitopatogênicos, a utilização dos mesmos como fungicidas para controlar doenças em plantas pode não ser efetiva, mas representam menos risco ambiental, são biodegradáveis e exibem um alto grau de especificidade (POHL et al., 2011).

Após o fracionamento do extrato de *Diaporthe cuppatea* EPU24CA, 10 frações foram obtidas, porém aquela considerada ativa inicialmente, não mais apresentou atividade no curso do trabalho. 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. Esse fato pode também estar relacionado com a perda da atividade dos extratos dos fungos *Hypoxylon* sp. UFMGCB 7613, *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7653 e de alguns extratos vegetais, como pode ser observado por meio dos resultados da determinação da CIM.

O fracionamento do extrato diclorometânico de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719 ocasionou a identificação de duas substâncias denominadas citocalasina H e citocalasina J. Como endofíticos dominantes, espécies de *Diaporthe* têm sido objeto de intensa investigação química por vários grupos de pesquisa (ABREU et al., 2012), uma vez que espécies de *Diaporthe* são conhecidas por ser uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos com diversas estruturas químicas, tais como citocalasinas, fomopsicalasina, xantonas, phomosina, ácido convolvulânico, isocoumarinas e micotoxina (fomopsina A) (WELLS et al., 1976; KROHN et al., 1995; HORN et al., 1995; RUKACHAISIRIKUL et al., 2008; HUSSAIN et al., 2009). As citocalasinas são um grupo de metabólitos secundários fúngicos pertencente aos terpenos e estruturalmente formadas por um anel isoindolona, altamente substituído, com um

grupo benzil na posição 3 e fundido com um anel macrocíclico de 11 a 14 membros (WAGENAAR et al., 2000; CHAPLA et al., 2014). Existem relatos de isolamento das citocalasinas a partir de diferentes táxons de fungos, incluindo espécies de *Ascochyta* sp., *Aspergillus* sp., *Endothia* sp., *Chalara* sp., *Helminthosporium* sp., *Hypoxyton* sp., *Phoma* sp.,
5 *Phomopsis* sp., *Rhinocladiella* sp., *Turbercularia* sp., *Xylaria* sp., dentre outros (WELLS et al., 1976; IZAWA et al., 1989; CAPASSO et al., 1991; WAGENAAR et al., 2000; TAO et al., 2007; XU et al., 2009; SILVA et al., 2010; CHAPLA et al., 2012; ZHAN et al. 2013; CHAPLA et al., 2014). Oito isolados do gênero *Diaporthe* obtidos de *C. pubiflora* apresentaram sinais de RMN ¹H semelhantes ao espectro do extrato selecionado para
10 fracionamento, o que indica a frequente produção de citocalasinas a partir de espécies de *Diaporthe*.

As citocalasinas exibem um amplo espectro de atividades, tais como antibiótica, antitumoral, inibidor de proteases do vírus HIV, atividade fitotóxica, além de serem extensivamente utilizadas em sondas biológicas (substâncias utilizadas em ensaios
15 biológicos), porém sua aplicação terapêutica é limitada devido a sua toxicidade (WAGENAAR et al., 2000; CHAPLA et al., 2012). As citocalasinas H e J foram submetidas ao ensaio de microdiluição em placa e apresentaram ausência de atividade antimicrobiana frente *B. cinerea*, *C. acutatum* e *F. oxysporum*, bem como baixa atividade contra *C. fragarie*, *C. gloeosporioides* e moderada atividade frente ao crescimento de *P. obscurans* e *P. viticola*.
20 Sete substâncias, dentre elas citocalasinas H e J, foram obtidas do extrato do fungo endofítico *Phomopsis* sp. Cs-c2 isolado de folhas adultas de *Senna spectabilis* por Chapla et al. (2014). Estes autores relataram que em testes de bioautografia direta a citocalasina H foi ativa contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* a 10 e 25 µg/ponto (nistatina foi utilizada como controle a 1 µg/ponto). A fomopsicalasina, produzida pelo fungo *Phomopsis* MF6031, isolado
25 da superfície esterilizada de ramos de *Salix gracilostyla* var. *melanostachys*, apresentou atividade antimicrobiana em ensaios de disco difusão na concentração de 4 µg/disco ao exibir zonas de 12 mm de diâmetro frente *B. subtilis*, 11 mm para *Salmonella gallinarum*, 8 mm frente *S. aureus* e *C. tropicalis* (HORN et al., 1995). Silva et al. (2010) isolaram seis citocalasinas, cinco conhecidas (19,20-epoxicitocalasina D, C, N, Q, e R) e uma nova
30 (citocalasina 1) a partir do extrato produzido com acetato de etila (AcOEt) do fungo endofítico *Xylaria* sp. associado a *Piper aduncum*. As substâncias isoladas foram avaliadas quanto à

atividade antifúngica frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* utilizando o método da autobiografia direta. Somente a 19,20-epoxicitocalasina Q foi ativa com uma fraca atividade na concentração de 100 mg/mL quando comparada com o fármaco controle nistatina (1 mg/mL).

5 Do extrato diclorometânico de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA foram isoladas duas substâncias: a (-)-5-metilmeleína e (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, ambas diidroisocumarinas. *Biscogniauxia mediterranea* é uma espécie que infecta representantes de carvalho do gênero *Quercus* sp. e também foi isolado como endofítico em “fase latente” (HAWKSWORTH 1972; BIOCCA & MOTTA 1995; EVIDENTE et al., 2005; LUCHI et al., 2005).

A (-)-5-metilmeleína contém um grupo hidroxil fenólico e foi primeiramente isolada do extrato do fungo fitopatogênico *Fusicoccum amygdali* por Ballio et al. (1966). Posteriormente, esta substância foi descrita como metabólito secundário de espécies fúngicas endofíticas e fitopatogênicas como: *Hypoxyton jecorinum*, *H. rubiginosum*, *H. agrillaceum*, *H. rutilum*, *H. confluens*, *H. mammatum*, *H. illitum*, *H. chestersii*, *H. serpens*, *H. truncatum*, *H. stigium*, *H. grenadense*, *H. atropunctatum*, *H. mediterraneum*, *H. tinctor*, *H. microplacum*, *Numularia discreta*, *N. broomiana*, *N. dennisii* (ANDERSON et al., 1983), *Valsal ceratosperma* (OKUNO et al., 1986), *Idriella bambusae* (KROHN et al., 1997), *Phomopsis* sp. (KROHN et al., 1997; LIN et al., 2011), *Cytospora eucalypticola* (KOKUBUN et al., 2003), *Biscogniauxia numularia* (AMAND et al., 2012), *Paraconiothyrium variabile* (COMBÈS et al., 2012) e *B. mediterranea* (EVIDENTE et al., 2005; SILVA-HUGHES et al., 2015). A (-)-5-metilmeleína é amplamente conhecida devido sua atividade fitotóxica, a qual foi relatada por Okuno et al. (1986) ao demonstrarem que a substância causou escurecimento em tecidos de brotos de maçã a uma concentração de 100 ppm e inibição do crescimento de mudas de alface a 500 ppm. No presente trabalho, a (-)-5-metilmeleína teve sua atividade antimicrobiana avaliada frente fungos fitopatogênicos por meio de ensaio de microdiluição em placa, a qual foi fraca (<50% de inibição) frente espécies de *Phomopsis*. Baixa ou nenhuma atividade antimicrobiana foi comprovada por Krohn et al. (1997) ao avaliaram a (-)-5-metilmeleína frente as bactérias *E. coli* e *B. megaterium* e contra os fungos *Ustilago violacea*, *Mycotypha microspora* e *Eurotium repens* em testes de difusão em ágar. Uma moderada atividade antifúngica foi descrita por Kokubun et al. (2003) para a (-)-5-metilmeleína, uma

vez que a substância apresentou MIC de 100 µg/mL contra *Aspergillus niger* e *Cladosporium herbarum*, 200 µg/mL frente *Bacillus subtilis* e >400 µg/mL frente *Pseudomonas syringae* em testes de microdiuição em placa. Hughes et al. (2015) reportaram fraca atividade antifúngica da (-)-5-metilmeleína frente *B. cinerea*, *C. fragariae* e *F. oxysporum* (concentração de 300 µM) e moderada atividade da substância frente *P. viticola* e *P. obscurans*, com inibição de 50 e 63%, respectivamente, em ensaio de microdiluição em caldo.

A (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina foi um pouco mais ativa que a (-)-5-metilmeleína, uma vez que a substância exibiu atividade antifúngica a 300 µM frente *B. cinerea* (38% de inibição depois de 48 horas de incubação), *P. viticola* (50% depois de 144 horas) e *P. obscurans* (70% depois de 144 horas). Embora a atividade tenha sido moderada, este relato é de grande importância ao considerar que não foram encontrados trabalhos que descrevessem a atividade antifúngica desta substância. As isocoumarinas são importantes por possuir diferentes atividades biológicas, dentre elas a fitotoxicidade (KOKUBUN et al., 2003).

15

7 CONCLUSÃO

- 5 - As plantas bioativas *Copaifera langsdorffii*, *C. pubiflora* e *Echinacea purpurea* representam reservatórios de ricas e diversas comunidades de fungos endofíticos, dentre as quais possíveis novas espécies ao considerar que alguns táxons encontrados apresentaram baixa similaridade e/ou informação inconclusiva quando comparados com sequências de espécies tipo ou referência depositadas no banco de dados GenBank, e que a maioria dos táxons encontrados dentro do complexo *Diaporthe/Phomopsis* foram identificados somente em nível de gênero.
- 10 - Considerando a fraca e moderada atividade antifúngica apresentada pelas substâncias isoladas do extrato diclorometânico de *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA, (-)-5-metilmeleína e (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-dimetil-3,4-diidroisocumarina, respectivamente, supõe-se que ambas possam atuar em sinergismo, e, portanto, juntas serem as responsáveis pela bioatividade inicialmente observada no extrato e
- 15 consequentemente na fração ativa;
- Os efeitos antifúngicos observados nos extratos e frações selecionados, assim como a produção de citocalasinas H e J, (-)-5-metilmeleína e (-)(3R)-8-hidróxi-6-metóxi-3,5-
- 20 dimetil-3,4-diidroisocumarina, substâncias conhecidas e com alguma atividade biológica, reforçam a hipótese que a simbiose entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras pode produzir substâncias com atividade frente fitopatógenos e predadores das plantas em geral;
- 25 - Por fim, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as plantas medicinais, brasileiras e americana, podem representar um rico reservatório de fungos endofíticos produtores de metabólitos bioativos, reforçando a necessidade de mais estudos nessa área taxonômicos e de bioprospecção de plantas bioativas/medicinais presentes em ecossistemas naturais

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 5 ABBASI, B.H.; SAXENA, P.K.; MURCH, S.J.; LIU, C.Z. *Echinacea* biotechnology: Challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 43, p.481-492, 2007.
- 10 ABREU, L.M.; ALMEIDA, A.R.; SALGADO, M.; PFENNING, L.H. Fungal endophytes associated with the mistletoe *Phoradendron perrottettii* and its host tree *Tapirira guianensis*. **Mycological Progress**, 2010.
- 15 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.
- 20 AGORAMOORTHY, G.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V.; HSU, M. J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38(4), p. 739-742, 2007.
- 25 ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. 4ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALMEIDA, S.P. PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa – CPAC, p.129-135, 1998.
- ALTIERI, C.; CARDILLO, D.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M. Inhibition of *Aspergillus* spp. And *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1206-12, 2007.

AMAND, S.; LANGENFELD, A.; BLOND, A.; DUPONT, J.; NAY, B.; PRADO, S. Guaiane sesquiterpenes from *Biscogniauxia nummularia* featuring potent antigerminative activity. **Journal of natural products**, v. 75(4), p. 798-801, 2012.

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

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

15

ARNOLD, A.E. 2008. Hidden within our botanical richness, a treasure trove of fungal endophytes. **The Plant Press**, v. 32, p. 13-15, 2008.

ARNOLD, E. A. Endophytic fungi: Hidden components of tropical community ecology.

20 In: CARSON, W. P., SCHNITZER, S. A. (eds.) **Tropical forest community ecology**. Blackwell Publishing Ltd. p. 254-271, 2008.

ASSUMPÇÃO, L.C.; LACAVA, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 44, p. 503-510, 2009.

25

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

30

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

5 AZEVEDO, K.S. **Indução e análise bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003

BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker
10 Inc.,2000.

BALLIO, A.; BARCELLONA, S.; SANTURBANO, B. 5-Methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin. **Tetrahedron Letters**, v. 7(31), p. 3723-3726, 1966.

15 BARRETT, B. Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review. **Phytomedicine**, v. 10, p. 66-86, 2003.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. A personal View. **The journal of antibiotics**, v. 58, p. 1-26, 2005.

20

BIOCCA, M.; MOTTA, E. Aspects of latency of *Hypoxylon mediterraneum* in declining Turkey oaks (*Quercus cerris*). **Petria**, v. 5, p. 171-176, 1995.

25 BITZER, J.; LÆSSØE, T.; FOURNIER, J.; KUMMER, V.; DECOCK, C.; TICHY, H. V.; PIEPENBRING, M.; PERSON, D.; STADLER, M. Affinities of *Phylacia* and the daldinoid *Xylariaceae*, inferred from chemotypes of cultures and ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, v. 112(2), p. 251-270, 2008.

30 BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J.; NA, Z. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In:

WATLING, R.; FRANKLAND, J.C.; AINSWORTH, A.M; ISSAC, S.; ROBINSON, C.H. (ed.) **Tropical Mycology: Micromycetes**, vol. 2. CABI Publishing, New York, p.165-194, 2002. Apud: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, n.4, p.491-502, 2010.

5

BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? **American Journal of Botany**. V. 98(3), p. 426–438, 2011.

10 BRIZUELA, M.A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 69-74, 1998.

CARROL, G. Forest endophytic: pattern and process. **Canadian Journal of Botanic**, v. 73, p. 1316-1324, 1995.

15

CALVO, A.M.; WILSON, R.A.; BOK, J.W.; KELLER, N.P.; Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Reviews**, v. 66, p. 447-459, 2002.

20 CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. T.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2(12), 2008.

25 CANTRELL, C. L.; CASE, B. P.; MENA, E. E.; KNIFFIN, T. M.; DUKE, S. O.; WEDGE, D. E. Isolation and identification of antifungal fatty acids from the basidiomycete *Gomphus floccosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56(13), p. 5062-5068, 2008.

CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; RANDAZZO, G. Analysis of Cytochalasins in Culture of *Ascochyta* spp. And in Infected Plants by High Performance Liquid and Thin Layer Chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 87-92, 1991.

- 5 CARBALLEIRA, N. M. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. **Progress in Lipid Research**, v. 47(1), p. 50-61, 2008.

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

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
15 associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, p. 95-107, 2012.

CARVALHO, C. R.; VIEIRA, M. L. A.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; PIMENTA, R. S.; SALES JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.;
20 ROMANHA, A. J.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. **Natural Product Research**, 2015.

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

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5(3), p. 421-437, 2012.

30

- CHAPLA, V. M.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; ZANARDI, L. M.; LOPES, M. N.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; FONSECA, L. M.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis* sp., an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19(5), p. 6597-6608, 2014.
- 5
- CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.C.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8 (2), 2006.
- 10
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). Wayne, Pennsylvania-USA, 2002.
- 15
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – NCCLS document M7-A6; 6 ed. Wayne, Pennsylvania- USA, 2003.
- 20
- 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.
- 25
- COMBÈS, A.; NDOYE, I.; BANCE, C.; BRUZAUD, J.; DJEDIAT, C.; DUPONT, J.; NAY, B.; PRADO, S. Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. **PloS one**, v. 7(10), 2012.

COSTA, P.; TONINI, H.; KAMINSKI, P.E.; TURCATEL, R.; SCHWENGBER, L.A.M. Estrutura de uma população de *Copaifera pubiflora* Benth. em área de floresta de transição em Roraima. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, 2007.

5 COTA, B. B.; ROSA, L. H.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. T.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; & ZANI, C. L. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285(2), p. 177-182, 2008.

10 COLWELL, R. K.; MAO, C.X.; CHANG, J. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. **Ecology**, v. 85, p. 2717–2727, 2004.

DAMM, U.; FOURIE, P.H.; CROUS, P.W. *Coniochaeta* (*Lecythophora*), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees.

15 **Persoonia**, v. 24, p. 60-80, 2010.

DE ALVARENGA, M.A.; BRAZ FO, R.; GOTTLIEB, O.R.; DIAST, J.O. de P.; MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, G.C.; MAGALHÃES, M.T.; MAIA, J.G.S.; MARQUES, R.; MARSAIOLIS, A.J.; MESQUITA, A.A.L.;
20 MORAES, A.A.; OLIVEIRA, A.B.; OLIVEIRA, G.G.; PEDREIRA, G.; PEREIRA, S.A.; PINHO, S.L.V.; SANT'ANA, A.E.G.; SANTOS, C.C. Dihydroisocoumarins and Phthalide from wood samples infested by fungi. **Phytochemistry**, v. 17, p. 511-516, 1978.

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

DEMERS, J. E.; GUGINO, B. K.; DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M. Highly diverse endophytic and soil *Fusarium oxysporum* populations associated with field-grown tomato plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81(1), p. 81-90, 2015.

30

- DOUANLA-MELI, C.; LANGER, E.; MOUAFO, F. T. Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus limon. **Fungal Ecology**, v. 6(3), p. 212-222, 2013.
- 5 EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; MADDAU, L.; FRANCESCHINI, A.; MARRAS, F.; Biscopyran, a Phytotoxic Hexasubstituted Pyranopyran Produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a Fungus Pathogen of Cork Oak. **Journal of Natural Products**, v.68, p. 568-571, 2005.
- 10 FERRARA, M.A. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. **Revista Fitos**, v.2, p.73-79, 2006.
- FERREIRA, M. C.; VIEIRA, M. D. L. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; GIL, L. H. V. G.; CARVALHO, A. G. O.;
- 15 ZILLIG, J. E.; VITAL, M. J. S.; ROSA, C. A.; Rosa, L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36-44, 2015.
- 20 FLAGEL, L.E., RAPP, R.A., GROVER, C.E., WIDRLECHNER, M.P., HAWKINS, J., GRAFENBERG, J.L., ÁLVAREZ, I., CHUNG, G.Y., AND WENDEL, J.F. Phylogenetic, morphological, and chemotaxonomic incongruence in the North American endemic genus *Echinacea*. **American Journal of Botany**, v. 95, p. 756–765, 2008.
- 25 FREDLUND, E.; GIDLUND, A.; OLSEN, M.; BORJESSON, T.; SPLIID, N.H.H.; SIMONSSON, M. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. **Journal of Microbiological Methods**, 2008

GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter?. **Mycopathologia**, v. 156(1), p. 41-45, 2003.

