

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
PPGBIOTEC

---

Dissertação

---

**Bioprospecção de  
metabólitos secundários  
bioativos produzidos por  
fungos endofíticos  
associados à Piper sp.  
coletada no Parque Estadual  
do Rio Doce, Minas Gerais**

*Raissa Hellen da Silva Florindo*

Ouro Preto  
2019



**UFOP**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**RAISSA HELLEN DA SILVA FLORINDO**

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS  
PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Piper* sp.  
COLETADA NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia aplicada à Saúde Humana e animal.

OURO PRETO  
MINAS GERAIS – BRASIL  
MARÇO DE 2019

F632b

Florindo, Raissa Hellen da Silva.

Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à Piper sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais [manuscrito] / Raissa Hellen da Silva Florindo. - 2019. 109f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Costa Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Fungos. 2. Metabólitos. 3. Herbicidas. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Ferreira, Mariana Costa. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 606:61



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 13 dias do mês de março do ano de 2019, às 14:00 horas, nas dependências do Centro de Educação a Distância (Cead), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Raissa Hellen da Silva Florindo, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Presidente - Externo), pela Profa. Dra. Betania Barros Cota (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Raissa Hellen da Silva Florindo 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Bioprospecção de Fungos Endofíticos Associados a Piper Sp. no Parque Estadual do Rio Doce", na área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Betania Barros Cota; segundo, Profa. Silvana de Queiroz Silva; terceiro, Prof. Luiz Henrique Rosa. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 13 de março de 2019.

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Presidente

Profa. Dra. Betania Barros Cota

Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Mestranda

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso!  
Não se apavore e nem desamine, pois o Senhor, o seu Deus,  
Estará com você por onde você andar.” Josué 1:9

## COLABORAÇÕES

Dr. Carlos Leomar Zani

Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Germano de Oliveira

Dr<sup>a</sup>. Isabela Ceravolo

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Pereira

Dra. Silvane Murta

Dr. Policarpo Ademar Sales Junior

Instituto René Rachou – FIOCRUZ/MG (BH)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer a Deus e à Nossa Senhora pela graça, amor, paciência e sabedoria com que me abençoaram durante toda minha vida.

A minha família, meu porto seguro, que me apoiaram nessa etapa. Aos demais familiares que de alguma forma contribuíram e se alegraram com essa conquista, meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr<sup>o</sup>. Luiz Henrique Rosa por ter aberto às portas de seu laboratório, pela orientação e confiança. Por ter me proporcionando tantos aprendizados na área profissional.

A Mariana Ferreira minha co-orientadora. Não tenho palavras para agradecer o que você fez por mim nestes dois anos. Você foi fundamental nesta caminhada, obrigada pelos ensinamentos, pelo seu tempo e, principalmente, por sua paciência. Devo muito a você.

Ao técnico do Laboratório de Bioquímica e Imunologia, Jamil Silvano de Oliveira, que foi essencial na etapa de secagem dos extratos. Aos técnicos e pesquisadores do Instituto René Rachou – FIOCRUZ/MG (BH) por toda ajuda e por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos. Em especial, Dr. Carlos Zani, Daniela Naback, Fátima Marques, Alisson Caldeira e Emerson de Castro.

A Jéssica e Débora por terem sido companheiras e amigas durante todo esse tempo. Com vocês as coisas ficaram mais leves.

Meu muito obrigada, a Lívia, Mayara, Tamar, Marina, Graciéle, Soraya e Eldon. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e amizade. Vocês foram essenciais. A todas as pessoas que me ajudaram no ensaio herbicida. Vocês foram demais, quantas histórias compartilhadas no fluxo.

Às minhas *roommates*, Míriam e Jôzieli, minhas terapeutas. Obrigada pelo companheirismo, acolhimento, amizade, risadas, por escutarem meus desabafos. Independente do caminho, que seguirmos, vou levar vocês sempre comigo.

A todos os colegas do LabFungos, pelas amizades feitas. Em especial a Flávia, uma amizade que começou com um quase acidente na câmara fria.

A CAPES, pelo apoio financeiro que possibilitou meus estudos e pesquisas.

Por fim, pessoas que aqui não citei e que me ajudaram a vencer essa etapa de minha, meu muito obrigada!

## Sumário

<b>Lista de abreviações, símbolos e siglas.....</b>	<b>10</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>13</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>14</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>15</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO, RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
2.1 Micro-organismos endofíticos .....	23
2.2 Fungos endofíticos e suas interações com as plantas hospedeiras.....	24
2.3 Diversidade de fungos endofíticos.....	29
2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos .....	31
2.5 Doenças tropicais negligenciadas .....	34
2.6 Agrotóxicos.....	35
2.7 <i>Piper</i> sp. ....	37
<b>3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO .....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivo geral .....	38
3.2 Objetivos específicos .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 Área de coleta .....	39
4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos .....	40
4.3 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos.....	41
4.3.1 Fungos filamentosos.....	41
4.3.2 Extrato da planta.....	41
4.4 Ensaio biológicos .....	42
4.4.1 Herbicida .....	42
4.4.2 Avaliação da atividade antiviral dos extratos vegetais e fúngicos contra <i>Dengue Virus</i> .....	42
4.4.3 Ensaio <i>in vitro</i> com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	45
4.4.4 Ensaio <i>in vitro</i> com a forma amastigota-like de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .....	46
4.4.5 Ensaio contra o parasita <i>Plasmodium falciparum</i> .....	46
4.5 Identificação dos fungos endofíticos bioativos.....	47
4.5.1 Extração do DNA total.....	47



4.5.3 Amplificação da região ITS .....	49
4.5.4 Amplificação do gene da $\beta$ -tubulina .....	49
4.5.5 Purificação dos amplicons.....	50
4.5.6 Reações de Sequenciamento .....	50
4.5.7 Análise computacional das sequências .....	51
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos .....	52
5.2 Ensaio biológicos .....	53
5.2.1 Determinação da atividade herbicida .....	62
5.2.2 Determinação da atividade antiviral.....	63
5.2.3 Determinação da atividade tripanosomicida .....	64
5.2.4 Determinação da atividade leishmanicida.....	65
5.2.5 Atividade antimalárica .....	66
5.3 Identificação dos fungos endofíticos biologicamente ativos .....	67
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>100</b>

## Lista de abreviações, símbolos e siglas

°C: Graus Celsius

%: Por cento

µg/mL: micrograma por mililitro

µL: Microlitro

µM: Micromolar

a.C: Antes de Cristo

ABS: Absorbância

BDA: Ágar Batata Dextrosado

BHK-21: Células do rim de hamster bebês

BLASTn: *Basic Local Alignment Search Tool*

CC<sub>50</sub>: Concentração Citotóxica 50

CE<sub>50</sub>: Concentração efetiva 50

DENV-2: Dengue Vírus Sorotipo 2

DENV-NS5: Dengue Vírus com Proteína Não Estrutural 5

DMEM: Meio de Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsufóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNTs: Doenças Tropicais Negligenciadas

DO<sub>540</sub>: Densidade Óptica a 540 nm

ECP: Efeito citopático

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acética

FDA: *Food and Drug Administration*

HSV-1: Herpes Simplex Vírus tipo 1

IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitória de 50%

IR: Índice de Resposta

IRR/FIOCRUZ: Instituto René Rachou/ Fundação Oswaldo Cruz

IS: Índice de Seletividade

ITS: Região Transcrita Interna

ITS1-5.8S-ITS2: Região Transcrita Interna do Gene do rRNA

LPCM: Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular

km: Quilômetro

km<sup>2</sup>: Quilômetro quadrado

m: Metro

mg/mL: Miligrama por mililitro

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

m.o.i: Multiplicidade de infecção

ng/μL: Nanograma por microlitro

nM: Nanomolar

M: Molar

MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

OMS: Organização Mundial da Saúde

p/v: Peso por volume

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PERD: Parque Estadual do Rio Doce

pH: Potencial Hidrogeniônico

ppm: Partes por Milhão

pmol: Picomol

rDNA: Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal

rpm: Rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal

SFB: Soro Fetal Bovino

TBE: Tris borato

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

V: Volts

v/v: Volume por volume

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Os micro-organismos endofíticos são estudados com o objetivo de entender a interação simbiótica deles com a planta hospedeira e de bioprospecção dos metabólitos por eles produzidos. FONTE: Wani et al. (2015). .....	20
<b>Figura 2.</b> Hipótese do antagonismo balanceado proposto por Schulz et al. (2015). .....	26
<b>Figura 3.</b> Interação interespecífica entre micro-organismos dentro de uma planta hospedeira. (A) Interação fungo-fungo; (B) interação fungo-bactéria endosimbiótica; (C) Interação fungo-bactéria. Fonte: Kusari et al. (2012). .....	28
<b>Figura 4.</b> Consumo de agrotóxicos e afins de 2000 a 2017. FONTE: Ibama (2018). .....	36
<b>Figura 5.</b> Parque Estadual do Rio Doce: (a) Localização no Estado de Minas Gerais; (b) Área do PERD. FONTE: Instituto Estadual de Florestas.....	39
<b>Figura 6.</b> Espécime de Piper sp. coletado no PERD. FONTE: Próprio autor. ....	40
<b>Figura 7.</b> Estrutura química da Piperovatina. FONTE: Marques et al. (2017).....	52
<b>Figura 8.</b> Quantidade de isolados que apresentaram potenciais atividades biológicas. ....	54

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Espécimes de <i>Piper</i> sp. amostrados nas trilhas Vinhático e Campolina. ....	40
<b>Tabela 2.</b> Numero de isolados nas trilhas Campolina e Vinhático e a quantidade de fungos endofíticos isolados por tecido/órgão. ....	53
<b>Tabela 3.</b> Atividades biológicas dos extratos brutos vegetais e extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados a <i>Piper</i> sp. ....	55
<b>Tabela 4.</b> Identificação molecular dos fungos endofíticos produtores de metabólitos bioativos associados à <i>Piper</i> sp. ....	69

## Resumo

Metabólitos secundários, moléculas estruturalmente heterogêneas e de baixa massa molecular produzidas por organismos vivos, se destacam pelo seu potencial como protótipos uteis no desenvolvimento de novos fármacos. Os fungos endofíticos, aqueles que residem  
5 assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida, apresentam-se como potenciais produtores de diversos metabólitos bioativos que podem ser utilizados como agentes terapêuticos no tratamento de diversas doenças. A escolha da planta hospedeira a ser utilizada para a obtenção dos fungos endofíticos é importante e dentre os critérios, destacam-se plantas medicinais e plantas que ocorrem em regiões de  
10 grande biodiversidade. Plantas da família *Piperaceae* estão distribuídas nos hemisférios Sul e Norte e são utilizadas de várias maneiras, sendo conhecidas por produzirem grande diversidade de metabólitos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da comunidade de fungos endofíticos associada a *Piper* sp., coletadas no maior fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais (Parque Estadual do Rio Doce), como  
15 fonte de metabólitos ativos contra doenças negligenciadas e possíveis herbicidas. Este é o primeiro estudo sobre fungos endofíticos associados a este gênero. A partir dos caules, das folhas e das raízes foram obtidos 540 fungos filamentosos. Para a determinação do potencial biotecnológico dos fungos e de sua planta hospedeira, foram produzidos extratos etanólicos. Estes extratos foram testados para atividades antiparasitárias, antiviral e herbicida. Dentre os  
20 extratos fúngicos avaliados, 149 extratos apresentaram atividade herbicida (28%), 30 extratos apresentaram atividade antiviral contra o vírus DENV-2 (8%), 11 contra o parasita *Trypanosoma cruzi* (3%), 5 frente a *Leishmania amazonensis* (1%) e 44 com atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* (25%). Os extratos vegetais da folha e do caule apresentaram atividade herbicida, não sendo ativos para os outros ensaios. Dos 107 isolados  
25 fúngicos, que apresentaram atividades biológicas promissoras, foi possível identificar 39, todos pertencentes ao filo *Ascomycota*, representados, em sua maioria, pelos gêneros *Fusarium* (5 isolados), *Diaporthe* (5 isolados), *Colletotrichum* (4 isolados) e *Lasiodiplodia* (4 isolados). Ainda, 13 isolados foram identificados em nível de ordem, família ou filo e 8 ocorreram como singletos. Neste trabalho, o isolado *Fusarium* sp. UFMGCB 15603  
30 apresentou atividade antiviral contra DENV-2, sendo o primeiro relato desta atividade em fungos endofíticos deste gênero. O presente trabalho também relatou pela primeira vez atividade herbicida relacionada aos gêneros *Muscodor* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Neopestalotiopsis* sp. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que *Piper* sp. representa um

promissor reservatório de fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários bioativos, os quais podem ser utilizados em estudos de seus metabólitos bioativos como protótipos úteis para o desenvolvimento de novos fármacos e herbicidas.