5 GARCÍA, A.; RHODEN, S. A.; RUBIN FILHO, C. J.; 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. **Biological Research**, v. 45(2), p. 139-148, 2012.

10 GASTMANN, S.; DÜNKLER, A.; WALTHER, A.; KLEIN, K.; WENDLAND, J. A molecular toolbox for manipulating *Eremothecium coryli*. **Microbiological Research**, v. 162(4), p. 299-307, 2007.

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

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**, 1995.

20 GLIENKE, C.; TONIAL, F.; GOMES-FIGUEIREDO, J.; SAVI, D.; VICENTE, V. A.; SALES MAIA, B. H. L. N.; POSSIEDE, Y. M. Antimicrobial Activity of Endophytes from Brazilian Medicinal Plants, In: BOBBARALA, V. (ed.) **Antimicrobial Agents**, Available from: <http://www.intechopen.com/books/antimicrobial-agents/antimicrobial-activity-of-endophytes-from-brazilian-medicinal-plants>, 2012.

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

- GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, 2012.
- 5 GONZAGA, L.L.; COSTA, L.E.O.; SANTOS, T.T.; ARAÚJO, E.F.; QUEIRO, M.V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118(2), p. 485–496, 2015.
- 10 GREENFIELD, J.; DAVIS, J.M. Medicinal herb production guide: purple coneflower [*Echinacea purpurea* (L.) Moench]. **North Carolina Consortium of Natural Medicines and Public Health**, 2004.
- 15 GUERIN, P. Sur la presence d' un champignon dans l'ivraie. **J. Botanique**. 12, 230-238, 1898.
- 20 GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 134-144, 2008.
- 25 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, 2005.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-142, 2008.

HALLMANN, J.; BERG, G.; SCHULZ, B. Isolation procedures for endophytic microorganisms. In: SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (ed.) **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer Heidelberg, p. 299-319, 2006.

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

HAWKSWORTH, D. L. **Description of Pathogenic Fungi and Bacteria**.
10 Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1972

HODGSON, S.; CATES, C.; HODGSON, J.; MORLEY, N. J.; SUTTON, B. C.; GANGE, A. C.; Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. **Ecology and Evolution**, v. 4(8), p. 1199-1208, 2014.

15

HORN, W. S.; SIMMONDS, M. S. J.; SCHWARTZ, R. E.; BLANEY, W. M. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 51(14), p. 3969-3978, 1995.

20 HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTÁN, T.; KROHN, K. New Bioactive 2, 3-Epoxy-cyclohexenes and Isocoumarins from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus Azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, 2009.

25 HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v.33, p.163-173, 2008.

IRIART, X.; BINOIS, R.; FIOR, A.; BLANCHET, D.; BERRY, A.; CASSAING, S.; AMAZAN, E.; PAPOT, E.; CARME, B.; AZNAR, C.; COUPPIÉ, P. Eumycetoma
30 caused by *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*): a case report and a mini-review

of *Diaporthe/Phomopsis* spp. invasive infections in humans." **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17(10), p. 1492-1494, 2011.

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

10 JIANQIU, S.; LIANGDONG, G.; WEI, Z.; WENXIANG, P.; DEFU, C. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Science in China Series C: Life Sciences**, v.51, p.751-759, 2008.

15 JOHANN, S.; ROSA, L.H.; ROSA, C.A.; PEREZ, P.; CISALPINO, P.S.; ZANI, C.L.; COTA, B.B. Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2012.

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

KABARA, J.J.; SWIECZKOWSKI, D. M.; CONLEY, A.J.; TRUANT, J.P. Fatty acids and derivatives as antimicrobials agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2 (1), p. 23–28, 1972.

25 KAUL, S.; AHMED, M.; ZARGAR, K.; SHARMA, P.; DHAR, M. K. Prospecting endophytic fungal assemblage of *Digitalis lanata* Ehrh.(foxglove) as a novel source of digoxin: a cardiac glycoside. **Biotech**, v. 3(4), p. 335-340, 2013.

30 KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the Fungi**, 10th edn. CAB International, Wallingford, 2008.

KOBAYASCHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (ed.) **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, p. 199-236, 2000.

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

- KROHN, K.; MICHEL, A.; RÖMER, E.; FLÖRKE, U.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; WRAY, V. Biologically Active Metabolites from Fungi 6¹⁾; Phomosines A-C Three New Biaryl Ethers from *Phomopsis* sp. **Natural Product Letters**, v. 6(4), p. 309-314, 1995.

- KROHN, K.; BAHRAMSARI, R.; FLÖRKE, U.; LUDEWIG, K.; KLICHESPORY, C.; MICHEL, A.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S. 15 Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. **Phytochemistry**, v. 45, p. 313-320, 1997.

- KOKUBUN, T.; VEITCH, N.C.; BRIDGE, P.D.; SIMMONDS, M.S.J. 20 Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 779-782, 2003.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOCHANAN, P. R.; AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **PloS One**, v. 8(9), 2013.

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

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

KUSARI, S.; VERMA, V. C.; LAMSHOEFT, M.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28(3), p. 1287-1294, 2012b.

5

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

10

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

15

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

20

LIN, T.; WANG, G. H.; LIN, X.; HU, Z. Y.; CHEN, Q. C.; XU, Y.; ZHANG, X.K.; CHEN, H. F. Three New Oblongolides from *Phomopsis* sp. XZ-01, an Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata*. **Molecules**, v. 16(4), p. 3351-3359, 2011.

25

LIU, S.; RUAN, W.; LI, J.; XU, H.; WANG, J.; GAO, Y.; WANG, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**, v. 166(2), p. 93-102, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa:SP.: Plantarum, 152p. 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

30

- LUCHI, N.; CAPRETTI, P.; PINZANI, P.; ORLANDO, C.; PAZZAGLI, M. Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak tissue. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 61-68, 2005.
- 5 LUO, X.B.; CHEN, B.; YAO, S.Z.; ZENG, J.G. Simultaneous analysis of caffeic acid derivatives and alkaloids in roots and extracts of *Echinacea purpurea* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry”, **Journal of Chromatography A**, v. 986, p. 73-81, 2003.
- 10 MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25(3), p. 429-438, 2002.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.;
15 CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, v. 79, p. 121-186, 2014.
- MARINHO, A.M.R.; MARINHO, P.S.B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp., um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (*Rutaceae*). **Revista de Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, p. 189-199, 2007.
- 20 MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F.; LIMA, H.C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae – Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, v. 59(3), p. 455-476, 2008.
- 25 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.
- MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; MAMBU, J.E; ESPÍNDOLA, L.S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal**
30 **of Ethnopharmacology**, v. 110, p.165-170, 2007.

METZ, A.M.; HADDAD, A.; WORAPONG, J.; LONG, D.M.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, v. 146, p. 2079-2089, 2000.

5 NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, 2014.

NALINI, M. S.; SUNAYANA, N.; PRAKASH, H. S. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of western ghats, India. **International Journal of Biodiversity**, 2014.

10

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75(3), p. 311-335, 2012.

15 OKUNO, T.; OIKAWA, S.; GOTO, T.; SAWAI, K.; SHIRAHAMA, H.; MATSUMOTO, T. Structures and phytotoxicity of metabolites from *Valsa ceratosperma*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50(4), p. 997-1001, 1986.

PATITUCCI, M. L.; VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; ZOGHBI, M G. B.; SILVA, J. R. A. Utilização de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução na Detecção de Classe de Terpenos em Extratos Brutos Vegetais. **Química nova**, v. 18(3), 1995.

20

PERCIVAL, S.S. Use of *Echinacea* in medicine. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 155-158, 2000.

25 PEREIRA, C. B.; OLIVEIRA, D.M.; HUGHES, A.; KOHLHOFF, M.; VIEIRA, M.L.A.; VAZ, A.B.M.; FERREIRA M.C.; CARVALHO, C.R.; ROSA L.H.; ROSA, C.A.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JOHANN, S.; COTA, B.B. Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **Journal of Antibiotics**, 2015.

PETERS, A.F. Field and culture studies of *Streblonema-Macrocytis* new species Ectocarpales Phaeophyceae from Chile, a sexual endophyte of giant kelp. **Phycologia**, v. 30, p. 365-377, 1991.

5 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.

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

POHL, C. H.; KOCK, J. L.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: a review. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.) **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Microbiology Book Series, Badajoz, p.
15 61-71, 2011

PUGH, N.D.; BALACHANDRAN, P.; LATA, H.; DAYAN, F.E.; JOSHI, V.; BEDIR E.; MAKINO T.; MORAES R.; KHAN I.; PASCO, D.S. Melanin: Dietary Mucosal Immune Modulator from Echinacea and Other Botanical Supplements. **International**
20 **Immunopharmacology**, v. 5, p. 637-647, 2005.

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

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

QADRI, M.; RAJPUT, R.; ABDIN, M. Z.; VISHWAKARMA, R. A.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). **Microbial Ecology**, v. 67(4), p. 877-887, 2014.

5

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

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

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, v. 289, p. 1920–1921, 2000.

15

RIESS, K.; OBERWINKLER, F.; BAUER, R.; GARNICA, S. Communities of endophytic *Sebaciales* associated with roots of herbaceous plants in agricultural and grassland ecosystems are dominated by *Serendipita herbamans* sp. nov. **PloS One**, v. 9(4), 2014.

20

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.

25 RODRIGUES, K.F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K.D. (ed.) **Diversity of tropical microfungi**. University of Hong Kong press. p. 57-69, 1997.

30 RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, v. 39, p.131-135, 1999.

RODRIGUES, K. F.; SIEBER, T. N.; GRÜNIG, C. R.; HOLDENRIEDER, O. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **Mycological Research**, v. 108, p.45–52, 2004.

5

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.

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

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

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

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

30 ROSA, L.H.; QUEIROZ, S.C.N.; MORAES, R.R.; WANG, X.; TECHEN, N.; PAN, Z.; CANTRELL, C.L.; WEDGE, D.E. *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the

cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae). **Symbiosis**, v. 60, p.133-142, 2013.

5 RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; KIRTIKARA, K. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, v. 69(3), p. 783-787, 2008.

10 SADO-KAMDEM, S. L.; VANNINI, L., & GUERZONI, M. E. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129(3), p. 288-294, 2009.

15 SAIKKONEN, K; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.29, p.319-345, 1998.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyteplant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.

20 SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Diversity*, v. 41, p. 101–113, 2010.

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

25 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. **Extremophiles**, v. 16, p. 95-103, 2012.

SANTOS, A. O. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103(3), p. 277-281, 2008.

5

SANTOS JÚNIOR, H.M.; OLIVEIRA, D.F.; CARVALHO, D.A.; PINTO, J.M.A.; CAMPOS, V.A.C.; MOURÃO, A.R.B.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, v.64, p.231-238, 2010.

10

SANTOS, J. M.; CORREIA, V. G.; PHILLIPS, A. J. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. **Fungal Biology**, v. 114(2), p. 255-270, 2010.

15

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 27-32, 2005.

20

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

25

SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C. What are endophytes In: SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (ed.) **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer Heidelberg, p. 1–13, 2006.

30

SHEN, X. Y.; CHENG, Y. L.; CAI, C. J.; FAN, L.; GAO, J.; HOU, C. L. Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Endophytic Fungi Isolated from Moso Bamboo Seeds. **PloS One**, v. 9(4), 2014.

SILVA, G. H.; DE OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. D. S.; ARAUJO, A. R.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M.C.; COSTA-NETO, C.M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 33(10), p. 2038-2041, 2010.

5

SILVA-HUGHES, A. F.; WEDGE, D. E.; CANTRELL, C. L.; CARVALHO, C. R.; PAN, Z.; MORAES, R. M.; MADDOXX, V. L.; ROSA, L. H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. **Microbiological Research**, 2015.

10

SIM, J. H.; KHOO, C.H.; LEE, L.H.; CHEAH, Y.K. Molecular diversity of fungal endophytes isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 651-658, 2010.

15

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazônica**, v.34(2), p.185-195, 2004.

20

STANISAVLJEVIC, I.; STOJICEVIC, S.; VELICKOVIC, D.; VELJKOVIC, V.; LAZIC, M. Antioxidant and antimicrobial activities of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* L.) extracts obtained by classical and ultrasound extraction. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 478-483, 2009.

25

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.

30

STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (ed.) **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker.pp. 3-30, 2000.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.F. Endophytic fungi. In: Muller, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (ed.) **Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods**. Elsevier Academic Press. p. 241-270, 2004.

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

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews***, v.67, p. 491-502,
10 2003.

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

15 SUKRUTHA, S. K.; ADAMECHOVA, Z.; KUNDER, R. B.; SAVITHA, J.; CERTIK, M. Endophytic fungi: are they potential candidates for the production of polyunsaturated fatty acids?. **International Journal of Applied Microbiology Sciences**, v. 1(2), p. 44-49, 2012.

20 SUN, X.; GUO, L. D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, v. 3(1), p. 65-76, 2012.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, p. 818-826, 2002.
25

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v.23, 0.9-19, 2009.

30

TAMURA, K.; STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

5 TAYLOR, J.E.; HYDE, K.D.; JONES, B.G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, p. 335-346, 1999.

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

10

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

15

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**, v. 38, p. 167-183, 2009.

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

25 TOMSHECK, A. R.; STROBEL, G. A.; BOOTH, E.; GEARY, B.; SPAKOWICZ, D.; KNIGHTON, B.; FLOERCHINGER, C.; SEARS, J.; LIARZI, O.; EZRA, D. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1, 8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. **Microbial Ecology**, v. 60(4), p. 903-914, 2010.

UDAYANGA, D.; LIU, X.; MCKENZIE, E. H.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50(1), p. 189-225, 2011.

5 VAN NIEKERK, J. M.; GROENEWALD, J. Z.; FARR, D. F.; FOURIE, P. H.; HALLEER, F.; CROUS, P. W. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. **Australasian Plant Pathol**, v. 34, p. 27–39, 2005.

10 VAZ, A. B. M.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R. Q.; VIEIRA, M. L. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1381-1391, 2009.

15 VAZ, A.B.M.; DA COSTA, A.G.F.C.; RAAD, L.V.V.; GOES-NETO, A. Fungal endophytes associated with three South American Myrtae (Myrtaceae) exhibit preferences in the colonization at leaf level. **Fungal Biology**, v. 118, 2014.

VEIGA JR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20(6), 1997.

20 VEIGA JÚNIOR, V.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, p.273-286, 2002.

25 VIEIRA, M.L.A. **Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados a plantas bioativas de diferentes ecossistemas brasileiros**. 2012. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

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

VIEIRA, M.L.A.; JOHANN, S.; HUGHES, F.M.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, p. 847-856, 2014.

5

XING, X.K.; CHEN, J.; XU, M.J.; LIN, W.H.; GUO, S.X. Fungal endophytes associated with *Sonneratia* (Sonneratiaceae) mangrove plants on the south coast of China. **Forest Pathology**, 2010.

10 XIONG, Z. Q.; YANG, Y. Y.; LIU, Q. X.; SUN, C. C.; JIN, Y.; WANG, Y. Endophytes in the plant *Huperzia serrata*: fungal diversity and discovery of a new pentapeptide. **Archives of Microbiology**, 2014.

XU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, J.; LI, J.; LI, X.; WANG, J. Fungal endophytes from
15 *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 68-72, 2008.

XU, S.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; SHEN, Y.; DING, H.; TAN, R. X. Cytotoxic cytochalasin metabolites of endophytic *Endothia gyrosa*. **Chemistry & Biodiversity**, v.
20 6(5), p. 739-745, 2009.

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

25

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63(12), p. 1692-1695, 2000.

WALSH, J. L.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C.; SANGALANG, A. E.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; PETROVIC, T. *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. **Fungal Diversity**, v. 44(1), p. 149-159, 2010.

5 WALTERS, D.; RAYNOR, L.; MITCHELL, A.; WALKER, R.; WALKER, K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 157(1), p. 87-90, 2004.

10 WANG, X.; ZHANG, X.; LIU, L.; XIANG, M.; WANG, W.; SUN, X. CHE, Y.; GUO, L.; LIU, G.; GUO, L.; WANG, C.; YIN, W.B.; STADLER, M.; ZHANG, X.; LIU, X. Genomic and transcriptomic analysis of the endophytic fungus *Pestalotiopsis fici* reveals its lifestyle and high potential for synthesis of natural products. **BMC Genomics**, v. 16(1), 2015.

15 WEDGE, D. E. & KUHAJEK, J. M. A microbioassay for fungicide discovery. **South. Assoc. Agric. Sci. Bull. Biochem. Biotechnol.** v. 11, p.1-7, 1998.

20 WEDGE, D. E.; DALE, N. G. A new 2D-TLC Bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. **Journal of Natural Products.** v. 63, p. 1050-1054, 2000.

25 WEDGE, D.E.; KLUN, J.A.; TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; OZEK, T.; BASER, K.H.C.; LIU, Z.; ZHANG, S.; CANTRELL, C.L.; ZHANG, J. Bioactivity-Guided Fractionation and GC/MS Fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* Root Components for Antifungal and Mosquito Deterrent Activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, no. 2, p. 464-470, 2009.

30 WEI, J. G.; XU, T.; GUO, L.D.; LIU, A. R.; ZHANG, Y.; PAN, X.H. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of *Podocarpaceae*, *Theaceae* and *Taxaceae* in southern China. **Fungal Diversity**, v. 24 (1), p. 55-74, 2007.

WELLS, J. M.; CUTLER, H. G.; COLE, R. J. Toxicity and plant growth regulator effects of cytochalasin H isolated from *Phomopsis* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22(8), p. 1137-1143, 1976.

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

10 WILSON, D. Endophytes – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, p. 274-276, 1995.

WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 171-212, 2013.

15

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological research**, v.165(6), p. 437-449, 2010.

20 YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, v. 13, p. 53-59, 2015

YUAN, Z.L.; CHEN, Y.C.; YANG, Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, p. 295-303, 2009.

25

9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

9.1 Resumos publicados em anais de congressos

- 5 CARVALHO, C.R., GODINHO, V.M., GONÇALVES, V.N., FERREIRA, M.C., GALLIZA, I.V., SILVA, T., SOBRAL, M., PEREIRA, G.D., SILVA, K., ROSA, C.A., ROSA, L.H. Bioprospecção de fungos endofíticos associados a duas espécies de *Copaifera* spp. L. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM). 2012.
- 10 CARVALHO, CR.; HUGHES, A. F. S.; MORAES, R.; MADDOX, V. L.; ROSA, L. H. WEDGE, D. E. Antifungal activity of endophytic fungi associated with *Echinacea purpurea*. 12th Annual Oxford ICBS. *Planta Medica*, v. 5, p. 384, 2013.
- 15 HUGHES, A. F. S.; CARVALHO, CR.; MORAES, R.; MADDOX, V. L.; ROSA, L. H. WEDGE, D. E. Antifungal activity from stem extract and endophytic fungi of *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. 12th Annual Oxford ICBS. *Planta Medica*, v. 5, p. 384, 2013.
- 20 CARVALHO, C.R.; CANTRELL, C.L.; HUGHES, A.F.S.; MORAES, R.; MADDOX, V.L.; PAN, Z.; WEDGE, D.E.; ROSA, L.H. Isolamento e identificação de fungos endofíticos associados à *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae). I Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia e a Sociedade. 2014.
- 25 CARVALHO, CR.; CANTRELL, C.L.; HUGHES, A. F. S.; MORAES, R.; MADDOX, V. L.; WEDGE, D. E.; ROSA, L. H. Identificação de ácidos graxos antifúngicos produzidos por fungos endofíticos associados à *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Asteraceae). XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología. 2014.
- 30 CARVALHO, CR.; CANTRELL, C.L.; HUGHES, A. F. S.; MORAES, R.; MADDOX, V. L.; WEDGE, D. E.; PAN, Z.; ROSA, L. H. Metabólitos bioativos produzidos por

Biscogniauxia sp., um fungo endofítico associado a *Echinacea purpurea* (L.) Moench. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología. 2014.

5 9.2 Artigos publicados

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

CARVALHO, C. R.; VIEIRA, M. L. A.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; PIMENTA, R. S.; SALES JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidouustus*. *Natural Product Research*, 2015.

9.3 Artigos publicados em colaborações

20

CANTRELL, C. L.; ZHELJAZKOV, V. D.; CARVALHO, C. R.; ASTATKIE, T.; JELIAZKOVA, E. A.; ROSA, L. H. Dual extraction of essential oil and podophyllotoxin from creeping juniper (*Juniperus horizontalis*). *PloS One*, v. 9(9), 2014.

25

PEREIRA, C. B.; OLIVEIRA, D.M.; HUGHES, A.; KOHLHOFF, M.; VIEIRA, M.L.A.; VAZ, A.B.M.; FERREIRA M.C.; CARVALHO, C.R.; ROSA L.H.; ROSA, C.A.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; JOHANN, S.; COTA, B.B. Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *Journal of Antibiotics*, 2015.

SILVA-HUGHES, A. F.; WEDGE, D. E.; CANTRELL, C. L.; CARVALHO, C. R.; PAN, Z.; MORAES, R. M.; MADDOXX, V. L.; ROSA, L. H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, 2015.

5

GONÇALVES, V. N.; CARVALHO, C. R.; JOHANN, S.; MENDES, G.; ALVES, T. M.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; CANTRELL, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antibacterial, antifungal and antiprotozoal activities of fungal communities present in different substrates from Antarctica. *Polar Biology*, p. 1-10, 2015.

10

9.4 Artigos científicos em fase de preparação

CARVALHO, CR.; CANTRELL, C.L.; HUGHES, A. F. S.; PAN, Z.; MORAES, R. M.; MADDOX, V. L.; WEDGE, D. E.; ROSA, L. H. Molecular phylogeny, diversity and bioprospecting of endophytic fungi associated with wild ethnomedicinal American plant *Echinacea purpurea* (Asteraceae).

15

CARVALHO, CR.; CANTRELL, C.L.; WEDGE, D. E.; SOBRAL, M.E.G.; ROSA, L. H. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with *Copaifera* L. (Leguminosae – Caesalpinioideae).

20

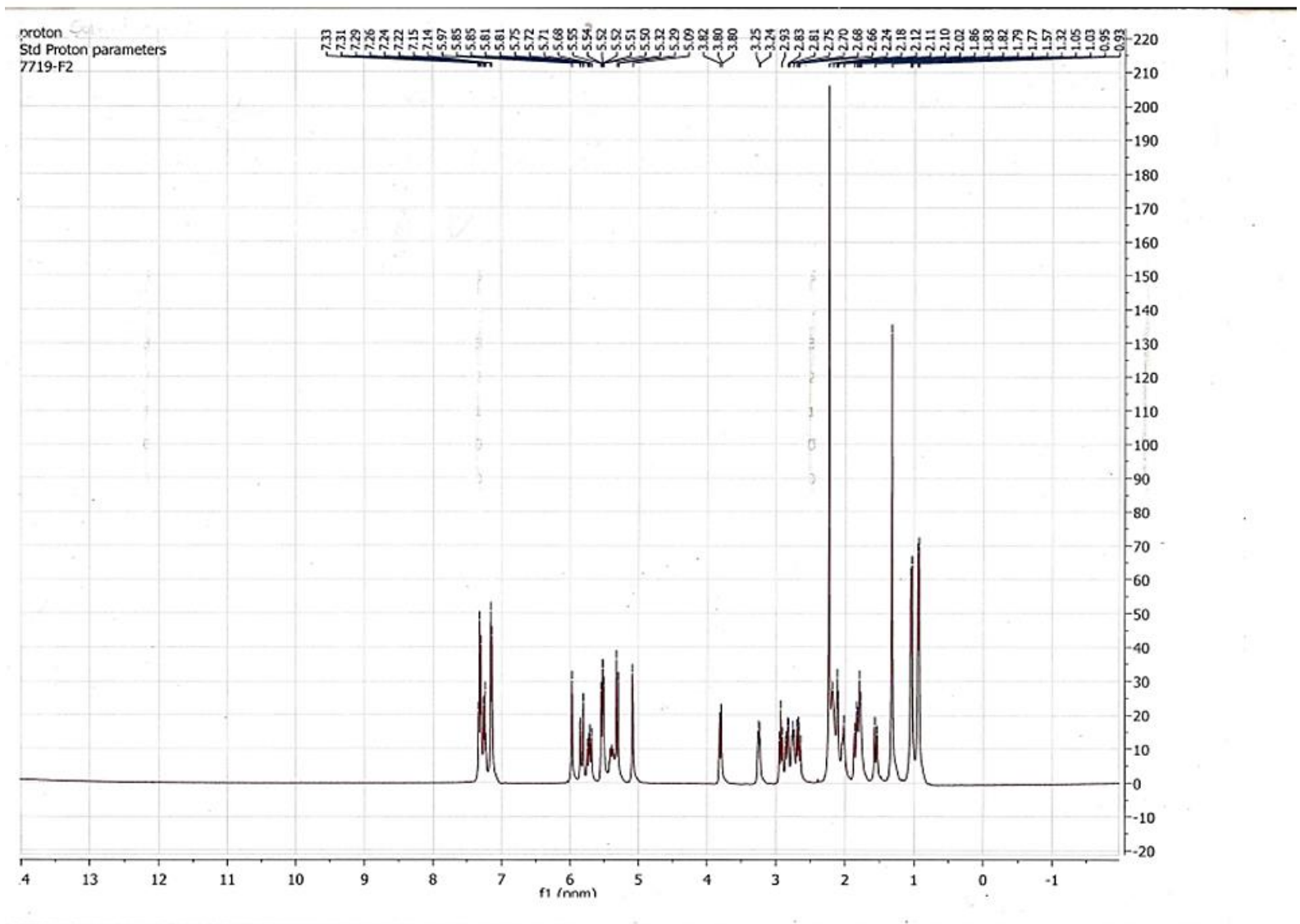
9.5 Supervisões e coorientações concluídas

Monografia de conclusão de curso de especialização

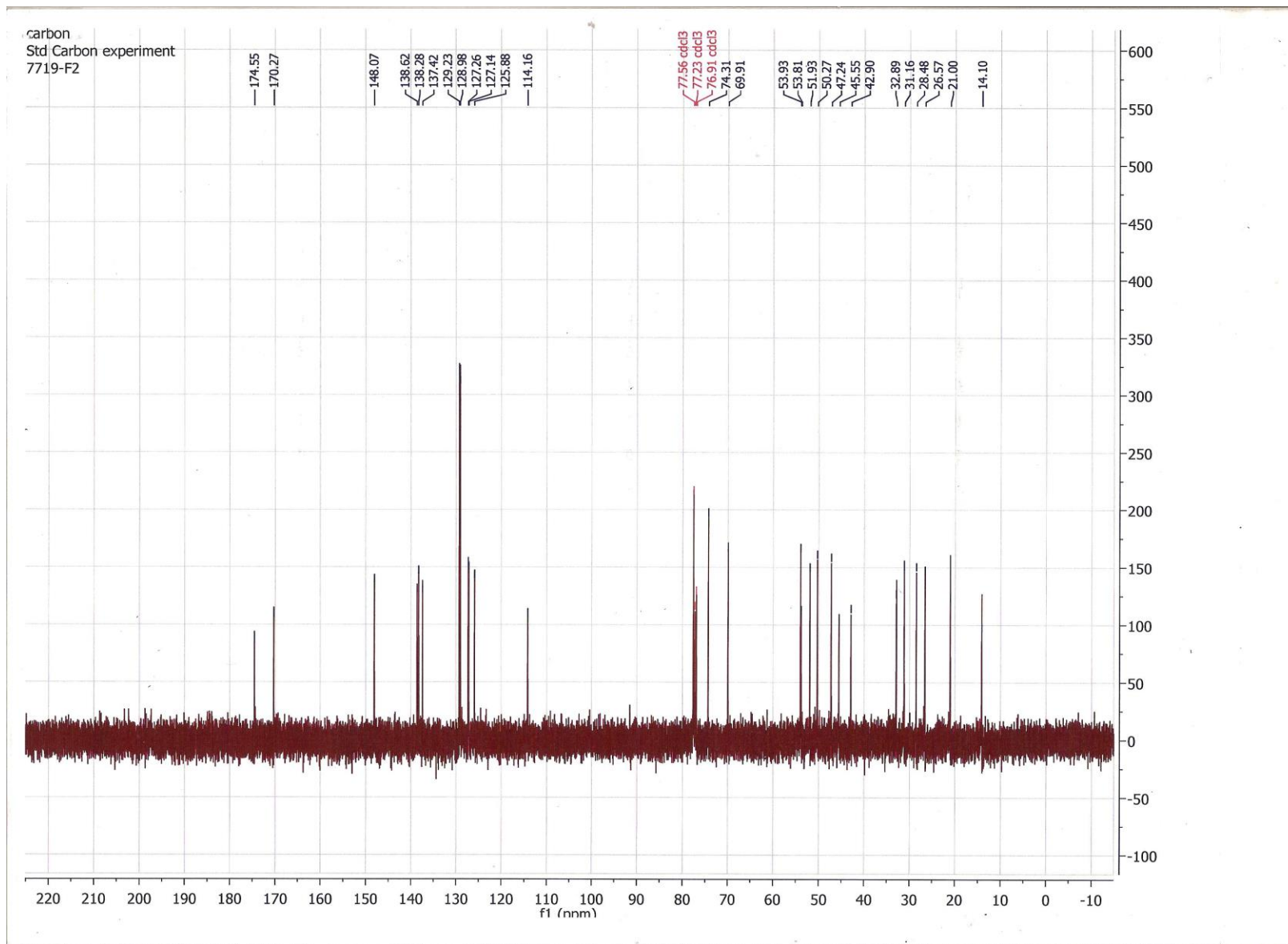
GONÇALVES, I.C.O. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas medicinais do Cerrado. 2013. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Microbiologia - Ênfase: Ambiente e Indústria) - Universidade Federal de Minas Gerais.

25

ANEXOS



Anexo1. Espectro de RMN ¹H [600 MHz, CDCl₃] da fração F2 do extrato *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719.



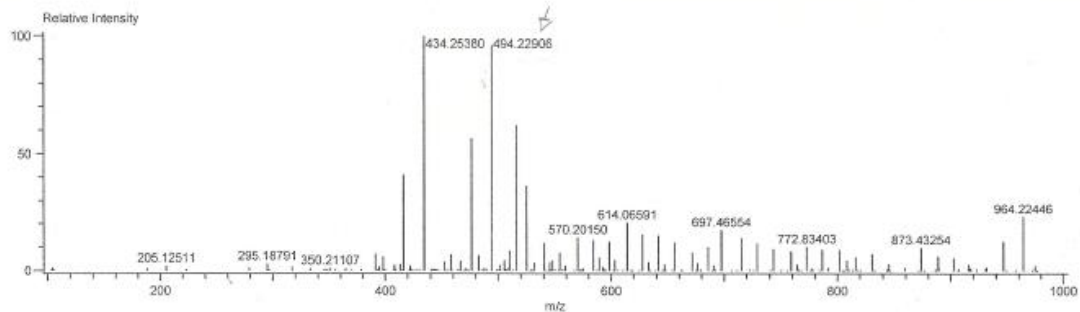
Anexo2. Espectro de RMN ^{13}C [600 MHz, CDCl_3] da fração F2 do extrato *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719.

Data: F2_POS2
 Sample Name:
 Description:
 Ionization Mode: ESI+
 History: Determine m/z [Peak Detect[Centroid,30,Area].Correct Base[]].Correct Base[5.0%].Average(MS[1] 0.33. 0.69)

Acquired: 3/4/2013 2:46:33 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: trypPOS13
 Created: 3/4/2013 3:11:23 PM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1 Tolerance: 30.00 (mmu)
 Element: ¹²C: 28 .. 31, ¹H: 10 .. 50, ¹⁴N: 0 .. 1, ²³Na: 0 .. 1, ¹⁶O: 2 .. 10

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



Mass (z)	Intensity	Calc. Mass (z)	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturations Number
494.22906	115285.28	494.23045	-1.39	³² C ₂₈ H ₄₄ N ₂ O ₈	13.0
		494.23073	-1.67	³² C ₂₈ H ₄₃ ¹⁴ N ₂ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₈	14.5
		494.21788	11.18	³² C ₂₈ H ₄₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	13.5
		494.24330	-14.24	³⁶C₂₈H₄₂¹⁴N₂¹⁶O₈	14.0
		494.20692	22.14	³⁶C₂₇H₄₂¹⁴N₂¹⁶O₈	15.0
		494.25426	-25.20	³² C ₂₈ H ₄₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₈	12.5
516.15178	74594.58	516.15488	-3.10	³² C ₂₇ H ₄₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₈	19.0
		516.14231	9.47	³² C ₂₈ H ₄₂ ¹⁴ N ₁ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₈	19.5
		516.14203	9.75	³⁶C₂₇H₄₂¹⁶O₈	18.0
		516.16584	-14.06	³⁶C₂₇H₄₂¹⁴N₁¹⁶O₈	17.5
		516.12946	22.32	³²C₂₇H₄₂¹⁴N₁¹⁶O₈	18.5
		516.17601	-24.23	³² C ₂₈ H ₄₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₈	14.0
		516.17842	-26.64	³⁶C₂₇H₄₂¹⁶O₈	17.0
		516.17859	-26.91	³² C ₂₇ H ₃₇ ¹⁴ N ₂ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₈	18.5

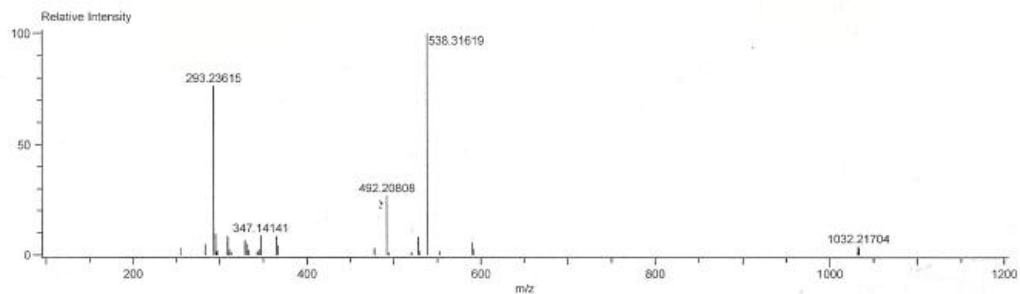
Anexo 3. Análise de espectro de massa em LC/MS, com sinais do polo positivo - Fração F2 de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719.