**Palavras-chave:** fungos endofíticos, *Piper* sp., metabólitos secundários, doenças negligenciadas, herbicida.



## Abstract

Secondary metabolites, structurally heterogeneous molecules and low molecular mass produced by living organisms, stand out for their potential as useful prototypes in the development of new drugs. Endophytic fungi, those residing asymptotically within plant tissues for at least one period of their life cycle, are potential producers of various bioactive metabolites that can be used as therapeutic agents in the treatment of various diseases. The choice of the host plant to be used to obtain the endophytic fungi is important and among the criteria, stand out medicinal plants and plants that occur in regions of great biodiversity. Plants of the family *Piperaceae* are distributed in the South and North hemispheres and are used in several ways, being known to produce a great diversity of metabolites. The objective of this study was to evaluate the potential of the community of endophytic fungi associated with *Piper* sp., collected in the largest Atlantic Forest fragment in the State of Minas Gerais (Rio Doce State Park), as a source of active metabolites against diseases neglected and possible herbicides. This is the first study on endophytic fungi associated with this genus. From the stems, leaves and roots 540 filamentous fungi were obtained. For the determination of the biotechnological potential of the fungi and their host plant, ethanolic extracts were produced. These extracts were tested for antiparasitic, antiviral and herbicidal activities. Among the extracts evaluated, 149 extracts presented herbicidal activity (28%), 30 extracts presented antiviral activity against DENV-2 (8%), 11 against *Trypanosoma cruzi* (3%), 5 against *Leishmania amazonensis* (1%) and 11 with antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* (25%). The leaf and stem extracts showed herbicidal activity and were not active for the other trials. Of the 107 fungal isolates, which showed promising biological activities, it was possible to identify 39, all belonging to the *Ascomycota* phylum, represented, for the most part, by the genera *Fusarium* (5 isolates), *Diaporthe* (5 isolates), *Colletotrichum* (4 isolates) and *Lasiodiplodia* 4 isolates). Still, 13 isolates were identified at the level of order, family or phylum and 8 occurred as singlets. In this work, the isolate *Fusarium* sp. UFMGCB 15603 presented antiviral activity against DENV-2, being the first report of this activity in endophytic fungi of this genus. The present work also reported for the first-time herbicidal activity related to the genus *Muscodor* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Neopestalotiopsis* sp. From the results obtained, it was verified that *Piper* sp. represents a promising reservoir of endophytic fungi producing bioactive secondary metabolites, which can be used in studies of their bioactive metabolites as prototypes useful for the development of new drugs and herbicides.

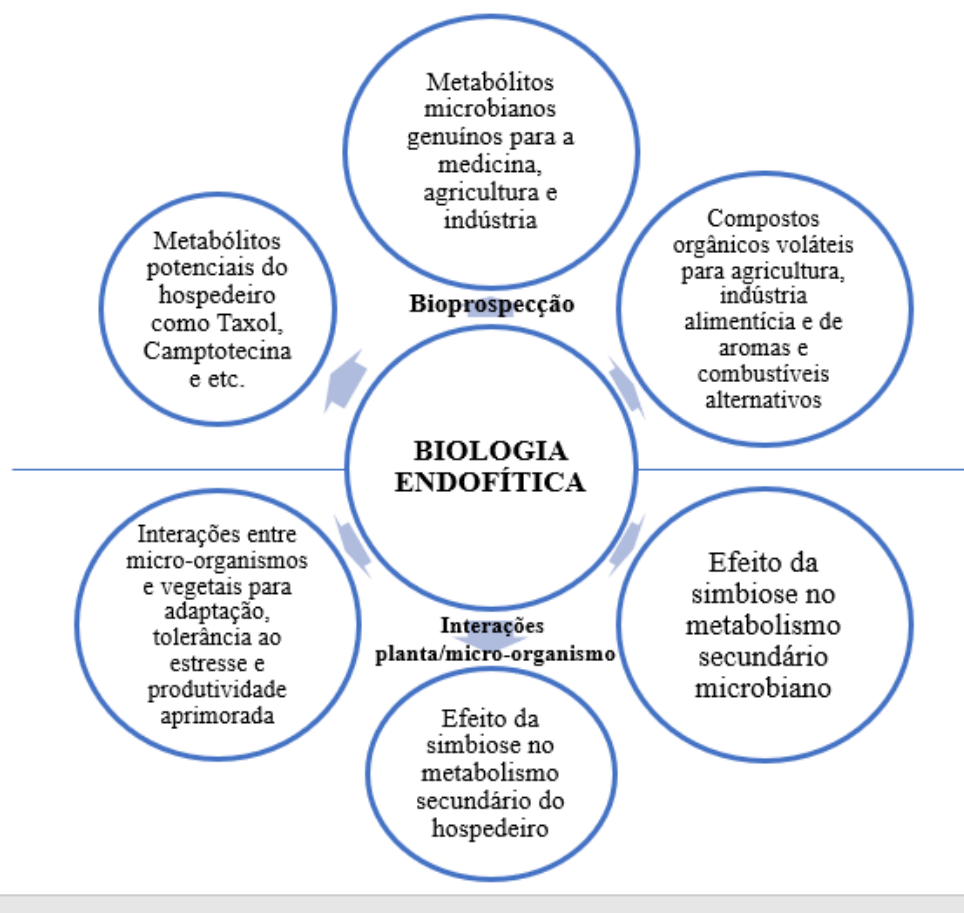
**Key words:** endophytic fungi, *Piper* sp., Secondary metabolites, Neglected Diseases, herbicide.

## 1. INTRODUÇÃO, RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Metabólitos secundários são moléculas estruturalmente heterogêneas de baixa massa molecular que, ao contrário dos metabólitos primários, não são diretamente necessários para garantir o desenvolvimento dos organismos que os produzem, os quais podem ser exclusivos de espécies ou gêneros e podem aumentar sua taxa de sobrevivência e tolerância aos diferentes tipos de estresses ambientais (Kennedy e Wightman, 2011). Os metabólitos secundários produzidos por organismos vivos vêm chamando atenção nos últimos anos pelo seu potencial uso como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, os quais são considerados vantajosos em relação aos produtos sintéticos, sendo um dos motivos, o fato de serem produzidos em sistemas vivos, potencializando sua interação com os receptores biológicos (Cecílio et al. 2012; Ganjhu et al. 2015).

Devido ao surgimento de doenças emergentes, o aumento de infecções microbianas e a resistência de micro-organismos às drogas atualmente utilizadas na clínica, a busca por novos fármacos naturais vem aumentando significativamente nos últimos anos. Dos 1.135 novos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) de 1981 a 2010, 50% eram de origem natural, índice que sobe constantemente desde a década de 1930 (David et al. 2015; Patridge et al. 2016).

Os micro-organismos endofíticos são estudados com dois objetivos principais: (i) bioprospecção dos metabólitos secundários e (ii) entendimento das interações planta-hospedeiro (**Figura 1**). Estudos de bioprospecção têm sido extensivamente revisados e levam em consideração que uma planta interage com diferentes micro-organismos, patógenos ou não, os quais são capazes de produzir metabólitos secundários de grande interesse, uma vez que, são importantes para o estabelecimento da interação planta hospedeira-micro-organismo endofítico (Wani et al. 2015).



**Figura 1.** Os micro-organismos endofíticos são estudados com o objetivo de entender a interação simbiótica deles com a planta hospedeira e de bioprospecção dos metabólitos por eles produzidos. FONTE: Wani et al. (2015).

5           Diferentes estudos demonstram que os tecidos vegetais representam um promissor reservatório de diversidade microbiana. Levando em consideração que existem cerca de 300 mil espécies de plantas em todo mundo e cada hospedeiro pode abrigar um ou mais micro-organismos endofíticos, tal fato torna os tecidos vegetais um ambiente/substrato propício à realização de estudos de biodiversidade e bioprospecção. Devido a interação entre o fungo endofítico e a planta hospedeira, os metabólitos secundários produzidos por eles têm sido

10           investigados. Tal interação é benéfica para ambos, uma vez que, os fungos endofíticos se beneficiam pela nutrição e pela proteção conferidos pelo hospedeiro e podem proporcionar às plantas tolerância ao estresse biótico (herbivoria, insetos e ataques de outros patógenos) e abiótico (radiação, seca, salinidade, metais pesados e outros) (Aly et al. 2011).

15           No atual panorama dos estudos de bioprospecção, os fungos endofíticos, aqueles que residem assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida, apresentam-se como potenciais produtores de diversos metabólitos

bioativos que podem ser utilizados como agentes terapêuticos no tratamento de diversas doenças. Atividades biológicas como antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas, entre outras tem sido amplamente descritas (Kusari et al. 2012; Kusari et al. 2014; Bano et al. 2016). Além disso, os metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos são  
5 considerados altamente diversificados pelo fato destes micro-organismos crescerem em ecossistemas únicos, com características ambientais diversas (Bhardwaj e Agrawal, 2014).

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DNTs) não recebem muita atenção da comunidade internacional, visto que, estas doenças atingem às populações com baixa renda e estão localizadas em regiões com condições ambientais e habitacionais precárias. Dessa  
10 forma, além do combate às desigualdades sociais, é necessário o investimento em pesquisas que contribuirão para o tratamento destas doenças e também para o controle dos patógenos e vetores (Oliveira, 2018).

Além disso, outros problemas como, por exemplo, o uso de agrotóxicos, vem sendo amplamente discutido. Desde 2003, quando o Brasil permitiu o uso de sementes transgênicas,  
15 o uso de agrotóxicos aumentou significativamente, contribuindo para que o país se tornasse um dos maiores consumidores destes produtos no mundo. Isso aconteceu, porque a maioria dessas sementes são tolerantes a herbicidas. Assim, a comunidade científica vem buscando alternativas para substituir os agrotóxicos, já que, eles afetam negativamente o meio ambiente e a saúde da população exposta a eles (Friedrich et al. 2018).

20 A família *Piperaceae*, uma das mais antigas famílias de angiospermas, é encontrada nas regiões tropicais e é composta por 4 gêneros: *Piper*, *Piperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia*, (Silva et al. 2018). Esta família é conhecida pela produção de substâncias naturais que possuem propriedades medicinais e são utilizadas como condimentos, alimentos, plantas ornamentais, inseticidas e alucinógenos (Almeda et al. 2015; Han et al. 2016).

25 Com o rompimento da barragem da mineradora Samarco, em Mariana, a margem do Rio Doce foi totalmente atingida. Assim, surgiu a necessidade de estabelecer projetos de pesquisas para recuperar a região e a biodiversidade afetada. Neste contexto, o projeto foi aprovado com objetivo de recuperar e preservar a biodiversidade de fungos e plantas associadas à região afetada, gerando um banco de dados com sementes e plântulas com as  
30 principais espécies ameaçadas de extinção.

Levando em consideração que não há relatos na literatura a respeito da comunidade de fungos endofíticos associados a espécies de planta do gênero *Piper* e diante do exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial biotecnológico da comunidade de fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletados em fragmento de Mata Atlântica no

- 5 Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Minas Gerais e responder às seguintes questões:
1. Fungos endofíticos associados à *Piper* sp. são bons produtores de metabólitos secundários bioativos?
  2. Os metabólitos secundários produzidos, são ativos contra agentes causadores de DNTs?
  - 10 3. Os fungos endofíticos são capazes de produzirem metabólitos que podem ser utilizados como herbicidas?
  4. Existe alguma relação de bioatividade entre os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos e os metabólitos secundários produzidos pelo seu hospedeiro?
  - 15 5. Quais espécies de fungos endofíticos são os produtores das substâncias bioativas?

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Micro-organismos endofíticos

Micro-organismos endofíticos podem ser representados por fungos, bactérias e protozoários que passam todo ou parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos vegetais sem que esses apresentem nenhum sinal de doença. Esta associação é definida por localização e não por função, transitoriamente sem sinais, invasiva e estabelecida inteiramente dentro dos tecidos vegetais. Estes micro-organismos são ubíquos e colonizam plantas vascularizadas e não vascularizadas, tendo sido isolados de todas as plantas estudadas até o momento ( Tan e Zou, 2001; Rodriguez et al. 2009; Kusari et al. 2012; Nair e Padmavathy, 2014). De acordo com Strobel e Daisy (2003), os fungos filamentosos são os micro-organismos endofíticos mais frequentemente isolados.

O termo endofítico foi utilizado pela primeira vez em 1886 por De Bary para caracterizar os micro-organismos que colonizavam os tecidos internos de uma planta hospedeira (Stepniewska e Kuzniar, 2013). Em 1887, Victor Gallipe presumiu que os micro-organismos do solo podem penetrar os tecidos vegetais saudáveis (Frank et al. 2017). No entanto, por acharem que estes micro-organismos isolados de dentro dos tecidos vegetais eram fontes de contaminação durante o processo de isolamento, estas descobertas foram descartadas. Somente em 1986, um pesquisador chamado Carroll mudou a perspectiva em relação aos endofíticos, uma vez que, afirmou que os fungos que causam infecções assintomáticas dentro do tecido de seus hospedeiros são endofíticos. Em 1991, Petrini concluiu que os endofíticos são todos os organismos que podem colonizar os tecidos vegetais sem nenhum sinal macroscopicamente visível (Blaschke-Hellmessen et al. 1991).