Data: F2 NEG
 Sample Name:
 Description:
 Ionization Mode: ESI-
 History: Determine m/z|Peak Detect|[Centroid,30,Area],Correct Base[[]],Correct Base[5.0%],Average[MS[1]] 0.38..0.57

Acquired: 3/4/2013 2:33:11 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: tryp13
 Created: 3/4/2013 3:07:13 PM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1 Tolerance: 30.00(mmu)
 Element: ¹²C: 28 .. 31, ¹H: 30 .. 100, ¹⁴N: 0 .. 20, ²³Na: 0 .. 0, ¹⁶O: 5 .. 20

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



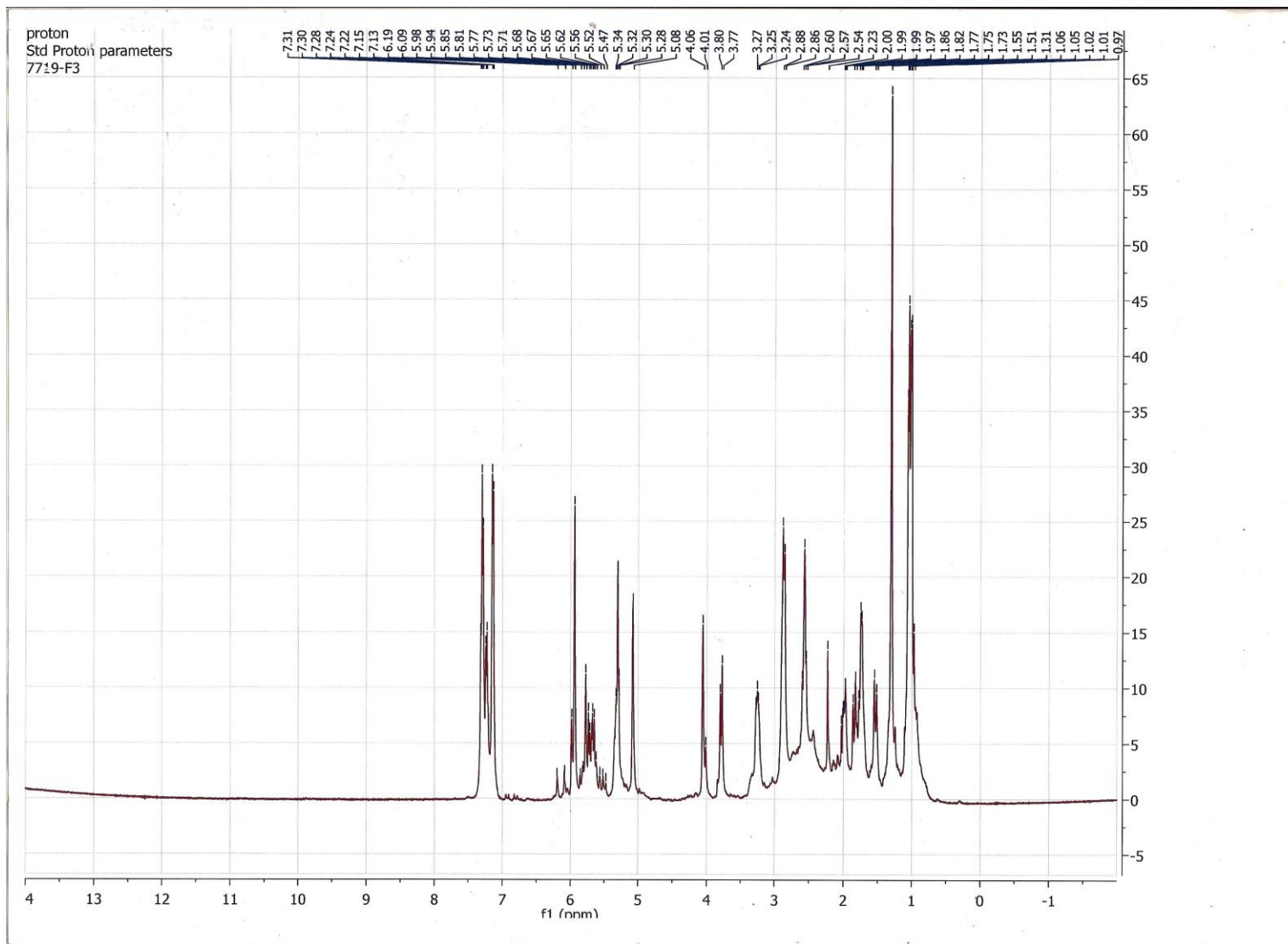
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
492.20808	5047.04	492.20223	5.88	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₀ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	14.5
		492.21480	-6.72	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	14.0
		492.22604	-17.96	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	14.0
538.31619	18930.55	538.31552	0.68	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₁ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	12.0
		538.31418	2.01	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₇	7.0
		538.32541	-9.22	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₁ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₇	7.0
		538.32810	-11.90	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₇	11.5
		538.30429	11.91	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₈	12.0
		538.30294	13.25	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₉	12.5
		538.30161	14.59	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₈	7.5
		538.33799	-21.80	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₄ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₈	6.5
		538.29171	24.49	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₈	12.5
		538.29037	25.83	¹² C ₂₈ ¹ H ₃₂ ¹⁴ N ₂ ¹⁶ O ₉	13.0

$C_{28}H_{31}O_7?$

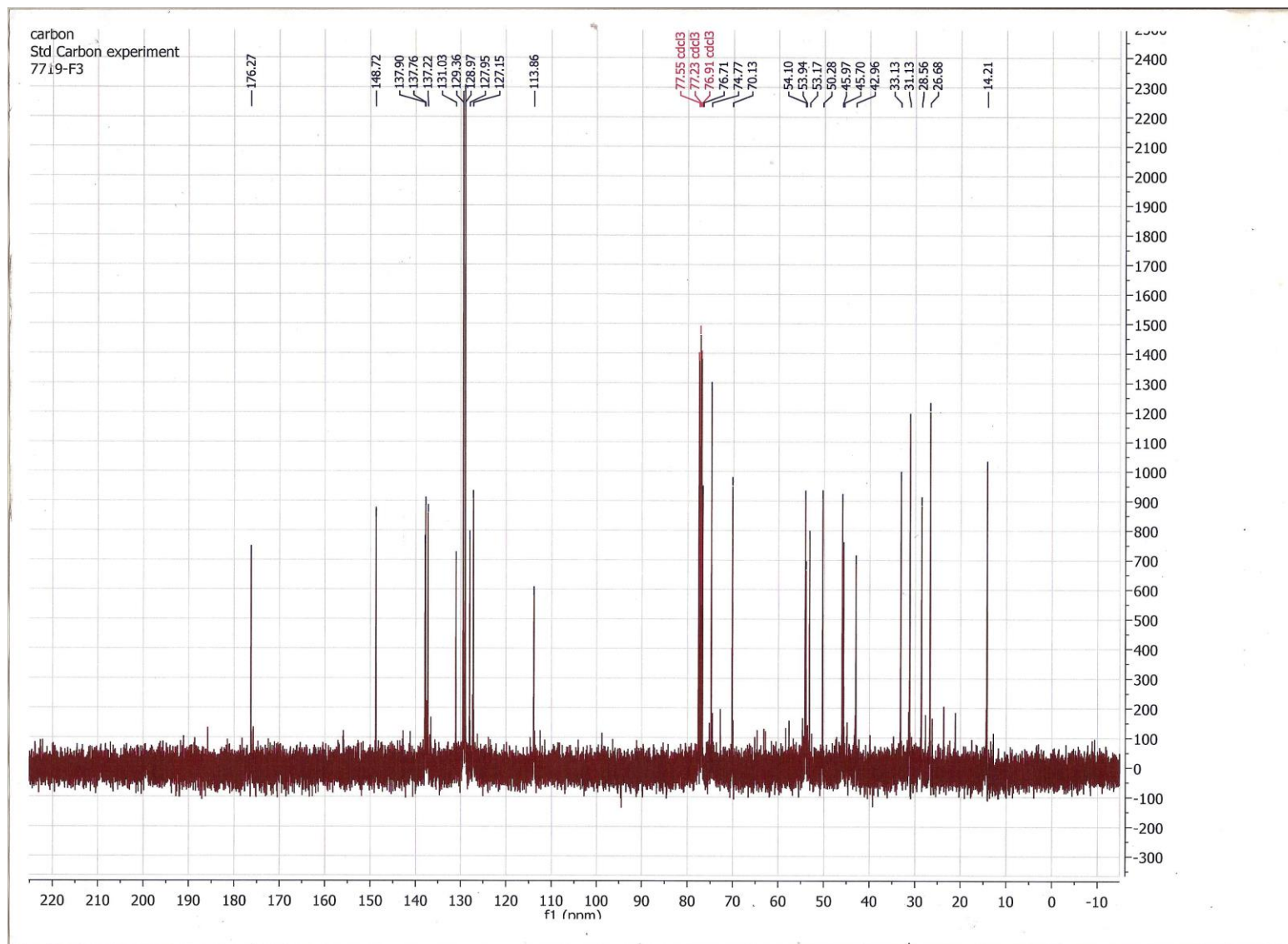
$C_{28}H_{31}NO_7$ neg
 $C_{28}H_{31}NO_7$ pos

MW = 493 m/z

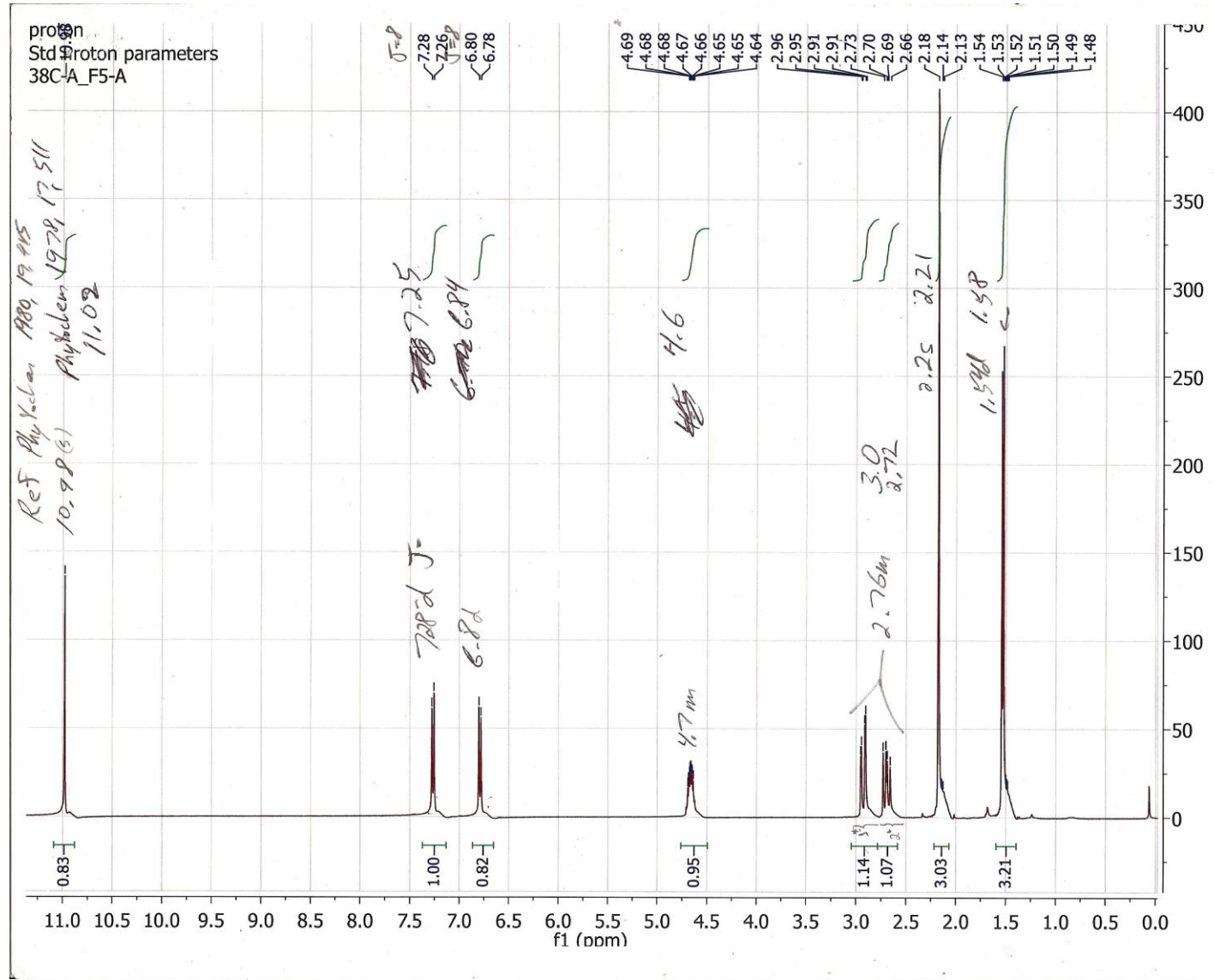
Anexo 4. Análise de espectro de massa em CL-EM, com sinais do polo negativo - Fração F2 de *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719.



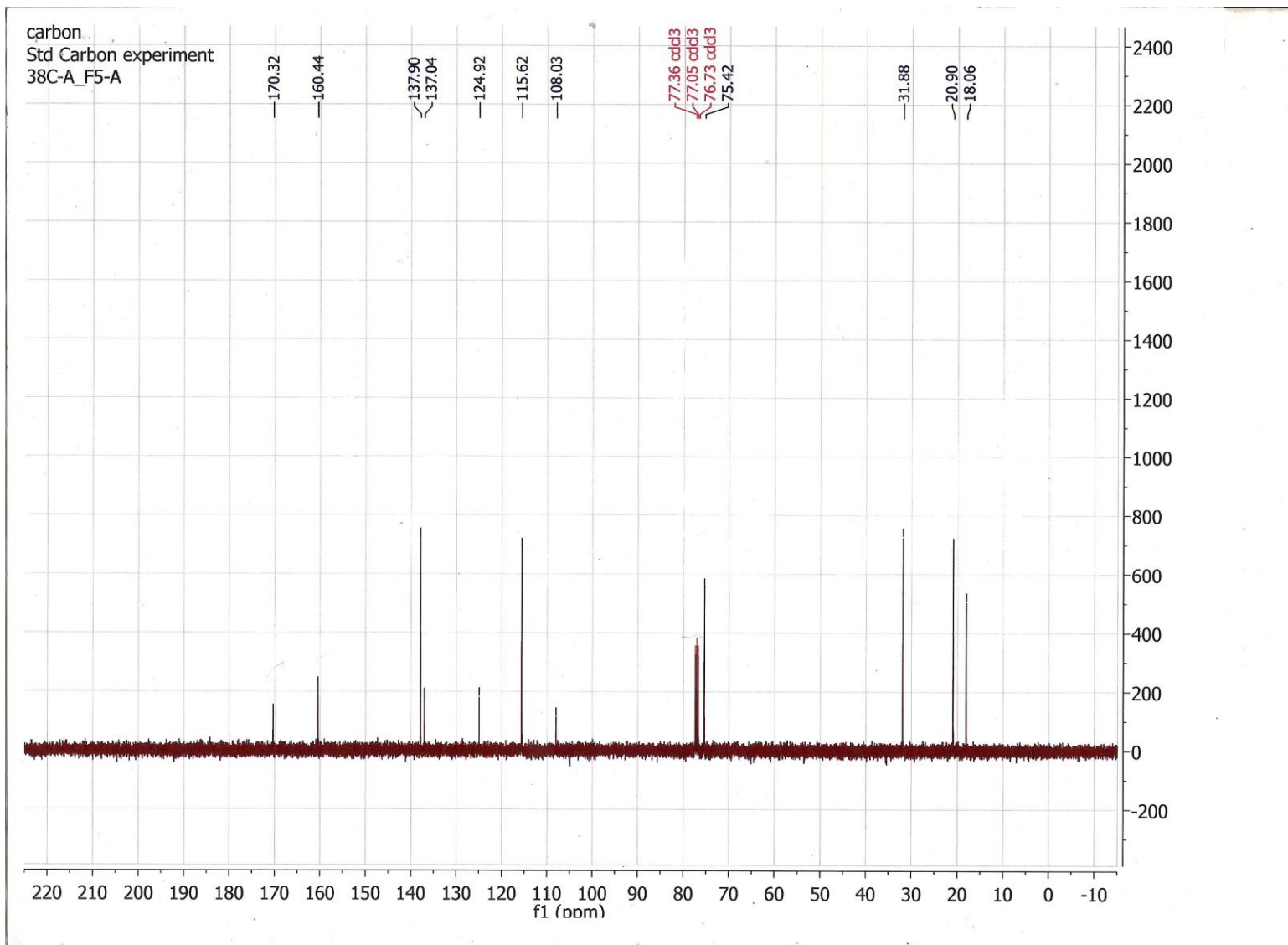
Anexo5. Espectro de RMN ^1H [600 MHz, CDCl_3] da fração F3 do extrato *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719.



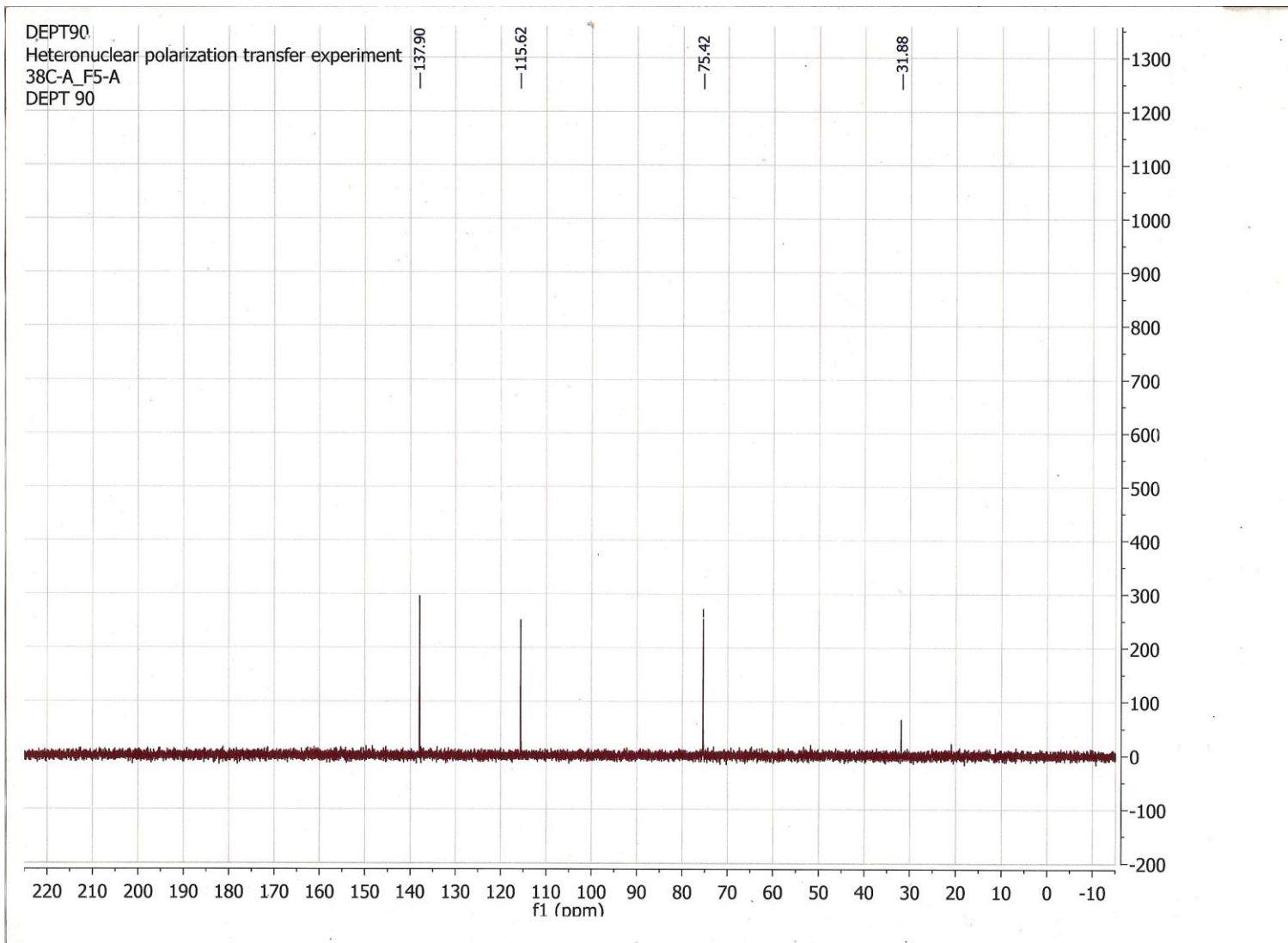
Anexo6. Espectro de RMN ^{13}C [600 MHz, CDCl_3] da fração F3 do extrato *Diaporthe* sp. 8 UFMGCB 7719



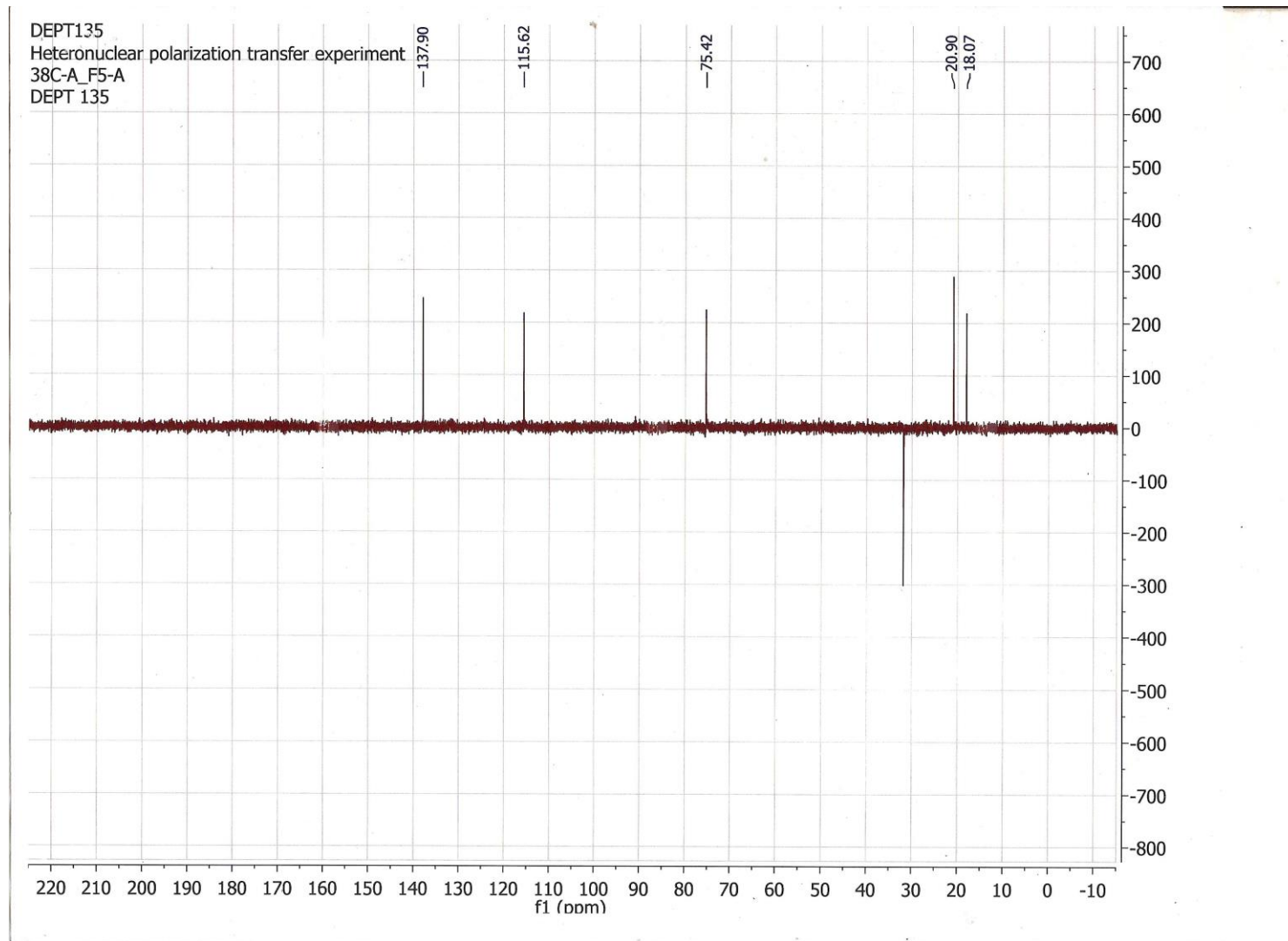
Anexo7. Espectro de RMN ¹H [600 MHz, CDCl₃] da fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



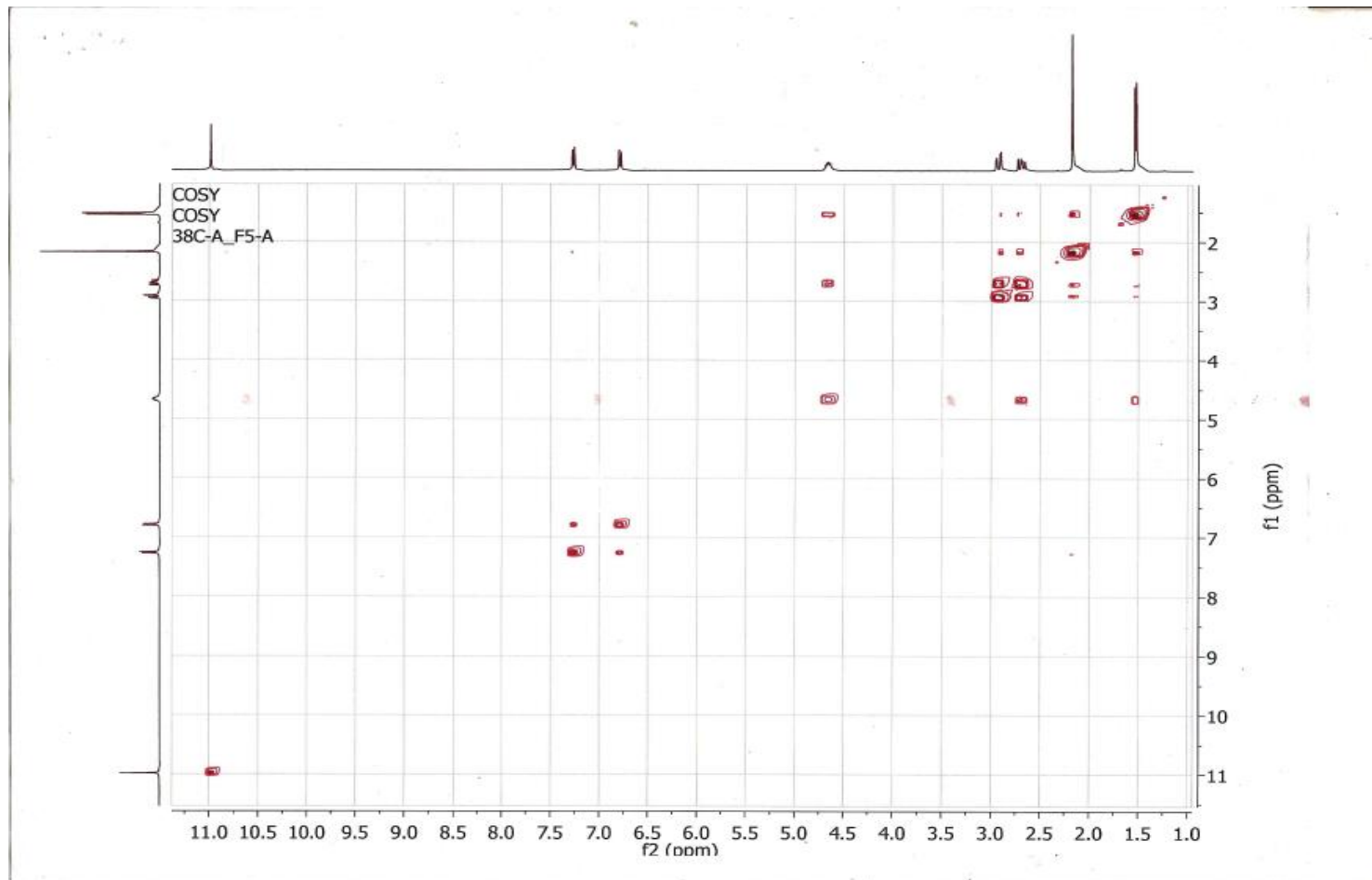
Anexo8. Espectro de RMN ^{13}C [600 MHz, CDCl_3] da fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



Anexo 9. Espectro de Espectro DEP 90° da fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



Anexo 10. Espectro de Espectro DEP 135° da fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



Anexo 11. Espectro de COSY da fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA

Data:F5-A NEG

Sample Name:

Description:

Ionization Mode:ESI-

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0.39..0.50)

Acquired:3/4/2013 1:18:18 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:tryp13

Created:3/4/2013 1:24:04 PM

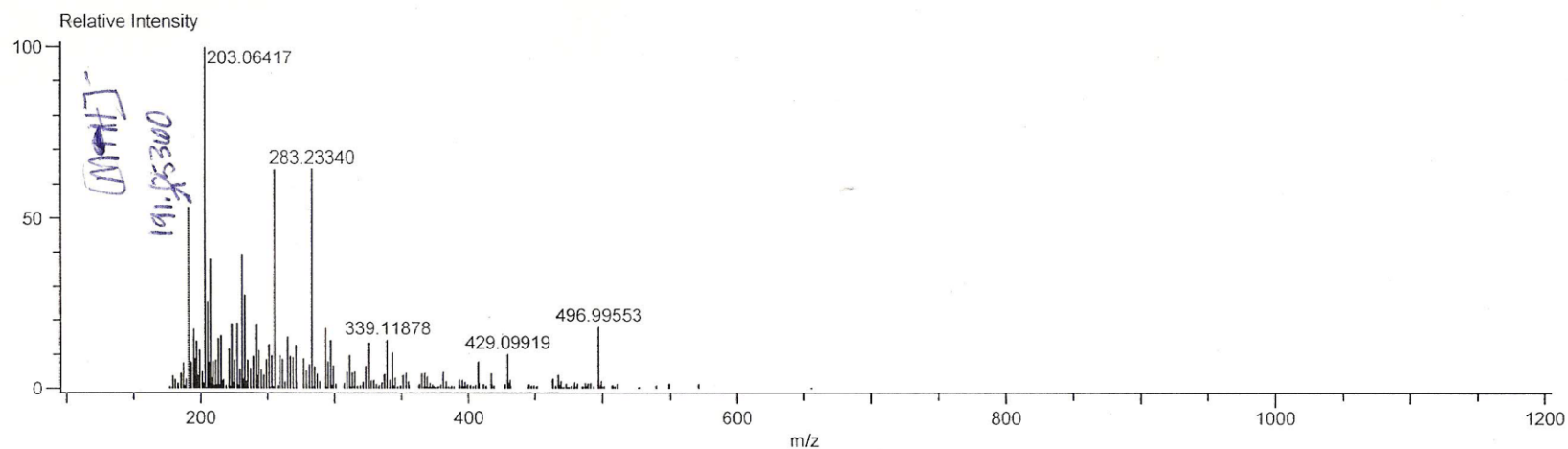
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:20.00(mmu)

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

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



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

Anexo 12. Análise de espectro de massa em CL-EM, com sinais do polo negativo - fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.

Data:F5-A POS

Sample Name:

Description:

Ionization Mode:ESI+

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[[]];Correct Base[5.0%];Average(MS[1] 0.45..0.52)

Acquired:3/4/2013 1:08:59 PM

Operator:AccuTOF

Mass Calibration data:trypPOS13

Created:3/4/2013 1:15:00 PM

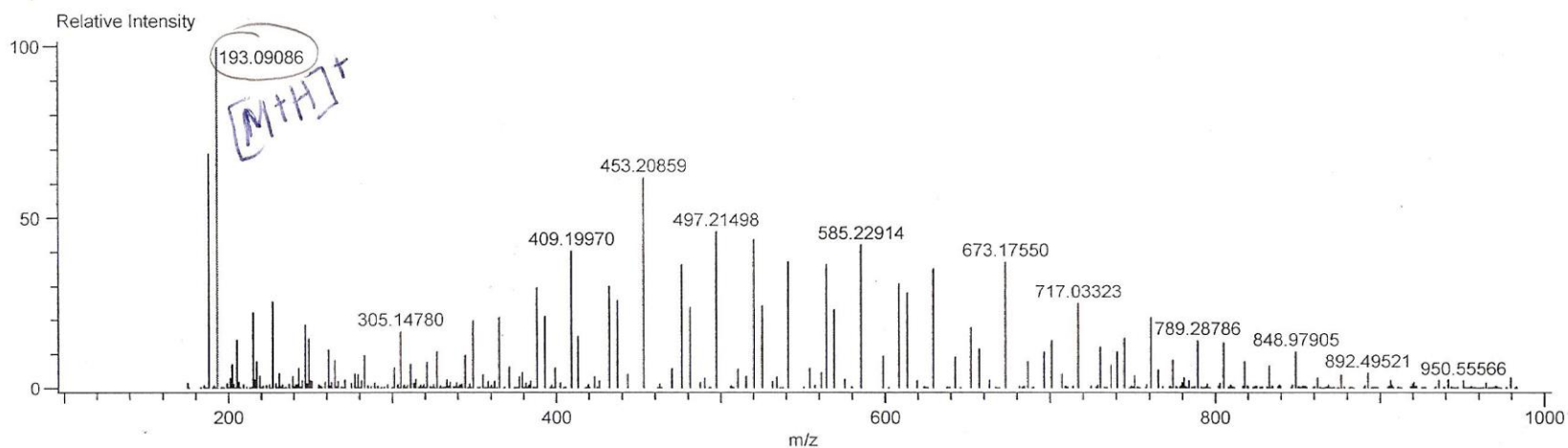
Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:10.00(mmu)

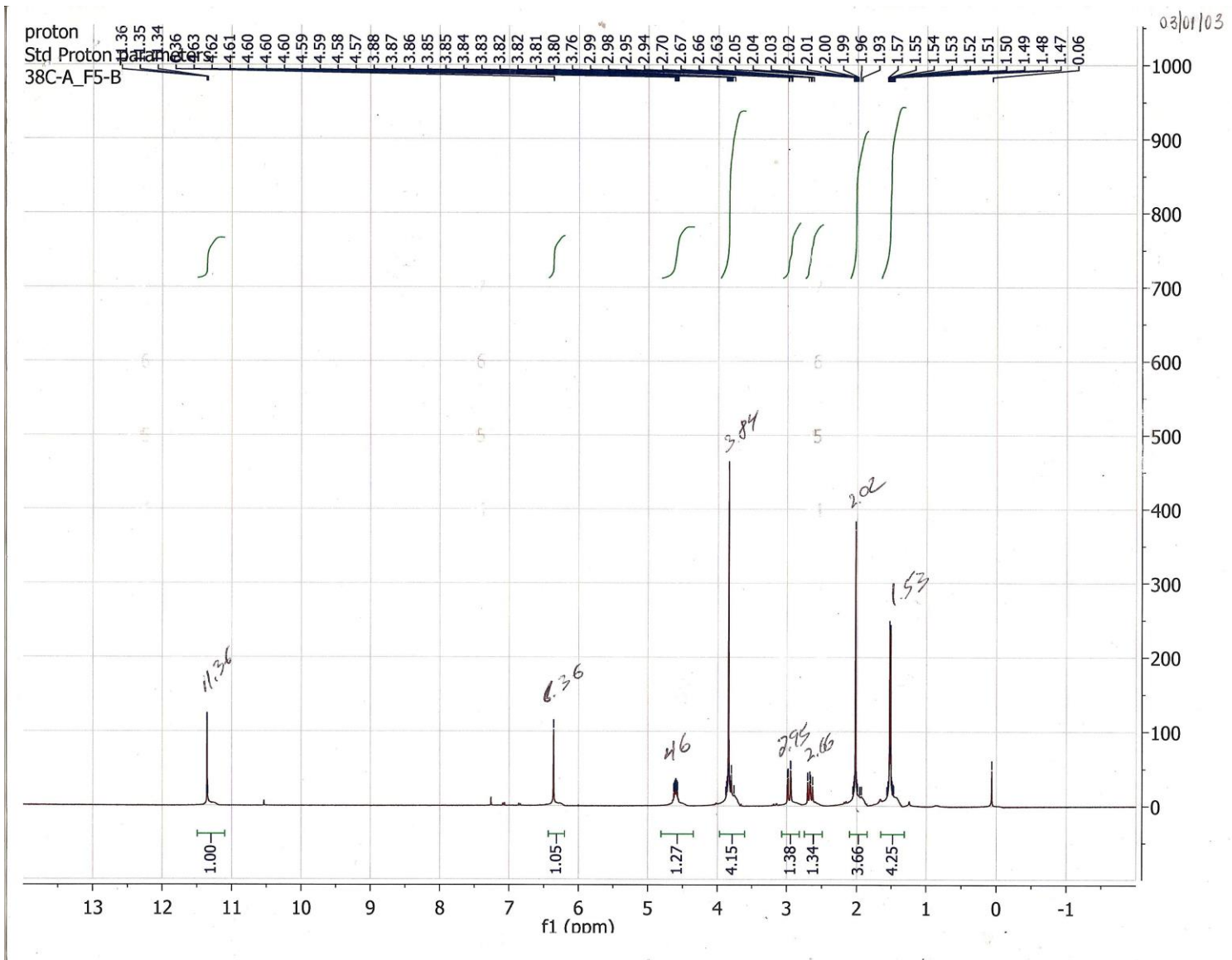
Unsaturation Number:-1.5 .. 20.0 (Fraction:Both)

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

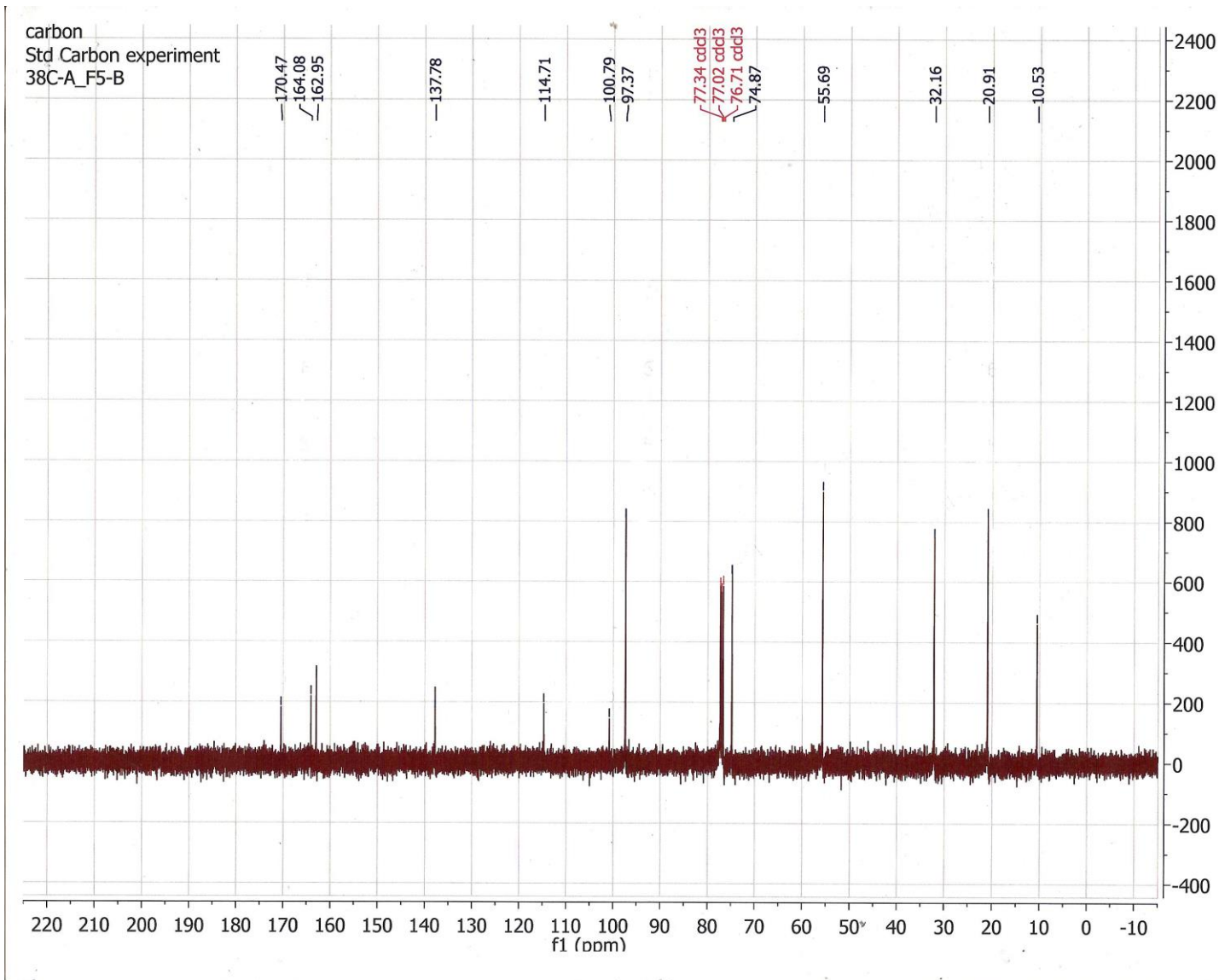


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
193.09086	288207.42	193.08647	4.39	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₃ ¹⁶ O ₃	5.5