Os endofíticos não são, em sua maioria, específicos em relação aos hospedeiros, uma vez que, várias espécies de endofíticos podem ser encontradas em várias espécies de plantas hospedeiras. Eles podem ser isolados de diferentes espécies vegetais, as quais se desenvolvem sob diferentes condições ambientais e distribuições geográficas (Jalgaonwala et al. 2011). Nair e Padmavathy (2014) listam uma série de funções e aplicações dos micro-organismos endofíticos, tais como:

1. *Fitoestimulação*. As plantas necessitam de 16 elementos essenciais, como carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio entre outros, para o seu desenvolvimento. Os micro-organismos endofíticos ajudam na absorção de alguns elementos essenciais para o

crescimento e desenvolvimento das plantas. Por exemplo, os endofíticos de uma planta do gênero *Festuca* (gramínea perene), as auxiliam na adaptação à deficiência de fósforo e induz a obtenção de nitrogênio (Arachevaleta et al. 1989; Malinowski et al. 2000);

5     **2. Produção de pigmentos.** Algumas espécies de fungos endofíticos são capazes de produzir pigmentos com aplicabilidade industrial. Por exemplo, *Penicillium* sp. foi relatado sendo capaz de produzir um pigmento alaranjado, conhecido como glicosídeo quercetina, nunca isolado de um fungo endofítico, até então. *P. purpurogenum* também foi descrito por produzir um pigmento vermelho que pode ser utilizado como um corante alimentar natural (Qiu et al. 2010);

10    **3. Produção enzimática.** Várias enzimas de interesse industrial como pectinases, celulases, xilanases e proteases já foram descritas sendo produzidas por fungos endofíticos. Por exemplo, *Acremonium zeae* foi capaz de produzir hemicelulase, enzima hidrolítica extracelular com aplicação na bioconversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis (Bischoff et al. 2009);

15    **4. Novos compostos bioativos.** Os endofíticos se tornaram conhecidos por sua capacidade de produzir compostos bioativos, com atividades biológicas diferentes, como antimicrobiana, antibióticos, imunossupressores, anticancerígenos e substâncias utilizadas no controle biológico. Por estarem interagindo com vários organismos, além da planta hospedeira, os micro-organismos endofíticos são capazes de produzir substâncias com atividade  
20    antimicrobiana, ajudando desta forma no controle de patógenos. Por exemplo, dos 37 endofíticos isolados da planta *Tectona grandis* L., 18 foram capazes de produzir substâncias que inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e 3 isolados inibiram o crescimento de *Candida albicans in vitro* (Chareprasert et al. 2006).

## 25    **2.2 Fungos endofíticos e suas interações com as plantas hospedeiras**

Essas funções e aplicações dos micro-organismos endofíticos estão relacionadas diretamente com a interação destes com o hospedeiro (Casella et al. 2013). Estima-se que a interação entre plantas e os endofíticos teve início há centenas de milhares de anos, quando os vegetais surgiram no planeta pela primeira vez. Evidências dessa interação já foram  
30    encontradas em tecidos vegetais fossilizados (Sandhu e Gupta, 2015). Kogel e colaboradores (2006) acreditam que micro-organismos endofíticos podem se tornar parasitas sob determinadas condições e vice-versa, e desta forma a interação endofítico-hospedeiro pode



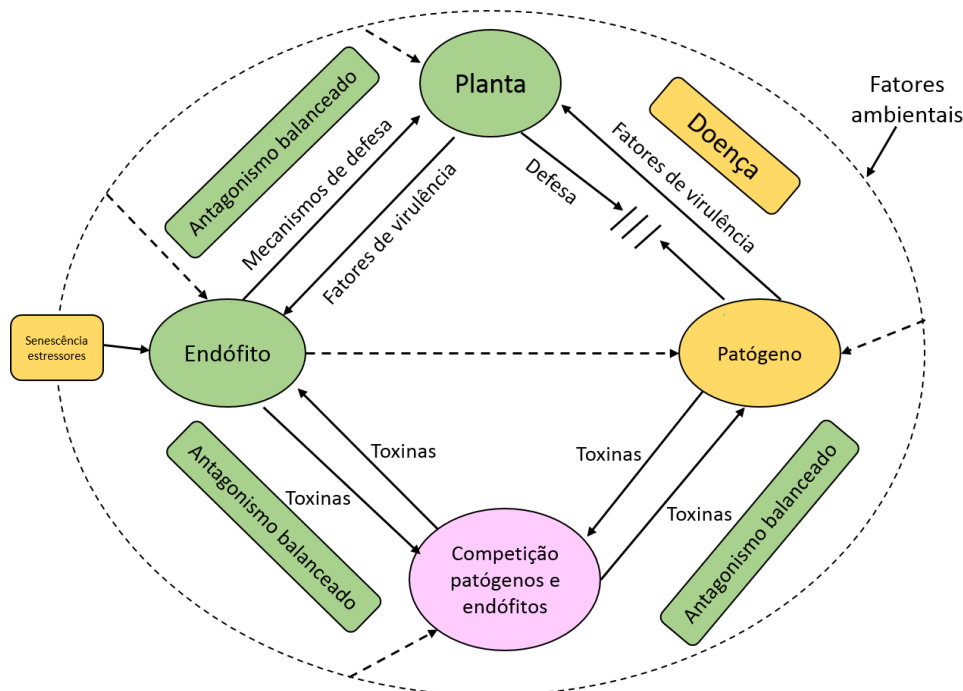
alterar de mutualismo para parasitismo de um modo contínuo e em função dos fatores bióticos e abióticos, como senescência da planta, abundância de nutrientes, fatores ambientais e produção de espécies reativas de oxigênio. Há ainda a hipótese de que, em função da enorme diversidade existente, estes micro-organismos podem ser sapróbios ou patógenos oportunistas (Strobel, 2003). 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 micro-organismo e as respostas de defesa do hospedeiro.

Bano e colaboradores (2016) também descrevem a interação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira como simbiótica e pode variar, devido a alguns fatores, de mutualismo, para comensalismo e até mesmo parasitismo. Os fungos endofíticos mutualísticos não prejudicam o hospedeiro, utilizando os metabólitos por ele produzidos, e o hospedeiro também se beneficia desta relação, por meio dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos que conferem proteção contra patógenos e herbívoros e ainda estimulam seu crescimento.

Zuccaro e colaboradores (2011), mostraram em seu trabalho que análises do genoma e transcriptoma do fungo endofítico *Piriformospora indica*, associado a raízes de cevada, possui alguns genes que codificam enzimas que são necessárias para um estilo de vida saprotrófico e que existe outros genes que são regulados positivamente, uns durante o período endofítico e outros durante o período saprotrófico do fungo. Ao comparar os genes expressos pelo *P. indica* quando este colonizava raízes jovens e raízes mortas, foram encontrados 579 genes na fase de pré-penetração (36-48 horas pós-inoculação), 397 genes na fase de colonização precoce (3 dias pós-inoculação) e 641 genes 5 dias pós-inoculação, que foram regulados diferencialmente em comparação com as raízes mortas. Dessa forma, os autores chegaram à conclusão que essa diferença na expressão gênica é consistente com uma estratégia de colonização diversificada para as raízes jovens e as mortas. E, ao comparar estas informações com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi observado que os genes induzidos durante a simbiose apresentaram maior similaridade de sequências de aminoácidos com os de *Laccaria bicolor*, um fungo ectomicorrízico. Já os genes induzidos durante a colonização das raízes mortas apresentaram maior similaridade com as sequências de aminoácidos do fungo saprotrófico *Coprinopsis cinerea*.

O equilíbrio entre o endofítico beneficiar o seu hospedeiro ou apresentar características patogênicas está relacionado com alguns fatores como o modo de transmissão, o padrão de infecção, a idade da planta, propriedades genéticas e fatores ambientais (Saikkonen et al. 1998; Aly et al. 2011). Por exemplo, há relatos de que a expressão do gene da proteína cinase, ativada pelo estresse e pelo estado mitógeno (sakA) do endofítico *Epichloë festucae*, é essencial para a associação mutualística com o seu hospedeiro, *Lolium perene*, para que essa relação não se torne patogênica (Kusari et al. 2012).

Alguns autores citam a hipótese de que para as interações entre fungos endofíticos e planta hospedeira serem assintomáticas, é necessário um antagonismo balanceado (Figura 2) entre a defesa da planta e a virulência do fungo (Tan e Zou, 2001; Malinowski e Belesky, 2006; Kusari et al. 2012; Schulz et al. 2015).



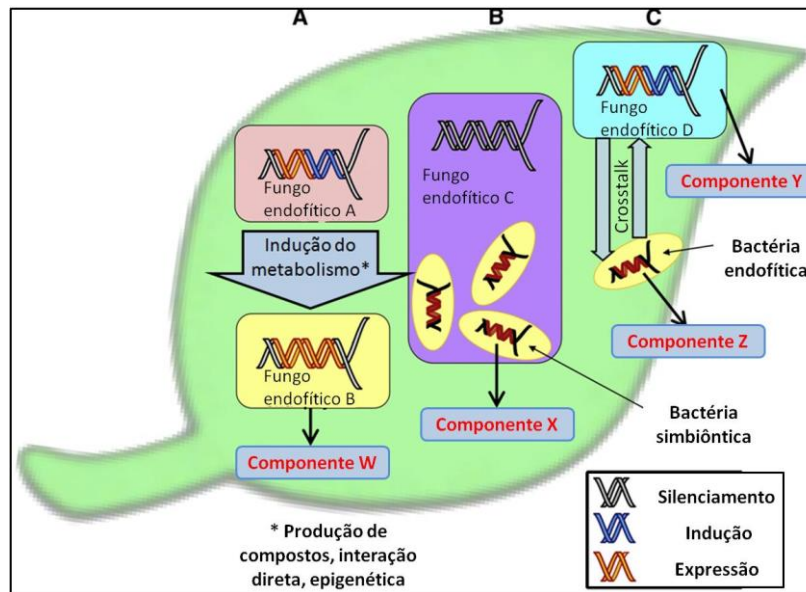
**Figura 2.** Hipótese do antagonismo balanceado proposto por Schulz et al. (2015).

Ao estudar a infecção de fungos endofíticos e fungos fitopatogênicos em raízes, Schulz et al. (1999), constataram que existe uma relação antagonista entre eles, como indicado pela: (1) alta produção de metabólitos herbicidas sintetizados pelos isolados de fungos endofíticos; (2) produção de metabólitos tóxicos por ambos para tentar inibir o crescimento de competidores; (3) alta concentração de alguns metabólitos fenólicos durante a infecção endofítica comparada com a infecção patogênica e (4) maior reação de defesa da planta ao endofítico em contraste com a interação patogênica de culturas de células em suspensão.

O fato de que a planta apresenta fungos endofíticos não significa que a mesma não possui mecanismos de defesa. Schulz e colaboradores (2015), estabeleceram algumas hipóteses para responder como os fungos endofíticos superam a defesa da planta, sem causar danos. São elas:

- 5                   • Secreção de metabólitos secundários tóxicos ao hospedeiro;
- Transformação dos fitohormônios do hospedeiro;
- Desintoxicação dos metabólitos de defesa constitutivos;
- Secreção de enzimas líticas.

Segundo Sieber (2007), quando um fungo endofítico infecta os tecidos vegetais, as  
10 defesas induzidas, como morte celular programada e formação de papila, por exemplo, não são ativadas ou a resposta hipersensível mata apenas algumas células da planta. Esse fato pôde ser observado no endófito da planta *Pseudotsuga menziesii*, onde o endofítico infecta apenas células epidérmicas, ocorrendo apenas a morte da célula infectada, uma vez que, o endofítico cresce como um talo curto e multicelular até a senescência do hospedeiro. É  
15 importante ressaltar, ainda, que não há apenas a relação destes fungos com as plantas hospedeiras, mas também com outros organismos presentes no hospedeiro (Bano et al. 2016). A **Figura 3**, mostra a interação do fungo endofítico com demais micro-organismos presentes no tecido vegetal, salientando que essas interações microbianas desempenham um papel importante no início da produção de metabólitos secundários em bactérias e fungos, sendo  
20 eles endofíticos ou não.



**Figura 3.** Interação interespecífica entre micro-organismos dentro de uma planta hospedeira. (A) Interação fungo-fungo; (B) Interação fungo-bactéria endossimbiótica; (C) Interação fungo-bactéria. Fonte: Kusari et al. (2012).

5 Os endofíticos também interagem com os insetos que passam pelo hospedeiro. Essa interação ainda não está muito elucidada, mas os poucos estudos existentes, mostram que ela pode ser variada. Um exemplo dessa interação, é o inseto-parasita *Metarhizium robertsii*, que ao estabelecer uma interação endofítica, transfere nitrogênio diretamente para o micro-organismo endofítico da planta. Isso mostra, que a associação endofítico-planta-inseto é importante e requer mais estudos (Behie et al. 2012).