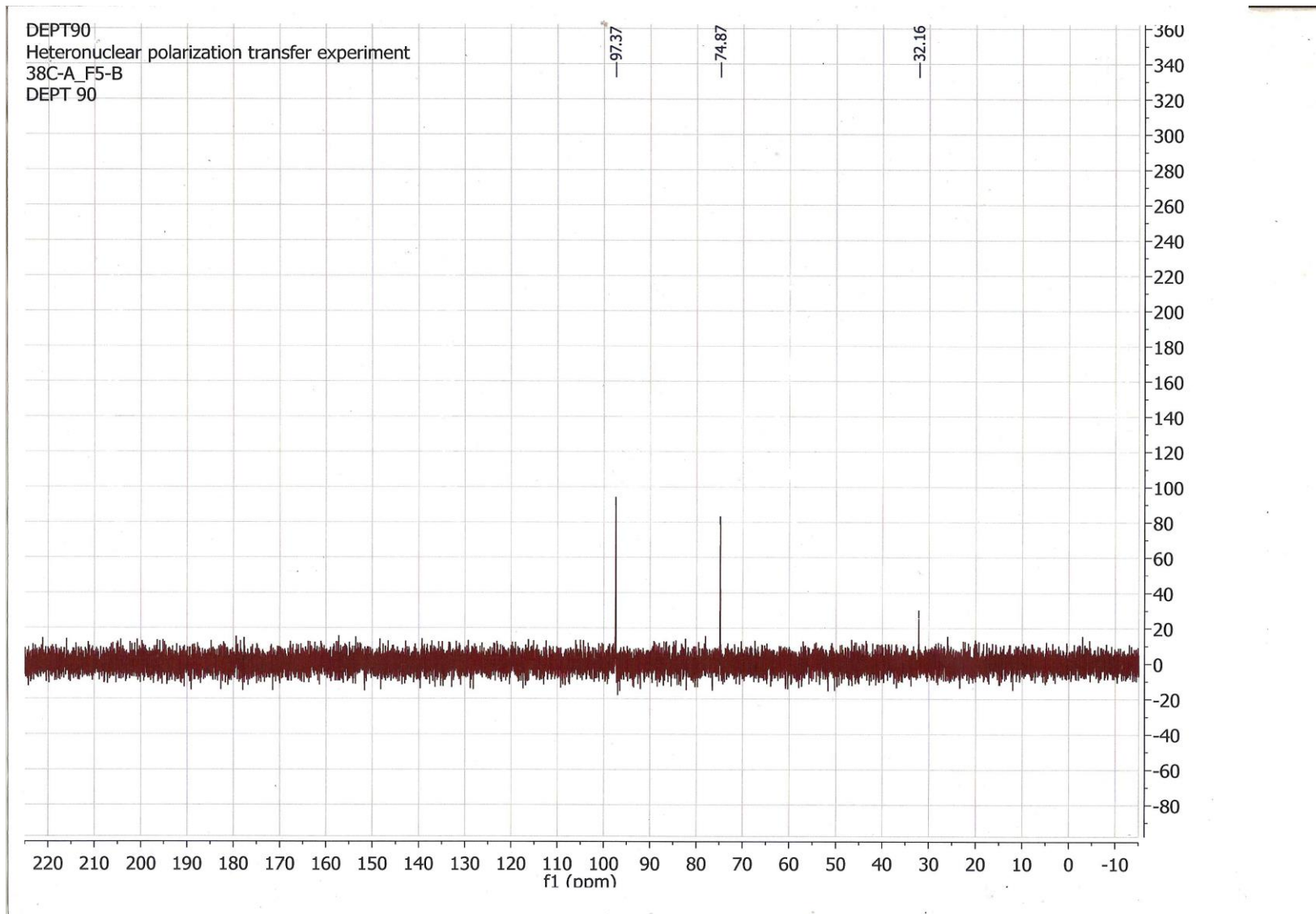
Anexo 13. Análise de espectro de massa em CL-EM, com sinais do polo positivo - fração F5-A do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



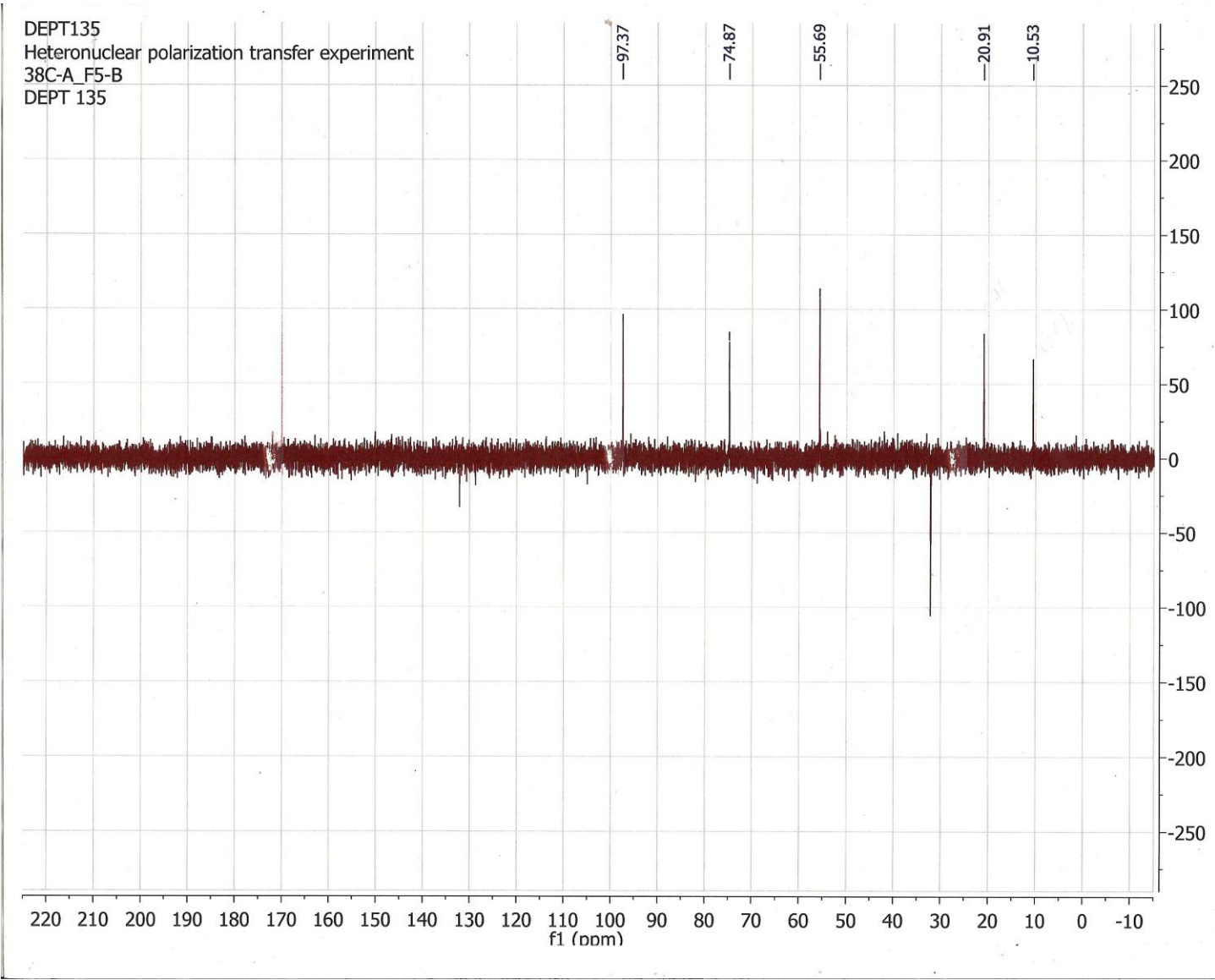
Anexo14. Espectro de RMN ^1H [600 MHz, CDCl_3] da fração F5-B do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



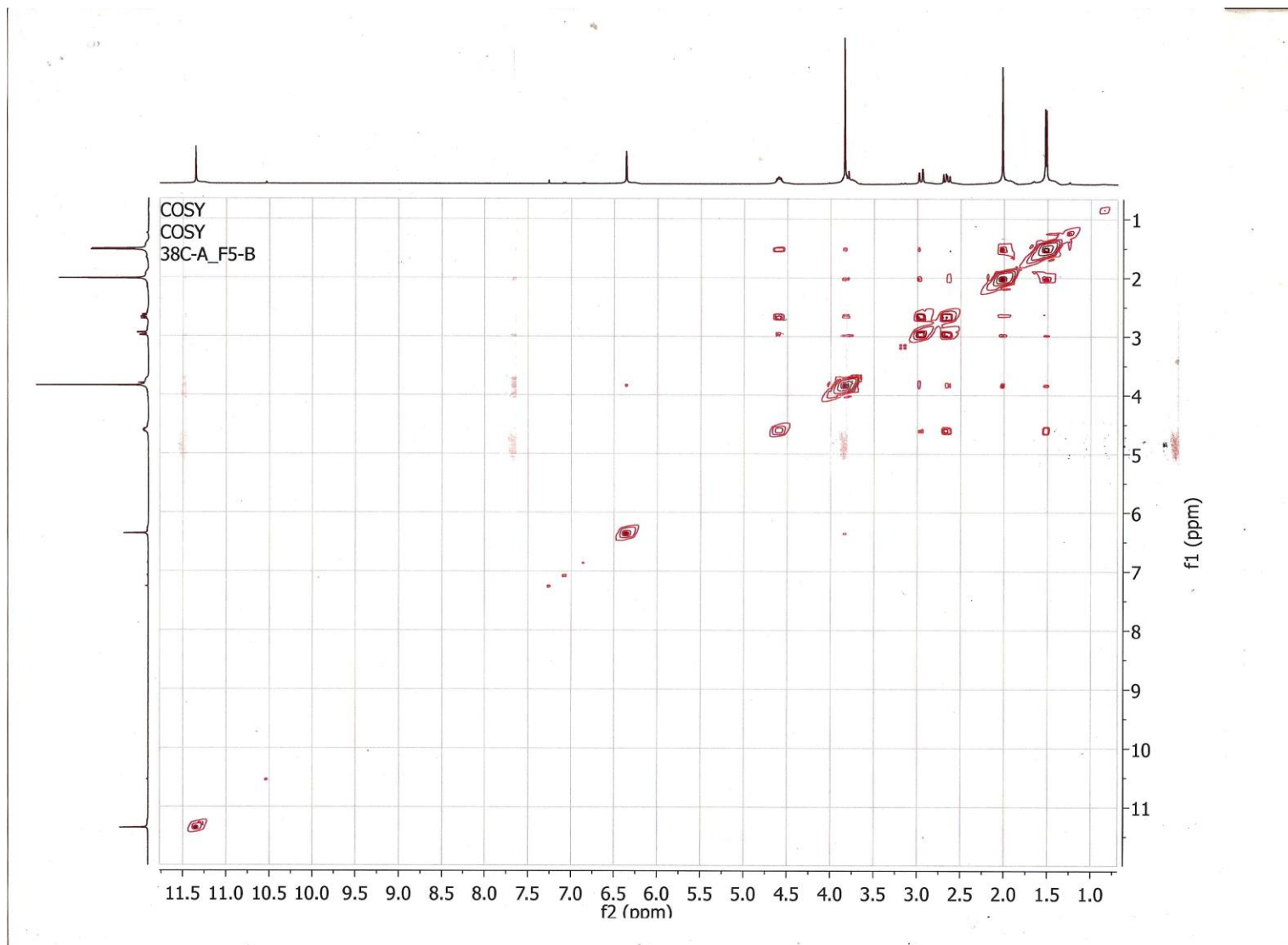
Anexo15. Espectro de RMN ^{13}C [600 MHz, CDCl_3] da fração F5-B do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



Anexo 16. Espectro de Espectro DEP 90° da fração F5-B do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA



Anexo 17. Espectro de Espectro DEP 135° da fração F5-B do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA



Anexo 18. Espectro de COSY da fração F5-B do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA

Data: F5-B POS
 Sample Name:
 Description:
 Ionization Mode: ESI+

History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area], Correct Base []]; Correct Base [5.0%]; Average (MS [1] 0.48..0.55)

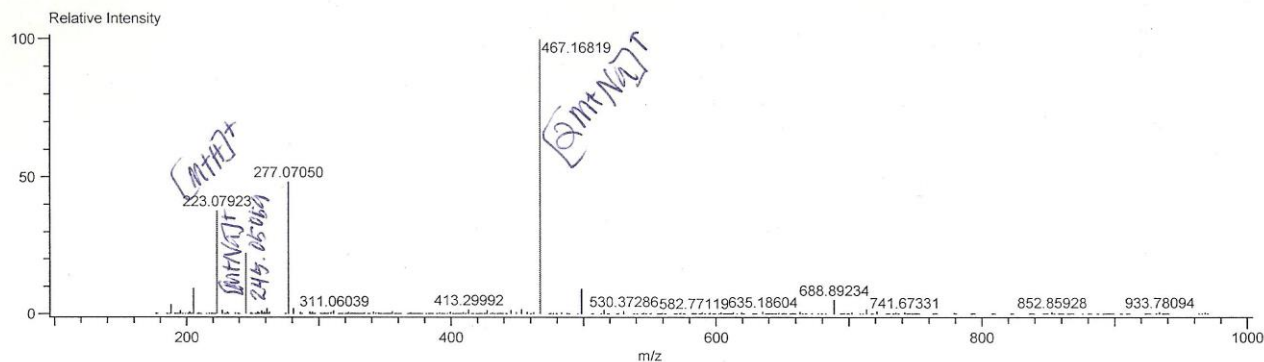
Acquired: 3/4/2013 1:37:42 PM
 Operator: AccuTOF
 Mass Calibration data: trypPOS13
 Created: 3/4/2013 1:56:47 PM
 Created by: AccuTOF

Charge number: 1

Tolerance: 30.00 (mmu)

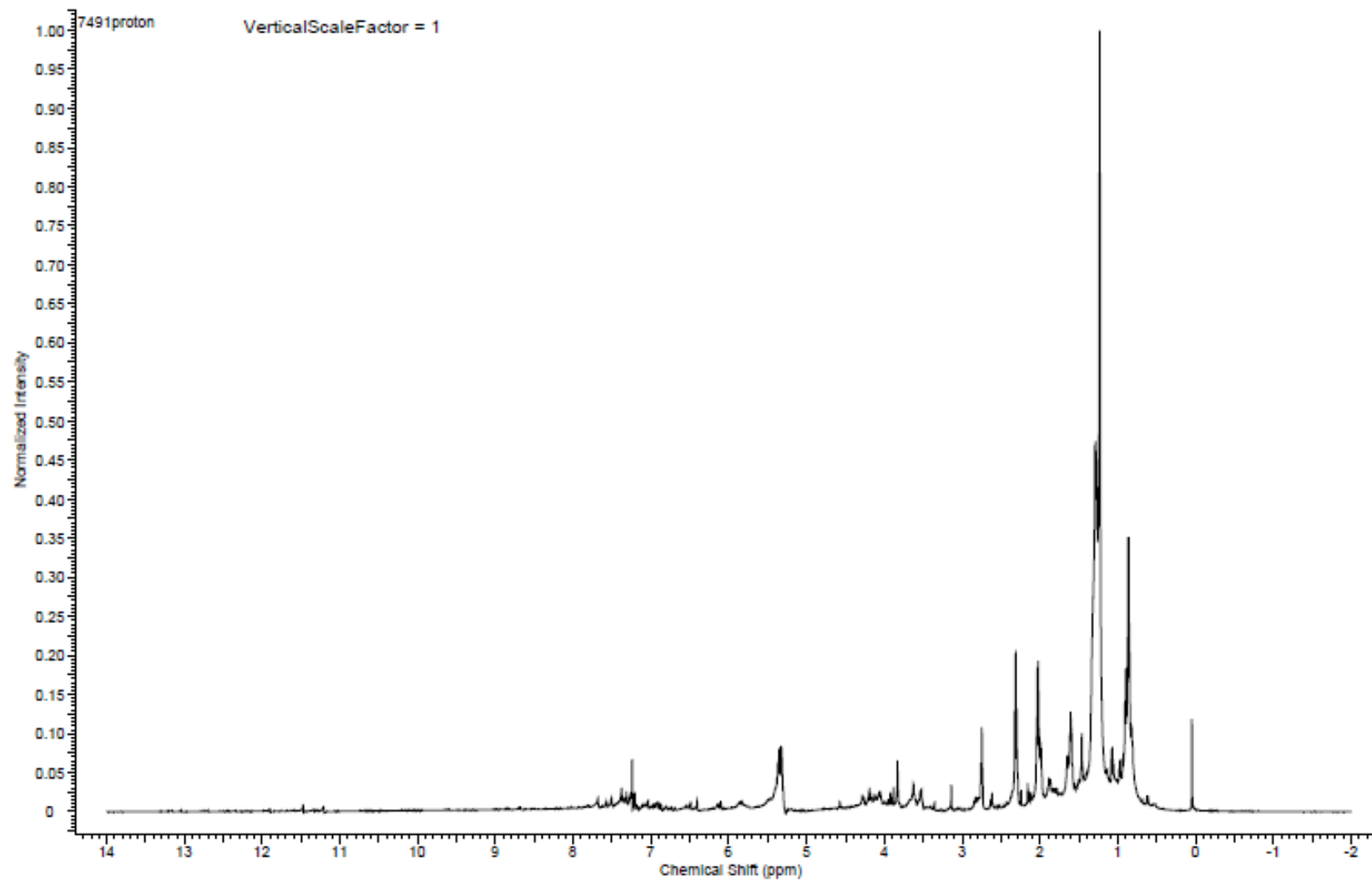
Unsaturation Number: -1.5 .. 20.0 (Fraction: Both)