10

Segundo Hodgson e colaboradores (2014), a transmissão dos fungos endofíticos para um hospedeiro pode acontecer de forma horizontal ou vertical. A transmissão horizontal acontece quando os fungos são transmitidos por meio de esporos presentes no solo ou ar, já a transmissão vertical acontece quando os esporos são disseminados de uma planta hospedeira para outra via sementes. Por exemplo, a planta *Forbs* (termo usado em biologia e ecologia de vegetação para plantas herbáceas de pradarias e sub-bosques) possui fungos endofíticos transmitidos horizontal e verticalmente. Na qual, a transmissão horizontal foi estabelecida ao observar que muito dos fungos endofíticos são saprófitos ubíquos, esporulando no solo ou em folhas em decomposição, sendo impossível de ter a transmissão vertical. Enquanto a transmissão vertical foi verificada ao se observar que certos fungos estavam presentes em todo tecido vegetal e que os mesmos quando presentes na semente, também estavam presentes nas mudas da planta.

15

20

Como descrito anteriormente, os fungos endofíticos proporcionam a planta, por meio dos metabólitos secundários, resistência à patógenos e à herbivoria. Um exemplo, são os gafanhotos que conseguem se alimentar de folhas da planta *Calotropis gigantea* que contém fungos endofíticos, porém isso não acontece com algumas formigas que tem preferência por  
5 folhas de pepino (*Cucumis sativus*) quando estas tem baixa quantidade de fungos endofíticos (Devarajan e Suryanarayanan, 2006; Estrada et al. 2015). Além disso, o fungo endofítico pode fornecer a planta nutrientes fundamentais, como o fósforo, durante a senescência de seu hospedeiro (Bano et al. 2016).

Li et al. (2011) também relata que algumas espécies de fungos endofíticos tem  
10 tolerância a determinadas concentrações de metais pesados e que eles também promovem o crescimento da planta em solos contaminados por estes, os quais podem ser utilizados em processo de biorremediação. Eles investigaram a tolerância de 495 fungos endofíticos, isolados de 6 espécies vegetais dominantes em um terreno baldio da mina Yunnan, na China, ao chumbo e ao zinco e tiveram como resultados que, aproximadamente, 50% dos isolados  
15 foram tolerantes à presença de chumbo e zinco.

Os fungos endofíticos são alvos na busca por metabólitos bioativos, principalmente antibacterianos e antifúngicos, devido às interações com o hospedeiro e com outros micro-organismos, sendo eles patógenos ou endofíticos (Schulz et al. 2015). Esses metabólitos, ainda, podem ser utilizados no tratamento de alguns tipos de câncer, na produção de algumas  
20 enzimas de interesse e também na agricultura ( Guo et al. 2008; Bano et al. 2016).

### **2.3 Diversidade de fungos endofíticos**

Diferentes estudos demonstram que os tecidos vegetais representam um promissor reservatório de diversidade microbiana. A maioria das plantas, se não todas, são colonizadas por pelo menos um fungo endofítico. Dessa forma, a diversidade dos tecidos vegetais faz com  
25 que eles sejam objeto de estudo interessante para um conhecimento mais aprofundado destes micro-organismos ( Strobel, 2003; Kogel et al. 2006; Sieber, 2007). Os micro-organismos endofíticos podem ser divididos em generalistas, que são aqueles encontrados em maior quantidade e em diferentes espécies de plantas, e especialistas, que são menos encontrados e estão em espécies de hospedeiros específicos. A maior quantidade e diversidade de fungos  
30 endofíticos estão localizadas nas regiões tropicais do planeta devido ao alto número de espécies vegetais presentes nessas regiões (Aime e Brearley, 2012; Suryanarayanan, 2013).

Os fungos endofíticos ainda podem ser divididos em clavipitáceos e não-clavipitáceos. Os clavipitáceos são aqueles que tem como hospedeiro principal, gramíneas, colonizando todo o hospedeiro, exceto as raízes e são transmitidos verticalmente para outro hospedeiro. Os não-clavipitáceos não colonizam o hospedeiro de forma sistêmica, colonizando poucas células. Eles ocorrem em todas as espécies de plantas de zonas temperadas ( Stone et al. 2004; Sieber, 2007).

A composição e a frequência dos fungos endofíticos são definidos por alguns fatores como nutrientes, idade da planta, tecido vegetal habitado, localização geográfica, interações entre os micro-organismos endofíticos presentes no hospedeiro, dentre outras (Yan et al. 2015). Para a realização de estudos da comunidade endofítica, os mesmos devem ser obtidos a partir da superfícies desinfestadas de sua planta hospedeira e posterior fragmentação dos tecidos e plaqueamento em placas de Petri com o meio propício para seu crescimento e isolamento (Xiong et al. 2013). No entanto, o tamanho do fragmento a ser plaqueado no meio de cultura pode influenciar o número de espécies obtidas. Uma solução, portanto, seria triturar o fragmento, uma vez que, quanto menor o tamanho da partícula, maior o número de espécies recuperadas (Abreu et al. 2010). Alguns fungos endofíticos são ubíquos e outros são mais difíceis de serem isolados. Os filos mais frequentemente obtidos são *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* e suas formas anamorfas (Rajamanikyam et al. 2017).

A identificação de fungos filamentosos pode ser realizada pela análise de certas características como cor e textura da colônia, tamanho, desenvolvimento e forma dos esporos sexuais e assexuais e características fisiológicas, por exemplo, o uso de diferentes compostos como fonte de nitrogênio e carbono (Takano et al. 2006). Recentemente, os micro-organismos endofíticos são identificados através de algumas técnicas da biologia molecular, como análise do DNA ribossômico nuclear (rDNA) que contém repetições em tandem de três genes de rRNA (28S, 18S e 5.8S). As comparações de sequências de rRNA do gene de rRNA nuclear 18S, altamente conservado, têm sido utilizadas para inferir relações evolutivas entre diferentes grupos de fungos, bem como suas relações com organismos em outros reinos. Outro método é através do sequenciamento das regiões transcritas internas (ITS1 e ITS2) ou através do sequenciamento do genoma integral das comunidades endofíticas (Glass e Donaldson 1995; Takano et al. 2006; Kandel et al. 2017).

## 2.4 Metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos

Os metabólitos secundários foram descobertos em 1873 e são moléculas pequenas e orgânicas, produzidas por vários micro-organismos, por meio da atuação de enzimas, como sintetase de peptídeos não ribossomais e policetídeos sintetase ou dimetiltransferase e peniltransferase (Scharf et al. 2014). Apesar destes metabólitos não serem essenciais para a sobrevivência da planta, são responsáveis pela adaptação do vegetal no ambiente em que estão e também pelos mecanismos de defesa (Ramakrishna e Ravishankar, 2011). Além disso, os metabólitos secundários são fundamentais nas interações metabólicas entre o fungo endofítico e a planta hospedeira, estando envolvidos na sinalização, regulação e defesa da simbiose (Bhardwaj e Agrawal, 2014).

Apesar do interesse recente, o uso de produtos naturais, por meio do uso de plantas medicinais é antigo, datando desde 2400 a. C. Como 95% da biodiversidade mundial (plantas, animais, micro-organismos) ainda não foi estudada, há muito o que se descobrir em relação aos metabólitos secundários, principalmente, suas atividades biológicas (David et al. 2015). A dificuldade em se produzir substâncias sintéticas para serem utilizados como drogas com aplicações farmacêuticas ou na indústria agropecuária é enorme por ser, na maioria das vezes, economicamente inviável, uma vez que, tem-se um alto custo de produção e pouco rendimento. Desse modo, os metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos se tornaram uma alternativa mais favorável. As vantagens da produção de produtos secundários são o rápido crescimento dos micro-organismos que os produzem; eles são passíveis de transformação genética; o metabólito é produzido, na maioria das vezes, em maior qualidade e quantidade; as ferramentas de engenharia metabólica já estão bem estabelecidas e a produção é mais sustentável (Song et al. 2014).

A produção de alguns metabólitos secundários está constantemente relacionada com as condições ambientais onde a planta e seus fungos endofíticos estão inseridos. Os fungos endofíticos tem uma grande diversidade metabólica, podendo produzir diversos metabólitos bioativos, como alcaloides, terpenoides, esteroides, quinonas, isocumarinas, lignanas, fenilpropanoides, fenóis e lactonas ( Li et al. 2014; Card et al. 2015). Em muitos casos, tais metabólitos podem auxiliar a planta em seu estabelecimento e sobrevivência às condições ambientais em que se encontram inseridos (Ludwig-Müller, 2015). No trabalho de Rosa e colaboradores (2009), dos 26 fungos endofíticos isolados da planta *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*), encontrada no continente antártico, 21 deles produziam melanina em suas

hifas, o que indica uma maneira de se proteger da alta radiação nesse continente. Saikkonen e colaboradores (1998) já tinham o conhecimento que a produção de alcaloides por fungos endofíticos de gramíneas auxiliava as mesmas contra a herbivoria.

A escolha da planta hospedeira a ser estudada quanto aos seus endofíticos é muito importante; para isso alguns critérios são seguidos, tais como: (1) plantas de ambientes únicos; (2) plantas que são utilizadas pelo conhecimento popular para o tratamento de algumas doenças ou aquelas que são utilizadas em tribos indígenas; (3) plantas que tem uma longevidade incomum e (4) plantas que estão localizadas em áreas de grande biodiversidade (Strobel et al. 2004).

Algumas propriedades medicinais que algumas plantas possuem, às vezes, estão relacionadas intimamente com os seus fungos endofíticos (Santos et al. 2015). Há relatos que, ao longo da evolução, os fungos endofíticos se adaptaram ao ambiente no qual estavam inseridos, por meio de alterações genéticas, especialmente, da assimilação de alguns fragmentos de DNA do seu hospedeiro em seu próprio genoma. Dessa forma, tal fato, pode explicar o porquê que alguns fungos são capazes de produzir compostos bioativos similares ao da planta hospedeira (Zhao et al. 2011). A planta *Camptotheca acuminata* produz a substância conhecida como Camptotecina que inibe a enzima topoisomerase I, que está envolvida nas etapas de replicação do DNA. O fungo endofítico *Fusarium solani* isolado desta planta, também produz a mesma substância com o intuito de se proteger, por meio de alterações específicas em resíduos de aminoácidos, da ligação da Camptotecina nos domínios catalíticos da topoisomerase I (Kusari et al., 2012). Ainda temos como exemplo, substâncias produzidas tanto pelo fungos endofítico quanto pela planta hospedeira, como fármacos anticancerígenos (Paclitaxel, Podofilotoxina e Deoxipodofilotoxina), Hipericina antidepressiva e Emodina, bem como os herbicidas naturais Azadiractina A e B (Kusari et al. 2013).

Devido à resistência dos micro-organismos a alguns antibióticos e a busca constante por fármacos que possam ser utilizados no tratamento do câncer, os produtos naturais têm conquistado mais espaço, tanto no meio acadêmico quanto no industrial. Assim, os fungos endofíticos tem sido reconhecidos como uma fonte promissora de metabólitos secundários que possam ser utilizados, principalmente, na área farmacêutica (Chen et al. 2016). O anticancerígeno Taxol descoberto em 1967 a partir do extrato de cascas da árvore *Taxus brevifolia* (Weaver, 2014), também foi obtido a partir do extrato fúngico do endófito *Taxomyces andreanae*, isolado da mesma planta (Bhardwaj & Agrawal, 2014). O Taxol é



utilizado no tratamento de câncer de mama, câncer de ovário e câncer de pulmão. Ele se liga, especificamente, a  $\beta$ -tubulina, impedindo a sua despolimerização, durante o processo de divisão celular (Wang et al. 1999). Outra substância usada no tratamento do câncer, produzida por fungos endofíticos é a Camptotecina, que como já citado, inibi a enzima topoisomerase I, prejudicando a replicação do DNA, causando a apoptose da célula. Ela foi primeiramente produzida pela planta *Camptotheca acuminata*. Mais tarde, verificou-se que o fungo endofítico *Fusarium solani*, isolado da mesma planta, era capaz de produzir a mesma substância (Ran et al. 2017). Além de possuir atividade anticancerígena, já foi relatado que a Camptotecina e seus análogos possui atividade antimicrobiana e antiviral (Samaga e Rai, 2016).

Apesar da grande aplicabilidade dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos, o maior problema nessa área é a sua produção em larga escala. Existem várias possibilidades para contornar esse problema, por exemplo, controlando algumas condições de fermentação, aeração, pH, pressão parcial de oxigênio e gás carbônico dentro do biorreator, temperatura, agitação dentre outras variáveis (Kusari e Spiteller, 2011). Para produzir um metabólito secundário de um fungo filamentosos é necessária uma caracterização detalhada do fungo, antes do projeto de bioprocessamento (Kusari et al. 2014). Porém, um problema que ocorre na ampliação de escala é a diferença de características que o fungo apresenta quando cresce em *in vivo* e quando cresce *in vitro*. Segundo Young et al. (2006), a planta hospedeira pode estimular os fungos endofíticos a produzirem metabólitos secundários específicos, os quais podem deixar de serem produzidos após repiques sucessivos. Além disso, a produção de outros metabólitos com a atividade antimicrobiana, por exemplo, também depende da interação dos fungos endofíticos com outros micro-organismos, sendo eles endofíticos ou não. Portanto, às vezes, a produção em larga escala de produtos naturais, usando culturas axênicas, não tem o potencial de produzir todas as substâncias, quando comparado se os mesmos micro-organismos estivessem *in vivo* (Young et al. 2006). Schulz et al. (2015) ao estudarem sobre as várias interações antagonistas, observaram que quando a maioria dos fungos endofíticos está sendo co-cultivada com outros micro-organismos, há a produção de novos metabólitos que não foram produzidos quando em monocultura. Portanto, para a produção dos metabólitos secundários é necessário estabelecer quais são os parâmetros ideais e avaliar a possibilidade de utilizar co-culturas de fungos endofíticos com outros micro-organismos, com o objetivo de ampliar a variedade de substâncias produzidas.

## 2.5 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais, abrangendo 149 países e afetando mais de um bilhão de pessoas, custando às economias em desenvolvimento bilhões de dólares todos os anos. Populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos e animais domésticos e gado são as mais afetadas (World Health Organization, 2015).

Os principais agentes causadores de DNTs são os vírus (raiva e dengue), as bactérias (lepra, boubá, tracoma e úlcera de Buruli), os protozoários (leishmaniasis e tripanossomíase) e os parasitas helmintos (esquistossomose, filariose linfática, oncocercose, vermes intestinais e verme da Guiné). No total, dezessete DNTs já foram identificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e estima-se que além das mais de 1 bilhão de pessoas já infectadas com DNTs, ainda existam mais 1 bilhão em risco (Molyneux, 2013).

Mesmo com os avanços feitos tanto no conhecimento básico de muitas doenças infecciosas quanto no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas, estas doenças ainda causam alta morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento do mundo (Trouiller et al. 2002). A doença de Chagas, por exemplo, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, infecta aproximadamente 200 mil novas pessoas por ano nas Américas (Feasey et al. 2010). Ela possui alguns mecanismos de transmissão, o principal deles é a transmissão pelo vetor por transfusão de sangue, oral, placentária ou congênita e através do canal do parto no momento do nascimento. Outros mecanismos, menos comuns, são por meio de acidentes de laboratório, manejo de animais infectados, ingestão de carne crua de animais infectados, transplante de órgãos de doadores infectados pelo *T. cruzi*, transmissão sexual e, excepcionalmente, por infecção induzida ou criminal (Coura, 2015). Desde 1970, os medicamentos benzonidazol e Nifurtimox têm sido utilizados, porém os dois apresentam reações adversas ao medicamento altas taxas de suspensão do tratamento (Aldasoro et al. 2018).

A dengue é outra doença tropical negligenciada, onde até 2,5 bilhões de pessoas, em países tropicais e subtropicais, correm o risco de serem infectadas (Costa et al. 2011). Porém, sintomas graves da doença como dengue hemorrágica e a síndrome de choque, têm sido revelados em regiões anteriormente não afetadas. A dengue hemorrágica, por exemplo, já foi relatada em alguns estados dos Estados Unidos, e o vírus da dengue sorotipo 2 (DENV-2) foi

implicado em alguns destes casos (Siqueira e Oréfice, 2016). Como a dengue é uma doença infecciosa, a erradicação da doença é baseada em duas vias: eliminação do patógeno e limitação das complicações causadas pela doença (Wiwanitkit, 2010).

A leishmaniose é uma doença causada por mais de 20 espécies de *Leishmania* e as três principais variações dessa doença são leishmaniose cutânea, mucosa e visceral. A leishmaniose cutânea é a mais comum, enquanto a visceral é a mais letal e requer tratamento imediato. Os principais objetivos no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea é impedir a mortalidade e a morbidade. A Anfotericina B lipossomal por via intravenosa para a leishmaniose visceral e a miltefosina oral, que pode ser utilizada para as três variações, são os únicos medicamentos aprovados pela FDA dos Estados Unidos, no entanto, ambos possuem altos custos de fabricação, além de, apresentarem efeitos colaterais (Aronson et al. 2017).

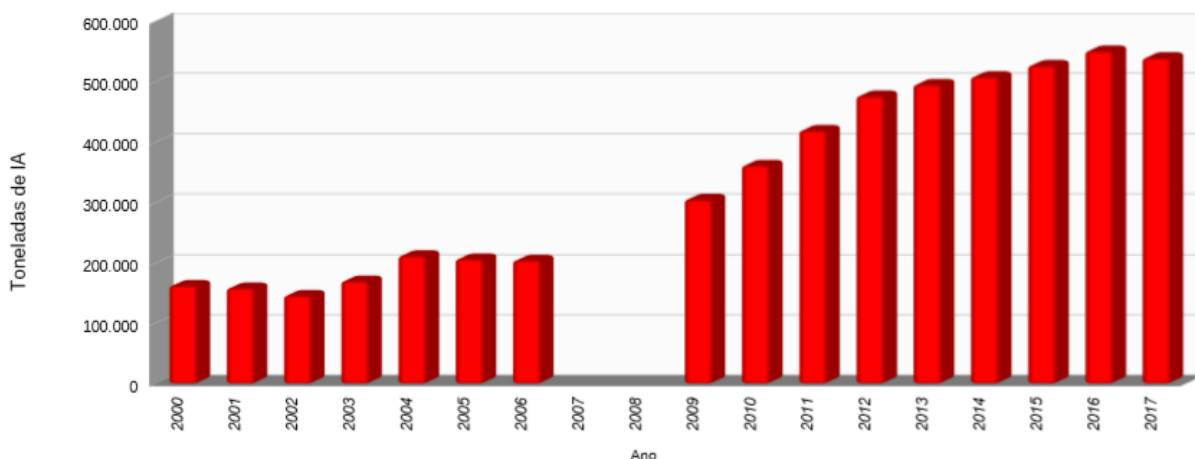
Por último, a malária, causada pelo *Plasmodium falciparum*, atinge cerca de 207 milhões de pessoas todos os anos, causando 562.000 mortes (Kaur et al. 2015). Quando não se tem o diagnóstico preciso da doença, muitos pacientes optam pelo tratamento usando Artemisinina, o que pode impedir o tratamento da verdadeira causa da doença, desperdiçar os recursos, que já são escassos para o tratamento da malária e contribuir para a resistência do parasita (Cohen et al. 2015).

Visto os problemas para o tratamento das doenças listadas acima, a procura por novas drogas que possam ser utilizadas contra os agentes causadores das doenças negligenciadas vem aumentando. Como os ecossistemas brasileiros são uma fonte de potenciais fungos endofíticos com capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos, eles podem ser considerados uma alternativa às drogas hoje utilizadas (Rosa et al. 2011).

## 2.6 Agrotóxicos

Atualmente, a busca por novos agroquímicos eficazes, com baixa toxicidade e que não impactam o meio ambiente está aumentando, uma vez que, devido à falta de segurança e a problemas ambientais, os produtos sintéticos, hoje, disponíveis no mercado estão sendo retirados (Strobel e Daisy, 2003). O glifosato, herbicida sistêmico de amplo espectro, é o mais utilizado no controle de ervas daninhas nas lavouras em todo o mundo, uma vez que, ele evita a perda dos rendimentos das culturas, auxiliando no aumento da produção de alimentos. O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e este consumo vem aumentando desde 2009 (**Figura 4**). Em relação ao glifosato, foram consumidos 150 milhões

de litros/ano desse herbicida, 30% de todos os defensivos agrícolas utilizados no país (Toni et al. 2006). Todavia, do ponto de vista ambiental, ele é considerado um micropoluinte devido à sua acumulação no solo, por causa de sua aplicação direta, e desta forma, podendo chegar aos reservatórios subterrâneos de água (Melo et al. 2017).



5

**Figura 4.** Consumo de agrotóxicos e afins de 2000 a 2017. FONTE: Ibama (2018).

As ervas daninhas causam impacto direto na produção agrícola, posto que, elas competem diretamente por nutrientes, umidade, luz e, se deixadas sem controle, podem causar mais de 80% de perda de produtividade. Assim, os herbicidas se apresentaram como uma solução aos problemas enfrentados. Porém, ao passar do tempo, foi observado que além dos problemas ambientais por eles causados, surgiu problemas devido à resistência das ervas daninhas aos herbicidas utilizados (Heap, 2014). Dessa forma, os metabólitos secundários surgem como uma alternativa aos herbicidas sintéticos disponíveis no mercado. Os fungos endofíticos podem ser uma fonte de produtos, já que estes podem ser úteis na agricultura como antifúngicos, herbicidas e inseticidas, por exemplo (García-Méndez et al. 2016).

15

ZHANG e colaboradores (2013) isolaram do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* associado à planta *Melia azedarach*, a Brevianamida F, que apresentou atividade herbicida contra sementes de alface (*Lactuca sativa*). Neste experimento, eles usaram como indicador de avaliação o índice de resposta (IR) que varia de -1 a +1 (o valor positivo indica estimulação e o negativo indica inibição das sementes pelas substâncias testadas). A Brevianamida F, a 200 ppm, inibiu o crescimento da parte aérea (-0,91) e o alongamento da raiz (-0,88) em relação ao controle glifosato (-0,34 e -0,73), a 200 ppm. E, em uma concentração menor, de 50 ppm, essa substância inibiu duas vezes mais o crescimento da parte aérea em relação ao glifosato, -0,65 e -0,26, respectivamente.

20

## 2.7 *Piper* sp.

As plantas medicinais têm auxiliado os seres humanos no tratamento de doenças há milhares de anos. O primeiro registro do uso de plantas medicinais pela humanidade data de 2600 a. C. e, de acordo com a OMS, 80% das pessoas que vivem em áreas rurais dependem delas, como um primeiro cuidado à saúde (Manju et al. 2012).

Plantas da família *Piperaceae* estão distribuídas em ambos os hemisférios, Sul e Norte, e são utilizadas de várias formas (Parmar et al. 1997). Esta família possui 4 gêneros, sendo o maior deles em número de espécie o gênero *Piper*. No Brasil, este gênero compreende várias espécies que são utilizadas na medicina popular, uma vez que, espécies desse gênero produzem efeito anestésico, picante e sialogogo (Cunico et al. 2005). Esta família é uma das mais primitivas no grupo das angiospermas e possuem aroma forte e agradável, o que também explica seu uso como condimentos. Plantas pertencentes a *Piperaceae*, normalmente são descritas por apresentarem uma diversidade de substâncias em sua constituição, as quais podem ser representadas por amidas, ligninas, neolignanas, flavanóides, kavalactonas, butenolídeos e óleos voláteis (Aparecido et al. 2018). Os metabólitos secundários das plantas desse gênero já foram relatados apresentando atividades antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida e larvicida (Souza et al. 2013; Silva et al. 2016; Marques et al. 2017).

### 3. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da comunidade de fungos endofíticos associada à *Piper* sp., coletada em fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais, como fonte de metabólitos ativos  
5    contra doenças negligenciadas para uso na medicina e na agroindústria.