Element: ¹²C: 10 .. 40, ¹H: 10 .. 50, ²³Na: 0 .. 1, ¹⁶O: 2 .. 10

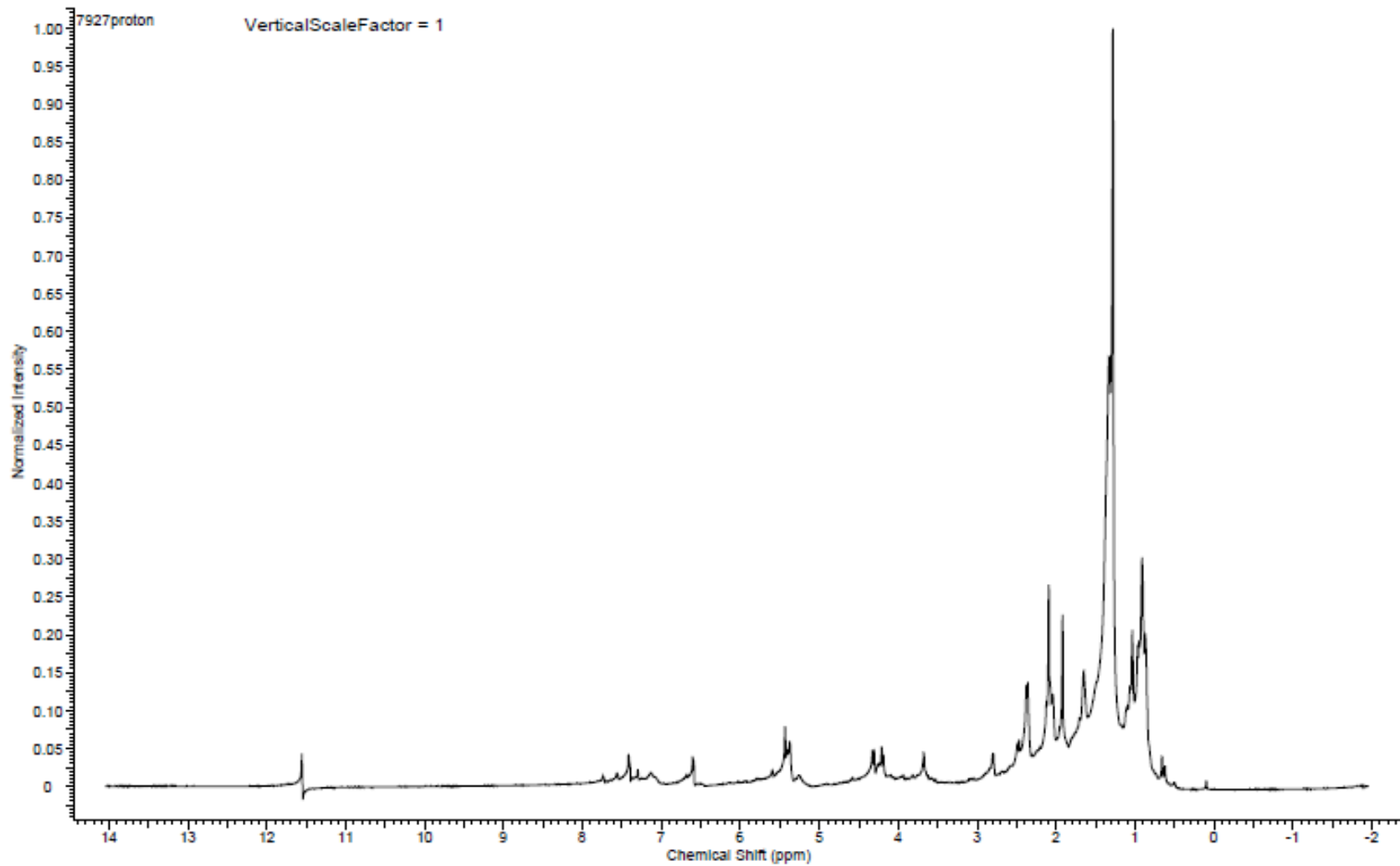


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
223.07923	1100262.24	223.07590	3.33	¹² C ₁₅ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₂	10.5
		223.07350	5.73	¹² C ₁₃ ¹ H ₁₂ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₂	7.5
		223.09463	-15.40	¹² C ₁₀ ¹ H ₁₆ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₄	2.5
		223.09703	-17.80	¹² C ₁₂ ¹ H ₁₅ ¹⁶ O ₄	5.5
		223.06065	18.58	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₁ ¹⁶ O ₅	6.5
245.05059	645661.82	245.05785	-7.26	¹² C ₁₅ ¹ H ₁₀ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₂	10.5
		245.04259	7.99	¹² C ₁₁ ¹ H ₁₀ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₅	6.5
		245.06613	-15.54	¹² C ₁₀ ¹ H ₁₃ ¹⁶ O ₇	4.5
		245.07898	-28.39	¹² C ₁₂ ¹ H ₁₄ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₄	5.5
467.16819	2937220.50	467.16819	0.00	¹² C ₂₄ ¹ H ₂₈ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₈	10.5
		467.17059	-2.40	¹² C ₂₆ ¹ H ₂₇ ¹⁶ O ₈	13.5
		467.16231	5.88	¹² C ₃₁ ¹ H ₂₄ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₃	19.5
		467.18344	-15.25	¹² C ₂₈ ¹ H ₂₈ ²³ Na ₁ ¹⁶ O ₅	14.5
		467.18585	-17.66	¹² C ₃₀ ¹ H ₂₇ ¹⁶ O ₅	17.5
		467.14946	18.73	¹² C ₂₉ ¹ H ₂₃ ¹⁶ O ₈	18.5

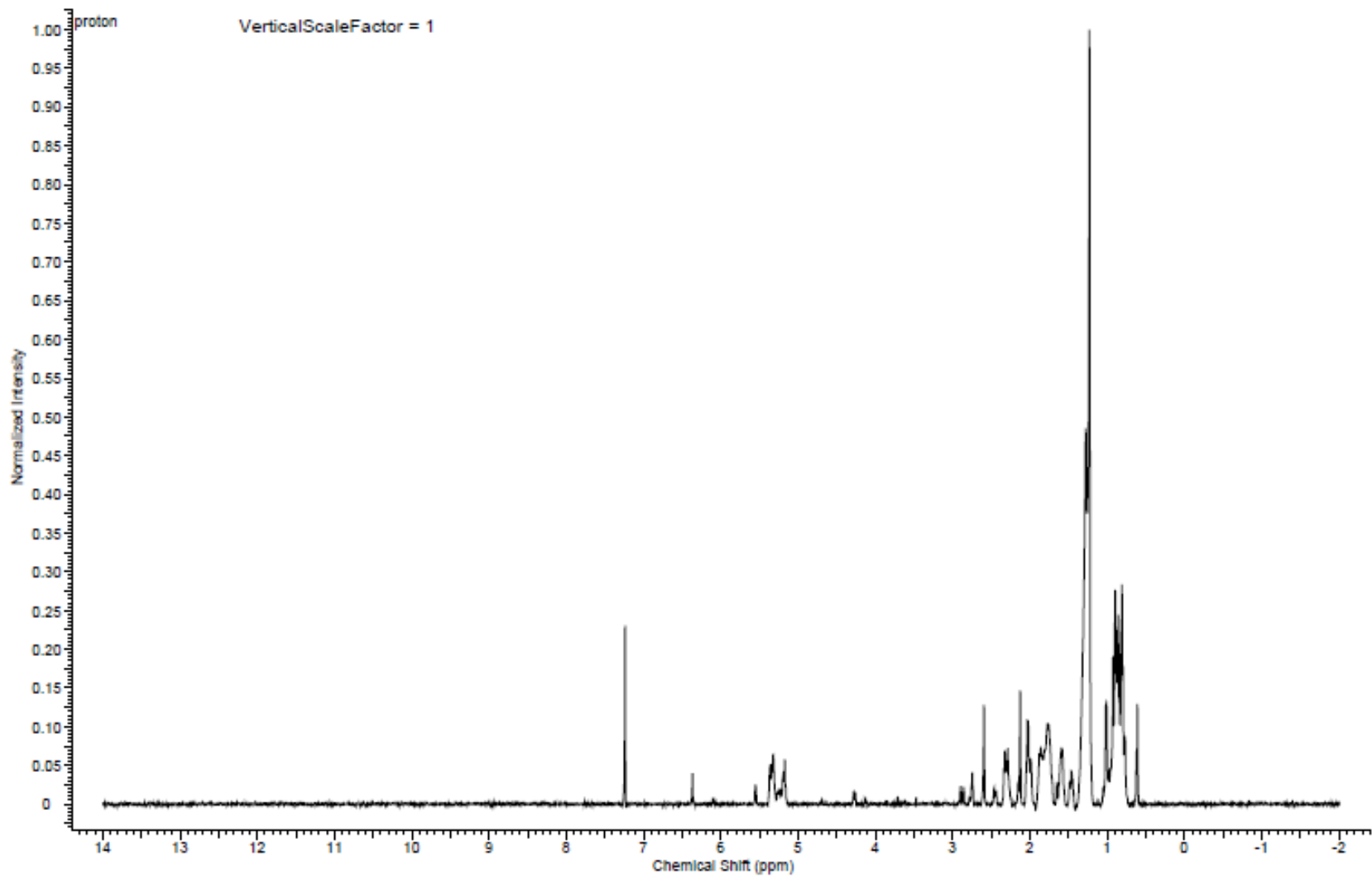
Anexo 19. Análise de espectro de massa em CL-EM, com sinais do polo positivo - fração F5-B do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.



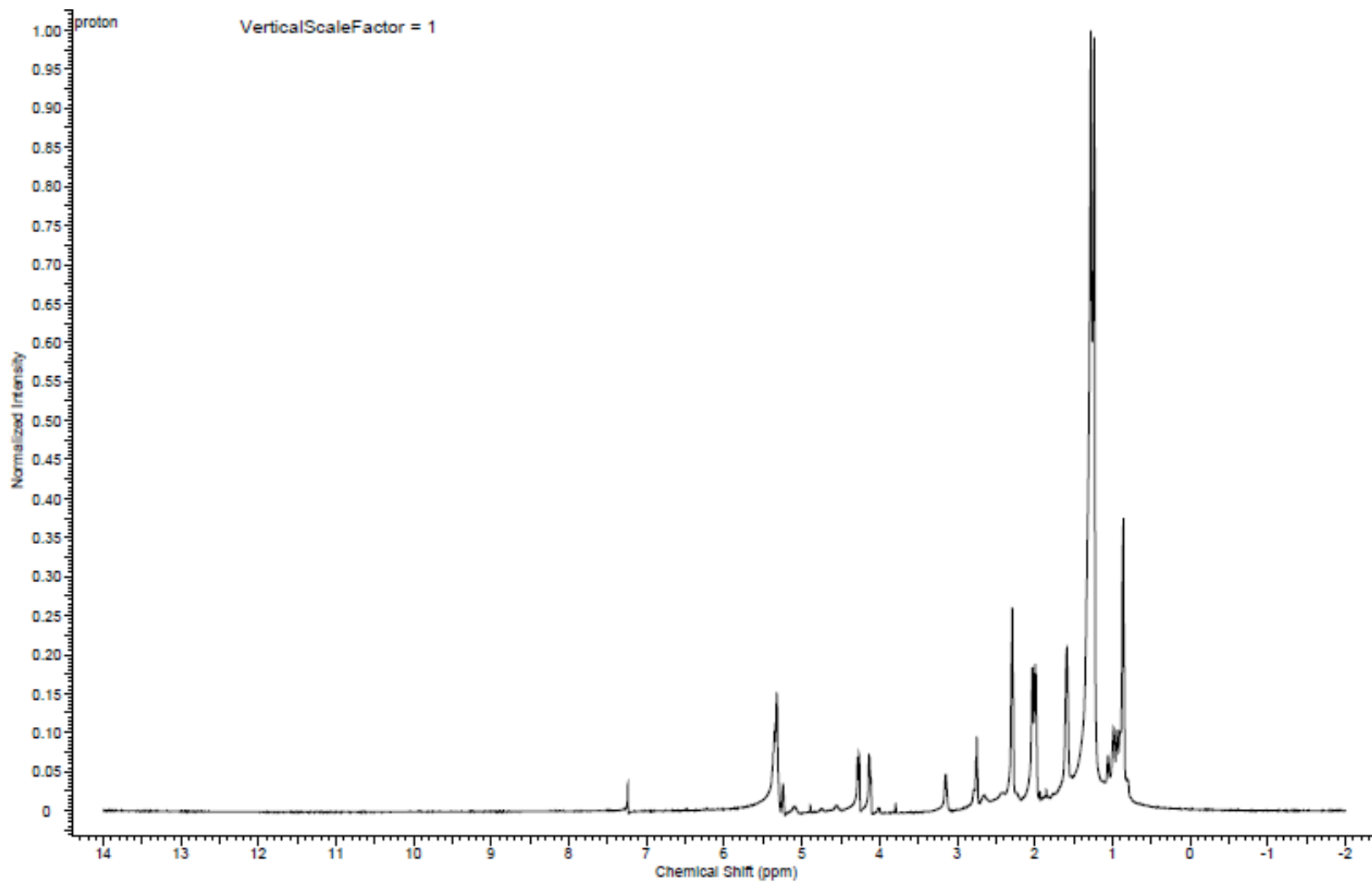
Anexo 20. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Alternaria daucifolii* UFMGCB 7491.



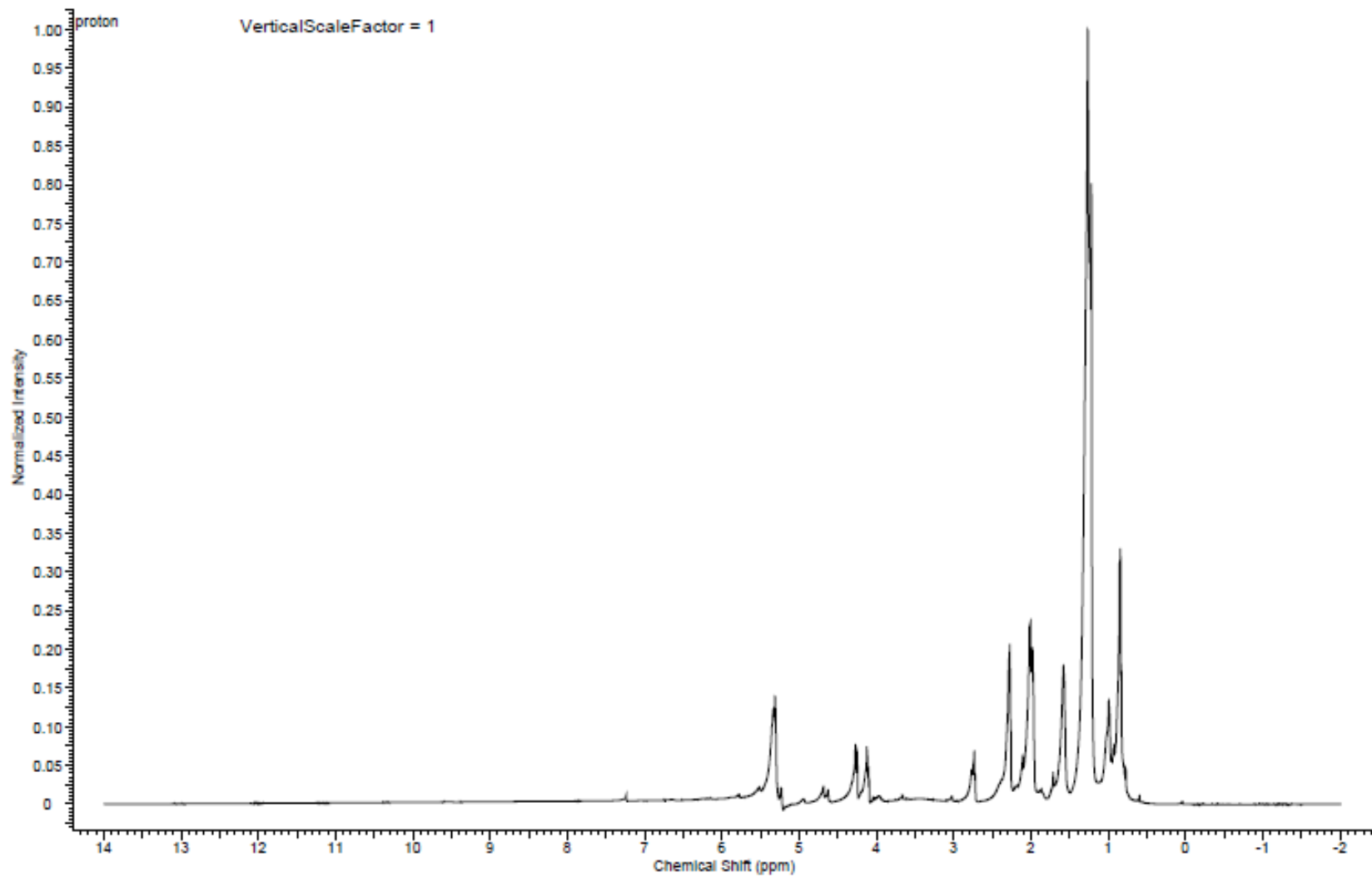
Anexo 21. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Diaporthe* sp. 7 UFMGCB 7927.