#### 3.2 Objetivos específicos

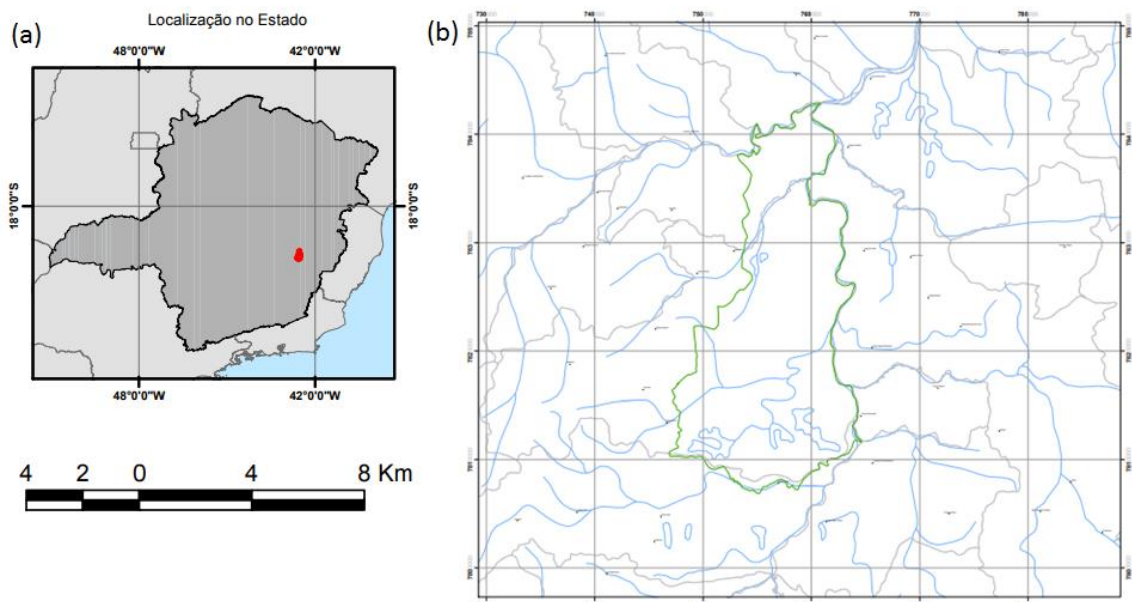
- Coletar e isolar fungos endofíticos de amostras de folhas, caules e raízes da planta medicinal *Piper* sp.;
- 10    • Depositar todos os isolados de fungos endofíticos obtidos na Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais a fim de preservar *in vitro* sua variabilidade genética;
- Preparar extratos brutos etanólicos a partir das culturas fúngicas e de sua planta hospedeira;
- 15    • Verificar a atividade biológica dos extratos fúngicos e vegetais contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amanozensis* e *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar a atividade herbicida dos extratos fúngicos e vegetais frente a modelos mono e dicotiledônea;
- Identificar por meio de técnicas de biologia molecular os isolados que apresentaram  
20    atividade biológica;
- Comparar as atividades biológicas dos fungos endofíticos com as da planta hospedeira.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de coleta

Exemplares vegetais da espécie *Piper* sp. foram coletadas no PERD, o qual é localizado entre os municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo, no Vale do Aço. O parque está situado no estado de Minas Gerais (**Figura 5**), a 248 km de Belo Horizonte e possui uma área total de 35.970 hectares e acomoda a maior área contínua de Mata Atlântica preservada em Minas Gerais. O parque concentra 42 lagoas, sendo a maior delas a Lagoa Dom Helvécio com 67 km<sup>2</sup> e 32 m de profundidade. A vegetação do PERD é composta por árvores centenárias, madeiras nobres de grande porte e outras 1129 espécies vegetais. O clima nessa região é caracterizado tropical chuvoso no verão e por estiagens acentuadas no inverno (Ministério do Meio ambiente, 2015).

As coletas foram feitas nas trilhas: Campolina (19°42'19" S, 42°30'45" W) e Vinhático (19°45'91" S, 42°37'42" W). A trilha da Campolina é de mata primária e é considerada uma trilha curta com 1,5 km e o seu final está próximo às margens do rio Doce. No entanto, a trilha do Vinhático é de mata secundária e possui apenas 800 m. O acesso a área foi realizado respeitando-se as legislações Estaduais e Federais de acesso à biodiversidade (Instituto Estadual de Florestas - <http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view>).



20 **Figura 5.** Parque Estadual do Rio Doce: (a) Localização no Estado de Minas Gerais; (b) Área do PERD. FONTE: Instituto Estadual de Florestas.

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

Foram coletados 30 indivíduos da espécie *Piper* sp., sendo 14 indivíduos da Trilha Campolina e 16 da Trilha do Vinhático (**Tabela 1**). As plantas amostradas foram classificadas de acordo com o porte, sendo consideradas pequenas aquelas que tinham até 1 m de altura e  
5 grandes aquelas que tinham altura maior que 1 m.

**Tabela 1.** Espécimes de *Piper* sp. amostrados nas trilhas Vinhático e Campolina.

Trilha	Grande porte	Pequeno porte	Total de indivíduos
Campolina	6	8	14
Vinhático	8	8	16

Uma exsicata do material vegetal foi produzida e depositada no herbário da  
10 Universidade Federal de Minas Gerais com número de tombamento BHCB 184745 (**Figura 6**). Para o processamento das amostras obtidas, as mesmas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas após 3 dias. Foram utilizadas três folhas de cada indivíduo, sendo que cinco fragmentos de cada folha foram plaqueados. Tanto o caule, quanto a raiz também foram plaqueados, utilizando 5 fragmentos de cada. Dessa forma, no total foram plaqueados 150  
15 fragmentos de caule, 150 fragmentos de folha e 150 fragmentos de raiz.



**Figura 6.** Espécime de *Piper* sp. coletado no PERD. FONTE: Próprio autor.



Os espécimes amostrados foram lavados com água corrente para a remoção da sujeira superficial. Posteriormente, a partir das folhas, caules e raízes foram retirados fragmentos com aproximadamente 5 mm de diâmetro com auxílio de uma tesoura esterilizada. Em seguida, os fragmentos passaram por um processo de desinfestação superficial em etanol 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (3 minutos) e água destilada (2 minutos) (Rosa et al. 2009). Em seguida, os fragmentos foram plaqueados em placas de Petri com meio Ágar Batata Dextrosado (BDA), suplementado com 100 mg/mL de cloranfenicol (Sigma). A água destilada utilizada na última etapa do processo de desinfestação também foi plaqueada como controle, garantindo que somente os fungos endofíticos fossem isolados. As placas foram incubadas a 25 °C por até 60 dias.

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

15

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

#### **4.3.1 Fungos filamentosos**

Os extratos fúngicos foram preparados por meio de fermentação em estado sólido em placas de Petri contendo, aproximadamente, 20 mL de meio BDA a 25 °C. Após 14 dias de crescimento, o meio de cultura junto com o crescimento micelial foram macerados e transferidos para um tubo cônico de 50 mL, onde foi adicionado 30 mL de etanol P.A. Os tubos foram armazenados a 4 °C durante 48 horas e depois o sobrenadante foi filtrado, utilizando papel filtro e transferidos para tubos de vidro de aproximadamente 7 mL (Santiago et al. 2012).

#### **4.3.2 Extrato da planta**

Caules, folhas e raízes das plantas foram fragmentados com auxílio de tesoura previamente esterilizada e transferidos para Erlenmeyer de 500 mL. De acordo com a quantidade de folha, caule e raiz obtida foi adicionado 300 mL de álcool P. A. para os caules, 250 mL para as folhas e 150 mL para as raízes. Os extratos foram mantidos ao abrigo de luz e depois de 15 dias foram filtrados e o sobrenadante (etanol) transferido para Erlenmeyer de 300 mL. Todos os extratos brutos obtidos, fúngicos e vegetais, foram secos em centrífuga a vácuo – *Speed Vac* (Savant) – com temperatura de 40 °C. Uma alíquota dos extratos foi

diluída em DMSO a 90% e depositados na Extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IRR/FIOCRUZ e mantidos a -20 °C até utilização nos ensaios biológicos.

## 5 4.4 Ensaios biológicos

### 4.4.1 Herbicida

Para a determinação da atividade herbicida foram utilizadas sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) como modelo para dicotiledôneas e cebolinha (*Allium schoenoprasum*) como modelo para monocotiledôneas. As sementes foram desinfestadas com álcool 70% (1 minuto), com hipoclorito de sódio 2-2,5% (7 minutos e 30 segundos) e lavadas em água destilada esterilizada por 6 vezes. Posteriormente, as sementes foram secas no fluxo em placas de Petri de vidro com papel filtro. Os extratos brutos foram diluídos em água destilada esterilizada para a concentração final de 1 mg/mL. Foram utilizadas placas de 24 poços esterilizadas, onde em cada poço foi adicionado um disco de papel filtro. Para o controle negativo, foi adicionado aos poços 400 µL de água destilada esterilizada. No controle positivo foi adicionado 400 µL de glifosato (herbicida sistêmico de amplo espectro, (Junior et al. 2002)) na concentração de 3 mg/mL, e nos poços testes foram adicionados 400 µL do extrato diluído. Em todos os poços foram distribuídas 5 sementes de alface ou cebolinha. O ensaio foi realizado em duplicata em ambiente esterilizado para evitar possíveis contaminações e seladas com fita crepe. Em seguida, elas foram incubadas em uma BOD de fotoperíodo (16 horas no claro e 8 horas no escuro) a uma temperatura de 26 °C. Os resultados foram lidos após 10 dias para a alface crespa e após 14 dias para cebolinha. Uma leitura quantitativa entre 0 e 5 foi realizada, onde o número 0 é atribuído quando não houve inibição do crescimento das sementes e 5 é atribuído quando houve inibição de 100% das sementes. São considerados ativos, aqueles extratos em que a média das sementes inibidas dos poços em duplicatas foi maior ou igual a 3.

### 4.4.2 Avaliação da atividade antiviral dos extratos vegetais e fúngicos contra *Dengue Virus*

#### 4.4.2.1 Triagem da atividade antiviral contra o vírus da Dengue sorotipo 2 (DENV-2)

Os ensaios antivirais foram realizados no Instituto René Rachou – Fiocruz Minas pelo aluno de doutorado Emerson de Castro Barbosa sob a orientação dos professores Dr. Carlos Leomar Zani e Dr<sup>a</sup>. Jaquelline Germano de Oliveira.

Inicialmente, os extratos na concentração de 20 mg/mL em solução aquosa com 90 % de dimetilsulfóxido (DMSO) foram depositados em placas de 96 poços (1 µL/poço) e armazenados a 4 °C até o momento do ensaio. Para a realização dos ensaios,  $7 \times 10^3$  células BHK-21/poço foram adicionadas à placa de 96 poços em meio DMEM suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibióticos e incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

O ensaio é realizado após confirmação ao microscópio óptico da monocamada celular com 80 % de confluência. Para o tratamento das células, os extratos são diluídos diretamente na placa de 96 poços e transferidos simultaneamente com a suspensão viral de DENV-2 (m.o.i.=2), para as placas contendo as células denominadas aqui de placas espelhos (duplicatas). A concentração de cada extrato no ensaio foi de 25 µg/mL e o volume de meio por poço foi de 200 µL. As colunas 1 e 12 das placas de 96 poços foram reservadas para os devidos controles, a saber: i) células não tratadas e não infectadas sem DMSO; ii) células não tratadas e não infectadas com 0,25 % de DMSO; iii) células não tratadas e infectadas sem DMSO; iv) células não tratadas e infectadas com 0,25 % de DMSO; v) células infectadas e tratadas com 300 UI/mL e 600 UI/mL de interferon alfa 2B. As placas foram reincubadas em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

Para revelação da atividade antiviral foi realizado o ensaio do brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT). Para isso, o sobrenadante das placas foi removido e em seguida foram adicionados 30 µL em cada poço de uma solução de MTT a 2 mg/mL dissolvido em PBS. As placas foram incubadas novamente por 90 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 130 µL de DMSO puro em cada poço e as placas foram mantidas em agitação por 5 minutos em vórtex de placas na velocidade de 200 rpm para dissolver os cristais de formazana. A densidade óptica da reação foi determinada em leitura feita a 540 nm em leitor de microplacas (SpectraMaxM5 - Molecular Devices). A partir dos valores de absorbância, foi calculada a porcentagem de proteção de cada extrato em comparação com os controles. Os ensaios positivos para DENV-2 no primeiro ensaio de triagem foram selecionados para um reteste nas mesmas condições. Desse modo, somente os extratos com resultados positivos e concordantes entre replicatas e entre dois ensaios foram considerados positivos e testados para CE<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>. São considerados ativos, os extratos que protegeram a célula contra a infecção do vírus com porcentagem maior que 30%.

#### 4.4.2.2 Determinação da CE<sub>50</sub> dos extratos de plantas e fungos com atividade antiviral

A concentração efetiva 50 (CE<sub>50</sub>) de cada extrato é definida como a concentração do extrato na qual é observada 50 % de inibição do efeito citopático (ECP) viral, ou seja, a concentração do extrato que promoveu a proteção de 50 % do ECP viral nas células tratadas comparadas ao ECP verificado nas células infectadas com DENV-2 não tratadas.

As amostras de extratos foram disponibilizadas na concentração de 20 mg/mL em solução aquosa com 90 % de DMSO e mantidas a 4 °C até o momento do ensaio. Para a realização dos ensaios de CE<sub>50</sub>, 7 x 10<sup>3</sup> células BHK-21/poço foram adicionadas à placa de 96 poços em meio DMEM suplementado com 5 % de SFB e antibióticos. A placa foi incubada a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para formação da monocamada celular. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e soluções de extratos em concentrações de 100-0,78 µg/mL (diluições 1:2) foram adicionadas à monocamada celular simultaneamente com a suspensão viral de DENV-2 (m.o.i=2). Os controles consistiram em: i) células não tratadas e não infectadas sem DMSO, ii) células não tratadas e não infectadas com DMSO a 0,45 %, iii) células não tratadas e infectadas sem o DMSO, iv) células não tratadas e infectadas com DMSO a 0,45 % e v) células infectadas e tratadas com IFN alfa 2B nas concentrações de 500-3,9 UI/mL.

O ensaio foi reincubado nas mesmas condições e a revelação foi feita pelo ensaio do MTT como descrito acima. De posse dos valores de absorbância, foram calculados os percentuais de proteção em cada concentração e os dados foram plotados no software prism 5 para obtenção da CE<sub>50</sub> de cada extrato. Todos os extratos foram testados em duplicatas e em pelo menos dois ensaios de CE<sub>50</sub>.

#### 4.4.2.3 Determinação da CC<sub>50</sub> dos extratos contra DENV-2 por microscopia óptica e pelo MTT

A concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de um extrato é definida pela concentração do extrato na qual se observa 50 % de toxicidade nas células tratadas quando comparadas às células não tratadas. As amostras de extratos também foram disponibilizadas na concentração de 20 mg/mL em solução aquosa com 90 % de DMSO e mantidas a 4 °C até o momento do ensaio. Para realização do ensaio de CC<sub>50</sub>, foram plaqueadas em placas de 96 poços, 7 x 10<sup>3</sup> células/poço em meio DMEM suplementado com 5 % de SFB e as placas incubadas por 24 horas a 37 °C. Após formação da monocamada, tais células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos, variando de 100-0,78 µg/mL (diluições 1:2) para avaliação da

citotoxicidade em células BHK-21. Foram feitos os devidos controles: células não tratadas sem DMSO e células não tratadas com 0,45 % de DMSO. A placa foi incubada em estufa a 37 °C por 72h e a revelação do ensaio foi feita por ensaio do MTT como já descrito. De posse dos valores de absorbância, foram calculados os percentuais de proteção e os dados foram plotados no software prism 5 para obtenção da CC<sub>50</sub> de cada extrato.

#### 4.4.2.4 Cálculo do Índice de Seletividade (IS)

O índice de seletividade (IS) expressa a razão entre a concentração da amostra que é tóxica para 50 % da monocamada celular (CC<sub>50</sub>) e a concentração que inibe 50 % da infecção viral (CE<sub>50</sub>). Essa avaliação é importante na previsão da aplicabilidade da amostra como potencial agente terapêutico. De posse dos valores de CE<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foi possível calcular o IS de cada extrato.

#### 4.4.3 Ensaio *in vitro* com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Este ensaio foi realizado pelo pesquisador Policarpo Sales do IRR/Fiocruz e baseado no descrito anteriormente por Buckner et al. (1996) e modificado por Romanha et al. (2010), usando *T. cruzi* (cepa de Tulahuen) expressando o gene da β-galactosidase de *Escherichia coli*. As formas tripomastigotas infecciosas são obtidas através da cultura em monocamadas de fibroblastos L929 de camundongo em meio RPMI-1640, sem vermelho de fenol, contendo 10% de SFB fetal e 2 mM de glutamina. Para o bioensaio, 4.000 células L929 em 80 µL de meio suplementado são adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Após uma incubação *overnight*, 40.000 tripomastigotas em 20 µL são adicionados às células e as células são incubadas por 2 horas. O meio contendo parasitas que não penetraram nas células é substituído por 200 µL de meio fresco e a placa é incubada por mais 48 h para estabelecer a infecção. O meio é então substituído pelos extratos a 20 µg/mL em meio fresco (200 µL) e a placa é incubada por 96 horas a 37 ° C. Após esse período, 50 µL de 500 µM de vermelho de clorofenol β-D-galactopiranosídeo em 0,5% Nonidet P40 é adicionado a cada poço e a placa é incubada por 18 horas a 37 ° C, e a absorbância a 570 nm medida, logo em seguida. São utilizados controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas, células infectadas tratadas com benzonidazol a 3,8 µM (controle positivo) ou DMSO a 1%. Os resultados são expressos como a percentagem de inibição do crescimento do *T. cruzi* em células testadas em composto em comparação com as células infectadas e células não tratadas.

As duplicatas são executadas em duas placas diferentes. Foram considerados ativos, os extratos que inibiram o crescimento do parasita com porcentagem maior que 50%.

#### 4.4.4 Ensaio *in vitro* com a forma amastigota-like de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

A manutenção das células axênicas de *L. (L.) amazonensis* e o ensaio com amastigotas-like foram realizados pela pesquisadora Daniela Nabak do IRR/Fiocruz MG. Culturas axênicas da forma amastigota-like de *L. (L.) amazonensis*, previamente caracterizadas por meio de eletroforese de isoenzimas e depositadas na Coleção de *Leishmania* do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, foram utilizadas para o ensaio. A concentração do parasita foi ajustada para  $1 \times 10^8$  células/mL, e 90  $\mu$ L foram adicionados a cada poço de placas de 96 poços, seguidos de 10  $\mu$ L das soluções contendo as amostras e controle da droga (0,2 mg/mL Anfotericina B). As placas foram incubadas a 32 °C por 72 horas e o número de parasitas estimado pelo ensaio colorimétrico baseado em MTT. Os resultados foram calculados a partir das absorbâncias medidas usando a fórmula:

$$\left[1 - \left(\frac{Abs_{exp}}{Abs_{contr}}\right)\right] \times 100$$

que expressa a porcentagem de morte do parasita em relação aos controles sem droga. Todas as amostras foram testadas em duplicata e os experimentos repetidos pelo menos uma vez. Os extratos que inibiram acima de 70% a proliferação dos parasitas foram considerados ativos.

#### 4.4.5 Ensaio contra o parasita *Plasmodium falciparum*

A manutenção dos parasitos *Plasmodium falciparum* e o ensaio esquizontocidas *in vitro* foram realizados pelas pesquisadoras Isabela Ceravolo e Patrícia Pereira do IRR/Fiocruz MG. O ensaio realizado utilizou o fluoróforo SYBR, um intercalante de DNA, conforme Smilkestein et al. (2004) com algumas modificações. Para a realização deste ensaio, a cultura de parasitos foi ajustada para 0,5% de parasitemia e 2% de hematócrito, e mantida em uma placa de 96 poços de fundo em U (180  $\mu$ L/poço). Após este ajuste, 180 $\mu$ L da suspensão de parasitos foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços contendo 20 $\mu$ L da solução dos extratos, avaliados em triplicatas, e incubada a 37°C por 48h. O sobrenadante foi retirado, e 150  $\mu$ L de PBS acrescentado a cada poço da placa que foi centrifugada por 5 minutos a 700 x

g. Após a retirada do sobrenadante, 100 µL de tampão de lise (0,2 µL de SYBR/mL em tampão de lise - Tris 20 mM pH 7,5; EDTA 5 mM; saponina 0,008% p/v e triton X-100 0,08% v/v) foram acrescentados a cada poço, os conteúdos foram bem homogeneizados e transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato, contendo 100 µL de PBS/poço. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e sob abrigo da luz. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor Synergy H4 (Biotek, Winooski, VT, EUA) em um comprimento de onda de excitação e de emissão de 485 e 535 nm, respectivamente, e com um ganho de 100. Para análise, a leitura do *background* dos poços das hemácias normais foi subtraída da contagem da fluorescência. Quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de DNA onde foi incorporado o SYBR, maior o número de parasitos viáveis, e menor a atividade da droga sobre o parasito. A amostra foi considerada promissora quando, a 20 µg/mL, apresentou uma porcentagem média de inibição de crescimento do parasito  $\geq 40\%$  quando comparada ao controle sem adição de substância-teste em, pelo menos, dois ensaios independentes.

15

#### **4.5 Identificação dos fungos endofíticos bioativos**

As colônias dos fungos endofíticos que foram ativos nos ensaios biológicos foram agrupadas de acordo com as características morfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Os grupos formados foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR, utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)<sub>5</sub>. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo. Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para o sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S) no gene do rDNA ou para o sequenciamento da região  $\beta$ -tubulina no gene do rDNA.

##### **4.5.1 Extração do DNA total**

A metodologia utilizada para a extração de DNA dos fungos filamentosos foi a proposta por Rosa e colaboradores (2009) com modificações. Os fungos endofíticos foram cultivados durante sete dias em meio BDA, posteriormente o micélio foi fragmentado e colocado em tubo de 2,0 mL, foram acrescentados 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl-trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) até cobrir o micélio e deixados a -20 °C por 10 minutos ou congelados até o momento da extração. Foi adicionado a cada tubo 3 *beads* de aço

inoxidável (3 mm de diâmetro) e os micélios foram triturados em microdesmembrador por até 5 minutos, em rotação máxima, se necessário, repetindo a operação por até três vezes. Em seguida, foi adicionado 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2 M, NaCl 8,2%, EDTA 2 M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização em vórtex e incubado por 1 hora a 65 °C.

5 Posteriormente, foi acrescentado 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizando-se em vórtex e incubado por 30 minutos a 0 °C. O conteúdo foi centrifugado a 14800 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL estéril. Foi acrescentado 10% do volume de cada tubo, acetato de sódio 3 M, e realizado homogeneização por inversão 10 vezes, incubados a 0 °C por 30 minutos e, então,  
10 centrifugados a 14800 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL. 50% do conteúdo do tubo de isopropanol (Merck) foi adicionado, homogeneizando por inversão e deixado a temperatura ambiente durante 1 hora para precipitar o DNA. Os tubos foram centrifugados a 14800 rpm, durante 15 minutos e o sobrenadante descartado por inversão, seguido por homogeneização com 200 µL de etanol  
15 70% (Merck) p/v. As amostras foram secas por aproximadamente 60 minutos, e então foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenada em freezer a -20 °C.

#### 20 4.5.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub>

A metodologia utilizada para a amplificação das regiões de microssatélite utilizando o iniciador (GTG)<sub>5</sub> foi baseada na usada por Lieckfeldt colaboradores (1993). O volume final da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi de 25 µL, onde a quantidade de DNA utilizada foi de 1,0 a 5,0 µL, dependendo da concentração de DNA obtida na extração. Os  
25 demais reagentes utilizados foram: 2,0 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> 10 pmol, 2,5 µL de tampão de PCR (10x), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 M, 1,0 µL de dNTP 0,05 mM, 1,0 µL de betaína, 0,5 µL de DMSO 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (1,25 U) e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por dois  
30 minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento a 50 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por seis minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em



tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), imerso durante 2 horas a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta.

#### 4.5.3 Amplificação da região ITS

5 Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para a amplificação da região ITS do rRNA conforme descrito por White et al. (1990). O volume final da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi de 50 µL, onde a quantidade de DNA utilizada foi de 1,0 a 5,0 µL, dependendo da concentração de DNA obtida na extração. Os demais reagentes utilizados  
10 foram: 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 pmol, 5,0 µL de tampão de PCR (10x), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 M, 2,0 µL de dNTP 0,05 mM, 2,0 µL de betaína, 1,0 µL de DMSO, 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (1,25 U) e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos,  
15 seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, imersos durante 20 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta.

#### 20 4.5.4 Amplificação do gene da β-tubulina

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) são utilizados para amplificação da região β-tubulina, conforme descrito por Glass e Donaldson (1995). O volume final da PCR foi de 50 µL, onde a quantidade de DNA utilizada foi de 1,0 a 5,0 µL, dependendo da concentração de  
25 DNA obtida na extração. Os demais reagentes utilizados foram: 1,0 µL de cada iniciador Bt2a e Bt2b 10 pmol, 5,0 µL de tampão de PCR (10x), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 M, 2,0 µL de dNTP 0,05 mM, 2,0 µL de betaína, 1,0 µL de DMSO, 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (1,25 U) e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma  
30 desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 59 °C e 1 minuto e meio de extensão a 72°C, e uma extensão final por 7 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese

em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, imersos durante 20 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta.

#### 4.5.5 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto, que foram adicionados ao produto de PCR com volume de 47 µL. Esta mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 25 minutos e o sobrenadante foi descartado, e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 µL de etanol 70%, seguido de homogeneização por inversão. Após nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol foi secado *overnight* a temperatura ambiente. O DNA então foi ressuspendido em 10 µL de água para injeção esterilizada e o produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

#### 4.5.6 Reações de Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) do Instituto René Rachou/Fiocruz MG, utilizando o kit *Big Dye* versão 3.1 (*Applied Biosystems*, EUA), em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730 (*Applied Biosystems*, 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 – 5 µmol<sup>-1</sup>, 1 µL de tampão – presente no kit de sequenciamento, 1 µL de *Big Dye*, 1 a 5 µL de DNA – de modo que a reação final contenha entre 50-500 ng/µL e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por 1 minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e 4 minutos de extensão final a 60 °C.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos ao processo de precipitação com o acréscimo de 1 µL de EDTA a 125 mM, 1 µL de acetato de amônio e 50 µL de etanol 96% (Merck) em cada poço. A placa foi homogeneizada brevemente com auxílio de um vórtex e então incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3.700 rpm à temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de etanol 70% (Merck) e as amostras novamente centrifugadas por 15 minutos a 3.700 rpm à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado por inversão e em cada poço foi acrescentado 10 µL de Formamida HI-DI (*Applied Biosystems*, EUA). A placa

foi armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730 (*Applied Biosystems*, EUA).