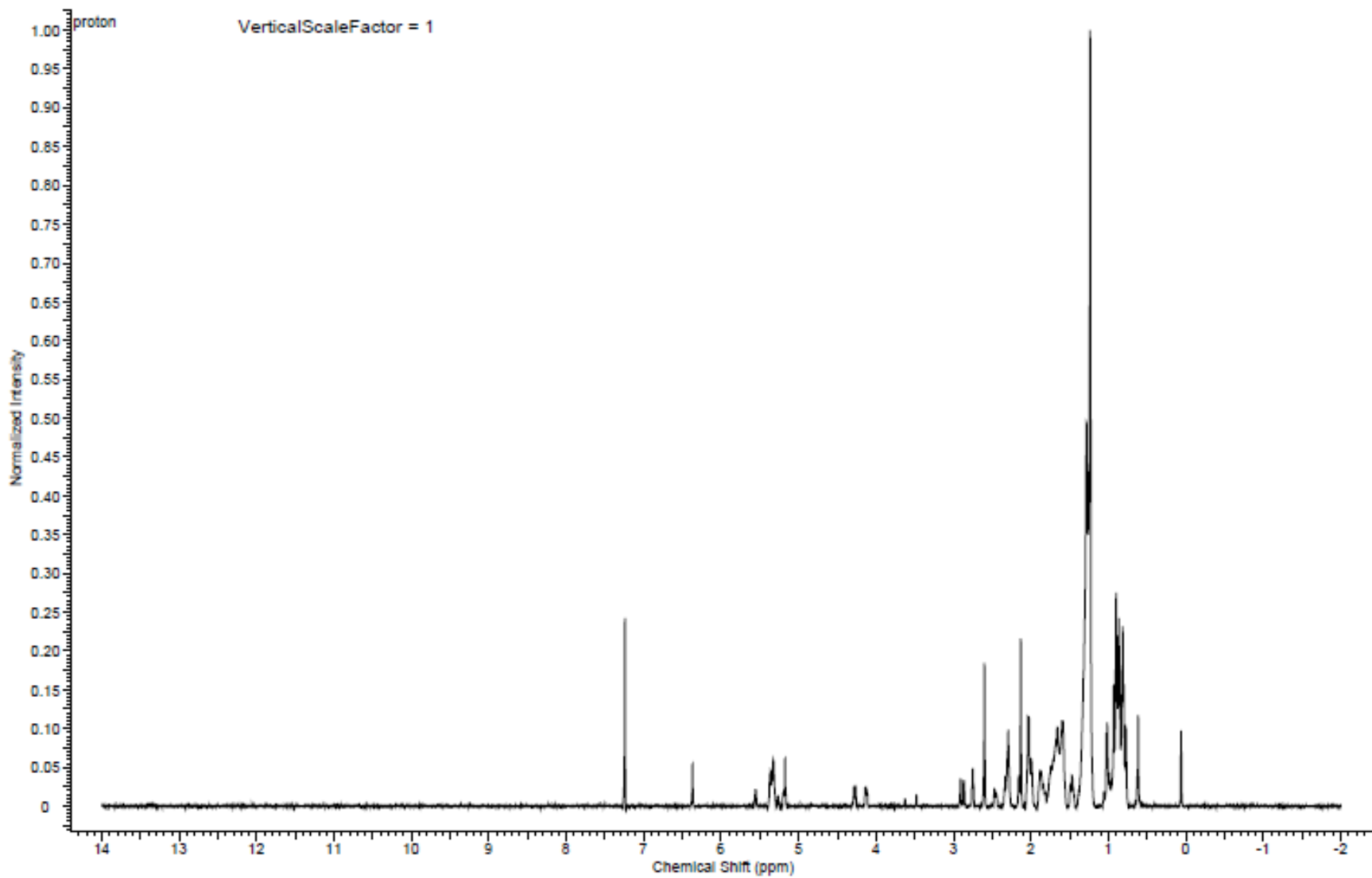
Anexo 22. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Colletotrichum* sp. 4 EPU8FB.



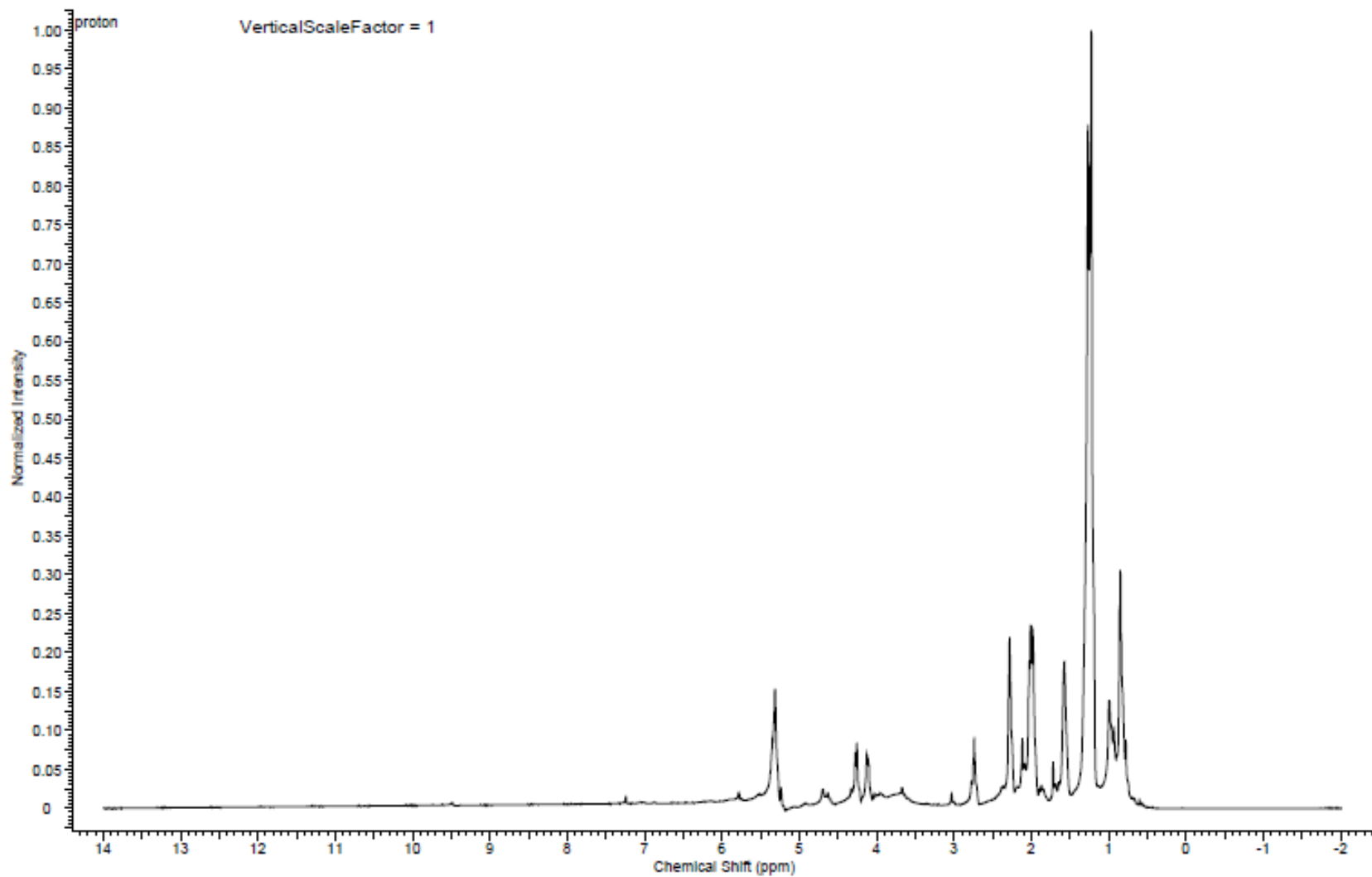
Anexo 23. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Fusarium* sp. EPU9CB.



Anexo 24. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Nigrospora oryzae* EPU13CA.

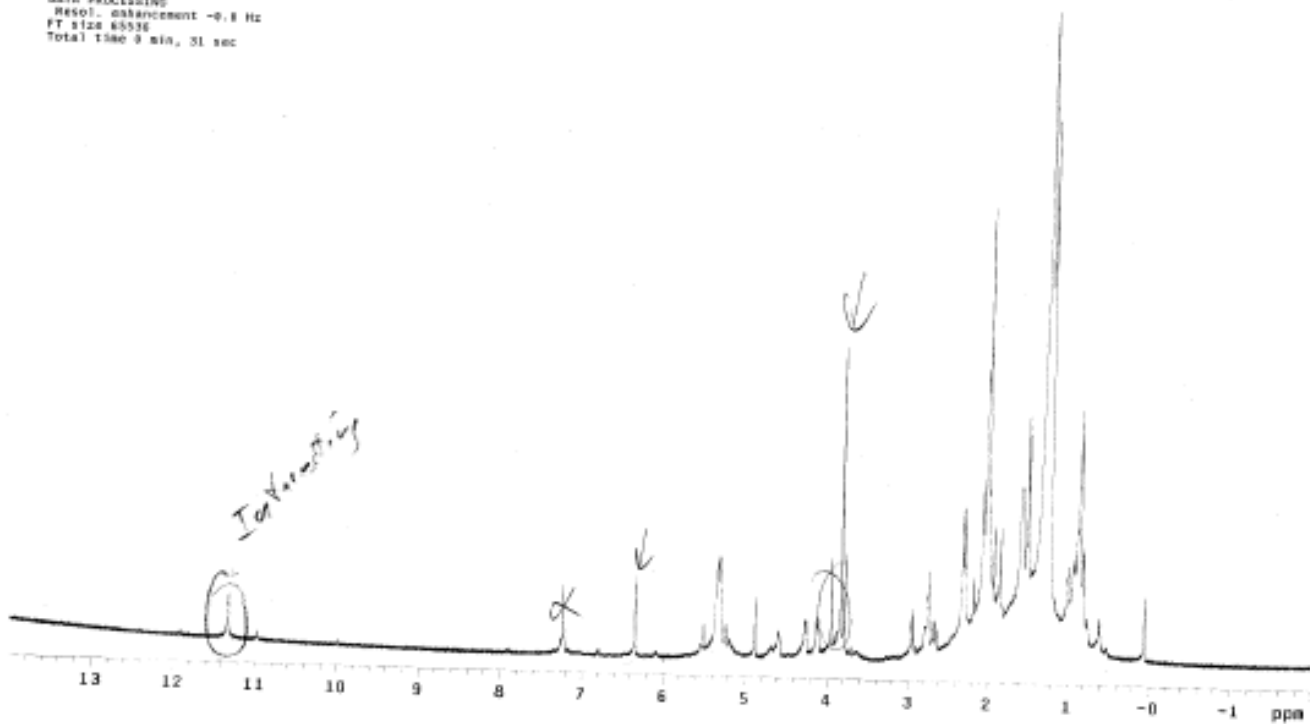


Anexo 25. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Colletotrichum* sp. 4 EPU30CA.

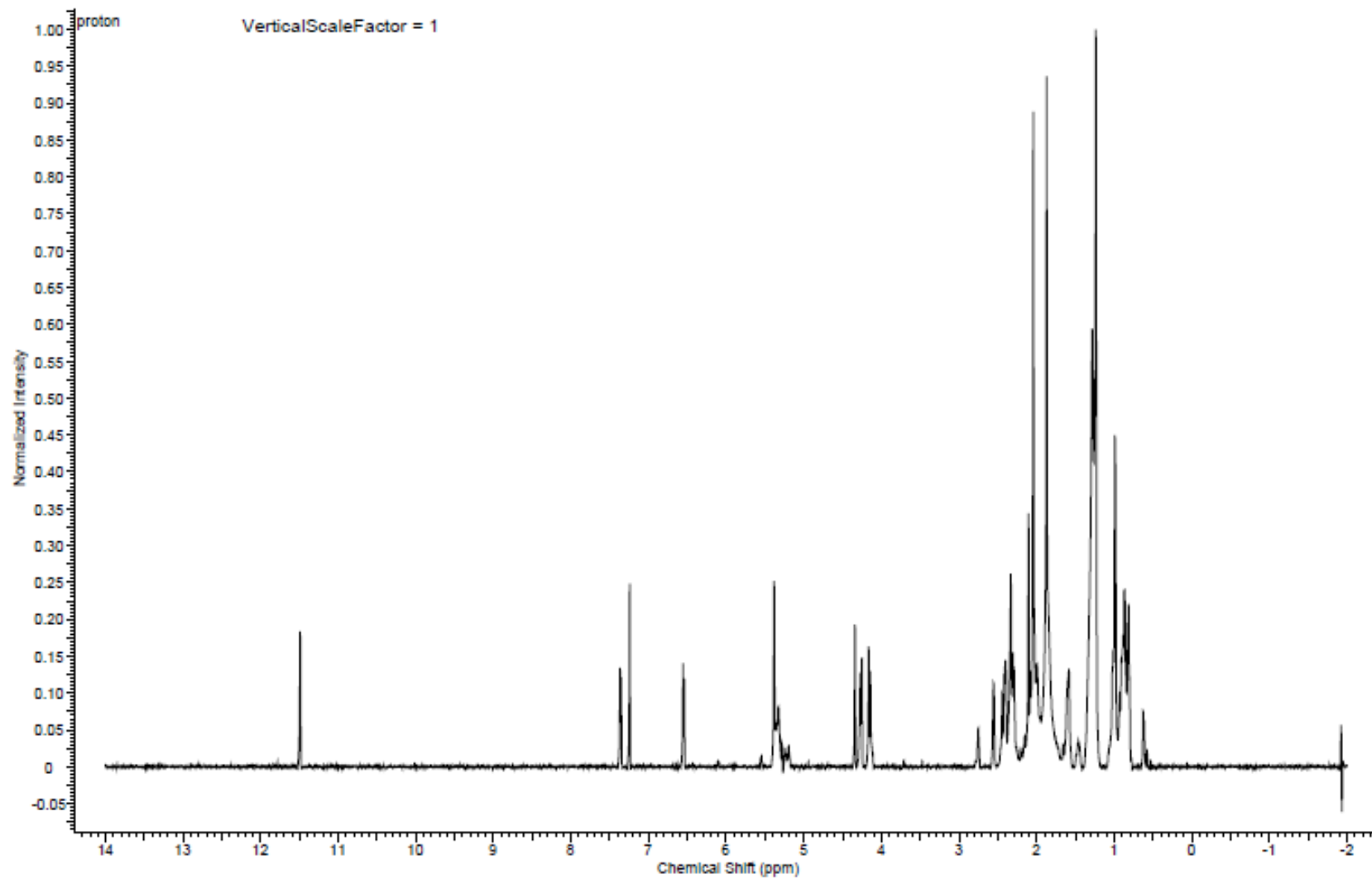


Anexo 26. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Fusarium sporotrichioides* EPU36CA.

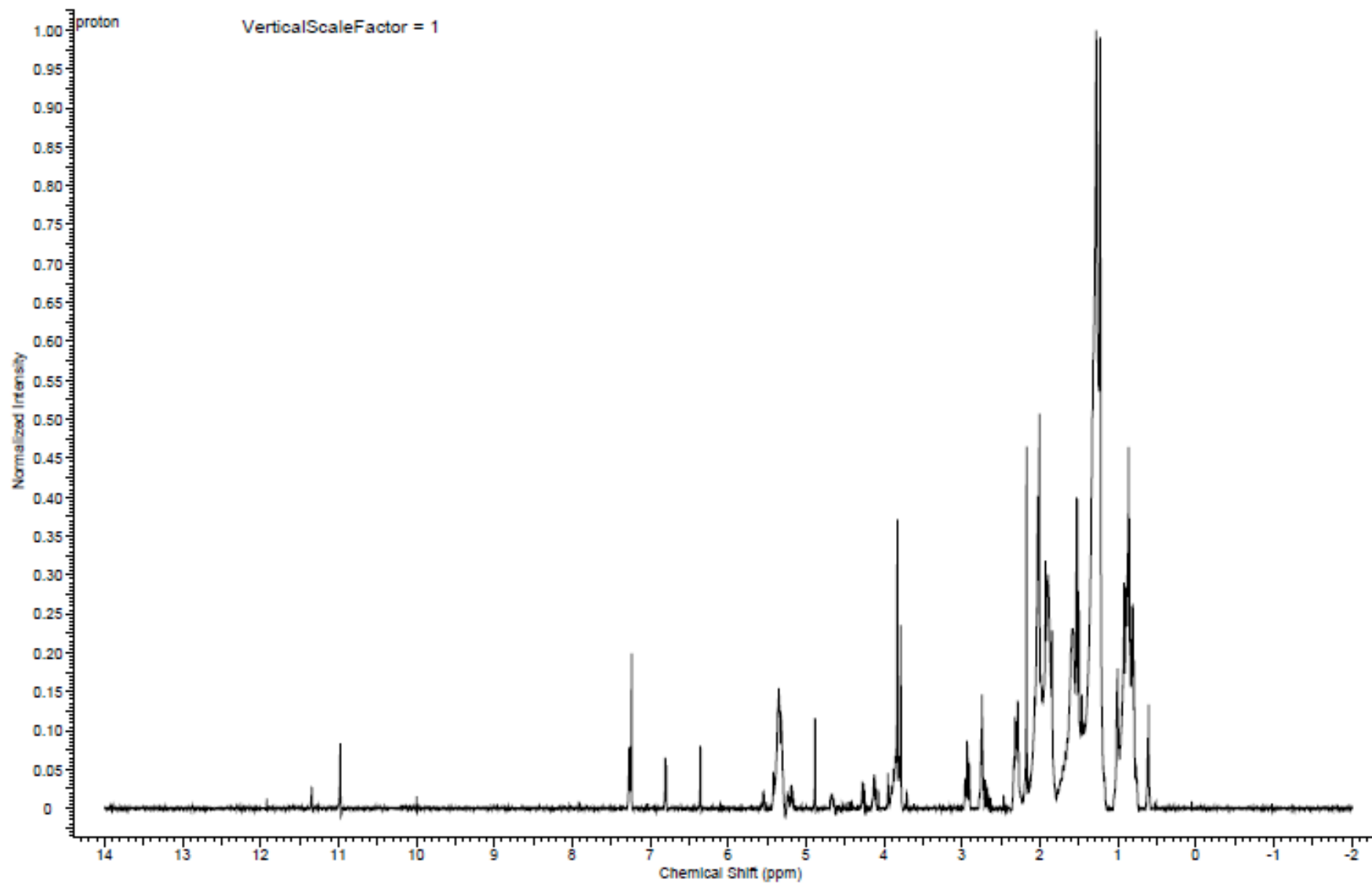
EPU40CE
Sample: EPU40CE
File: sp
Pulse Sequence: szpul
Solvent: cdcl3
Temp: 25.8 C / 298.1 K
Operator: Cantrell
INOVA-600 "Varian-wwr"
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.8 degrees
Acq. Time 2.043 sec
Width 8900.1 Hz
6 repetitions
OBSERVE H1, 599.803255 MHz
DATA PROCESSING
Resol. enhancement -0.8 Hz
FT size 65536
Total Time 9 min, 31 sec



Anexo 27. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Sordariomyces* sp. 2 EPU40CE.



Anexo 28. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Diaporthe cupattea* EPU24CA.



Anexo 29. Espectro de RMN de ^1H [600 MHz, CDCl_3] do extrato *Biscogniauxia mediterranea* EPU38CA.