#### 4.5.7 Análise computacional das sequências

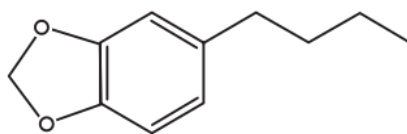
As sequências de DNA dos fungos endofíticos foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos, depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0 disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo National Center For Biotechnology. Os fungos que apresentaram sequências com valor de E = 0, cobertura e identidade  $\geq 99\%$ , bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente com sequências de espécies tipo ou referência, utilizando o programa MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura et al., 2013), foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de E diferente de zero, e cobertura e identidade  $\leq 98\%$ , os mesmos foram identificados em nível de espécie, gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Para identificação molecular foram utilizadas as sequências  $\geq 350$  pares de bases. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

No presente estudo não foi possível identificar a espécie vegetal estudada como hospedeira dos fungos endofíticos em nível de espécie, uma vez que, a mesma não foi coletada em época de floração. As estruturas reprodutivas são fundamentais para elucidação correta da espécie em questão. No entanto, propõe-se que a planta estudada como hospedeira de fungos endofíticos bioativos pode ser *Piper boucheanum* ou *Piper corcovadensis*, devido a características como porte arbustivo, caule articulado e nodoso e folhas inteiras dorsiventrals, alternas e pecioladas com estípulas. Desta forma, como segurança taxonômica a planta foi identificada como *Piper* sp.

Não há relatos na literatura sobre as propriedades terapêuticas da espécie *P. boucheanum*. No entanto, *P. corcovadensis* é conhecida no Brasil como jaborandi falso e é utilizada na medicina popular para o tratamento de dor de dente. De acordo com Silva et al. (2016), o maior constituinte das folhas, caule e raízes *P. corcovadensis* é a substância 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (Piperovatina) (**Figura 7**), a qual apresenta atividades bactericida, cardíaca, inseticida, anti-inflamatória e anestésica (Silva et al. 2016).



**Figura 7.** Estrutura química da Piperovatina. FONTE: Marques et al. (2017).

20

A Piperovatina é o principal constituinte encontrado nos óleos essenciais de várias espécies do gênero *Piper*. Na espécie *Piper klotzschianum* a porcentagem de Piperovatina na raiz é de 96,19%, no caule 84,75%, folhas 81,04% e sementes 36,92% (Nascimento et al. 2013). Segundo Marques et al. (2017), essa elevada produção está diretamente ligada aos mecanismos de defesa da planta contra patógenos e contra fatores bióticos e abióticos como exposição ao ozônio, níveis baixos de nutrientes e ataques de herbívoros.

25

Ao final da coleta realizada neste estudo foram amostrados 30 indivíduos de *Piper* sp. e processados 150 fragmentos do caule, 150 fragmentos da raiz e 150 fragmentos das folhas.

A partir do material processado foram obtidos 540 fungos filamentosos (**Tabela 2**). Em relação ao tecido/órgão utilizado foram isolados 265 (49,07%) fungos do caule, 162 (30%) da folha e 113 (20,93%) da raiz. Essa menor taxa de isolamento obtida a partir das raízes pode estar relacionada aos metabólitos secundários que a planta produz como mecanismos de defesa. De acordo com Nascimento et al. (2013), nas raízes de *Piper klotzschianum* já foi detectada a substância Piperovatina em maior quantidade do que quando comparada com o caule e a folha. Este metabólito secundário foi relatado por alguns autores com algumas atividades biológicas, incluindo fungicida (Cunico et al. 2003; Xu e Li, 2011; SILVA et al. 2015).

10 **Tabela 2.** Numero de isolados nas trilhas Campolina e Vinhático e a quantidade de fungos endofíticos isolados por tecido/órgão.

Triha	Número de isolados
Campolina	251
Vinhático	289
Órgão utilizado	Número de isolados
Caule	265
Folha	162
Raiz	113
<b>TOTAL DE ISOLADOS</b>	<b>540</b>

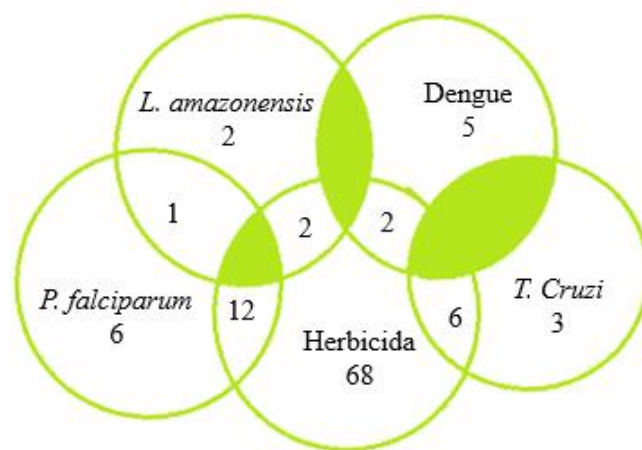
Em relação a quantidade de fungos endofíticos isolados de acordo com o porte da planta, na trilha Campolina, obteve-se 108 (43,03%) fungos de plantas de porte grande e 143 (56,97%) fungos de plantas de porte pequeno. Na trilha do Vinhático foram isolados 139 (48,1%) fungos das plantas de porte grande e 150 (51,90%) fungos das plantas de porte pequeno. Guo et al. (2008) relatam que a taxa de isolamento de fungos endofíticos varia de acordo com a idade do tecido vegetal, sendo possível se obter uma maior taxa de isolamento a partir de tecidos mais velhos.

20

## 5.2 Ensaio biológicos

Um total de 540 extratos fúngicos alcoólicos foram produzidos e testados para a atividade herbicida e leishmanicida. Para os ensaios contra *T. cruzi* e DENV-2, apenas 363 extratos foram avaliados. Contra o parasita *P. falciparum*, apenas 177 extratos foram testados.

208 isolados apresentaram pelo menos uma atividade biológica. Devido a este grande número, os resultados foram filtrados e aqui está representado aqueles que para o herbicida inibiram a germinação das sementes em um valor maior ou igual a 4 e aqueles que para os ensaios antiviral, contra *T. cruzi*, *P. falciparum* e *L. amazonensis* tiveram uma porcentagem de inibição maior ou igual a 70%. O Anexo 1 contém a Tabela onde está representado todos os isolados que apresentaram atividade biológica. A **Figura 7** mostra que após esta seleção: (1) 107 isolados apresentaram, no mínimo, uma atividade biológica; (2) o ensaio herbicida foi o que mais apresentou isolados ativos e (3) que alguns fungos filamentosos apresentaram mais de um tipo de atividade biológica.



10

107 isolados

**Figura 8.** Quantidade de isolados que apresentaram potenciais atividades biológicas.

A **Tabela 3** apresenta os resultados das principais atividades biológicas apresentadas pelos extratos dos fungos endofíticos.

**Tabela 3.** Atividades biológicas dos extratos brutos vegetais e extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados a *Piper* sp.

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15291	-	-	82 ± 6	3	> 100	> 34	-	*	-
-	15294	4 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Fusarium</i> sp.	15299	5 ± 0	-	-	-	-	-	95 ± 11	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15300	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15310	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15311	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaphorte</i> sp.	15325	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15326	-	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
<i>Muscodor</i> sp.	15335	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaphorte</i> sp.	15338	-	4 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15342	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15345	-	4 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15346	-	4 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
<i>Nigrospora</i> sp.	15348	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Phyllosticta</i> sp.	15349	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15362	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15377	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaportheceae</i> sp.	15379	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15381	-	-	*	*	*	*		85 ± 4	-
-	15389	-	-	*	*	*	*		89 ± 3	-
-	15392	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15393	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Fusarium</i> sp.	15395	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15401	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Fusarium</i> sp.	15403	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Hypocreales</i> sp.	15416	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15423	-	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15429	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	15432	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15440	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	15442	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	15443	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15444	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15447	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Nectriaceae</i> sp.	15449	5 ± 0	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15451	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-



Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15457	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaphorte</i> sp.	15458	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	15466	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15483	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15491	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15519	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15521	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15527	4 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15528	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15536	4,5 ± 0,5	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15538	-	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15540	-	-	94 ± 16	10	> 100	> 10	-	*	-
-	15544	4 ± 0	-	76 ± 10	42	> 100	> 2	-	*	-
-	15555	-	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15564	-	3 ± 0	-	-	-	-	85 ± 57	*	-
-	15572	-	3 ± 0	-	-	-	-	97 ± 35	*	-
-	15582	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	83 ± 14	-
-	15583	-	-	*	*	*	*	*	77 ± 8	-
-	15590	-	-	*	*	*	*	*	91 ± 3	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15598	-	-	72 ± 4	12	> 100	> 8	-	*	-
-	15601	5 ± 0	5 ± 0	*	*	*	*		92 ± 2	-
<i>Fusarium</i> sp.	15603	-	-	76 ± 2	10	> 100	> 8	-	*	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15607	-	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
<i>Fusarium</i> sp.	15611	5 ± 0	-	-	-	-	-	84 ± 31	*	-
-	15612	5 ± 0	4 ± 1	-	-	-	-	79 ± 43	*	-
-	15615	4 ± 0	-	-	-	-	-	89 ± 17	*	-
<i>Nectriaceae</i> sp.	15617	-	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15618	-	-	*	*	*	*	*	91 ± 3	-
-	15621	-	-	-	-	-	-	75 ± 87	*	-
-	15634	-	-	-	-	-	-	82 ± 57	*	-
-	15637	-	-	-	-	-	-	80 ± 92	*	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15653	-	-	70 ± 4	7	> 100	> 15	-	*	-
-	15703	4 ± 0	-	43 ± 12	4	> 100	> 22	-	*	-
-	15704	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15707	4 ± 0	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15716	-	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15718	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15725	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15730	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15732	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15733	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15738	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15743	4 ± 1	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15744	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	57 ± 25	-
-	15753	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15766	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15784	5 ± 0	5 ± 0	*	*	*	*	*	92 ± 2	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15786	-	4 ± 1	*	*	*	*	*	-	-
-	15787	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	51 ± 36	-
-	15788	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	53 ± 30	-
-	15789	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	83 ± 6	-
-	15794	-	4 ± 0	*	*	*	*	*	-	-
<i>Nectriaceae</i> sp.	15795	5 ± 0	-	*	*	*	*	*	66 ± 13	-
Ascomycota sp.	15799	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	92 ± 2	-
-	15802	-	4 ± 0	*	*	*	*	*	-	-
-	15805	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	54 ± 28	-
-	15807	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15817	-	-	*	*	*	*	*	56 ± 25	70 ± 5
<i>Xylariaceae</i> sp.	15818	-	-	*	*	*	*	*	-	73 ± 1
<i>Nigrospora</i> sp.	15822	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15825	-	-	*	*	*	*	*	-	71 ± 2
<i>Colletotrichum</i> sp.	15826	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	70 ± 0
-	15828	4 ± 1	-	*	*	*	*	*	63 ± 22	-
-	15830	5 ± 0	-	*	*	*	*	*	60 ± 21	-
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	15831	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15836	5 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15837	-	-	*	*	*	*	*	86 ± 4	-
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	15841	-	3,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	-	72 ± 0
-	15848	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
<i>Nigrospora</i> sp.	15851	4 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-
<i>Pleosporales</i> sp.	15853	5 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-
<i>Piper</i> sp.	Caule	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Piper</i> sp.	Folha	4,5 ± 1	4,5 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
<i>Piper</i> sp.	Raiz	-	-	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>		
Controles	Glifosato	5 ± 0	5 ± 0	-	-	-	-	-	-
	Benzonidazol	-	-	-	-	-	74 ± 8	-	-
	Interferon Alfa-2B	-	-	61 ± 3	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade. <sup>1</sup>Concentração efetiva a 50%. <sup>2</sup>Concentração citotóxica a 50% do tapete celular.

<sup>3</sup>Índice de seletividade. (-) Resultado negativo. (\*) Não foi testado.

### 5.2.1 Determinação da atividade herbicida

A atividade herbicida dos fungos endofíticos foi avaliada qualitativamente e considerado como positivo os poços cuja média dos valores obtidos foi igual ou superior 3. No entanto, o presente trabalho irá levar em consideração apenas os resultados mais promissores, os quais apresentaram atividade com valor de 4 ou 5. Tanto os extratos fúngicos quanto os extratos vegetais foram testados a uma concentração de 1 mg/mL. Dos 540 extratos testados, 85 deles (15,74%) foram ativos, sendo que 60 (70,59%) inibiram apenas as sementes de *Lactuca sativa*, 17 (20%) inibiram apenas as sementes de *Allium schoenoprasum* e oito (9,41%) inibiram ambas as sementes. Em relação aos extratos vegetais, a folha apresentou o mesmo valor de atividade herbicida para ambas as sementes ( $4,5 \pm 1$ ), o caule apenas para a semente de *Lactuca sativa* ( $4,5 \pm 0,5$ ) e a raiz não apresentou atividade.

Dentre os extratos avaliados, alguns foram capazes de inibir em 100% a germinação das sementes, onde 24 (28,23%) extratos apresentarem 100% de inibição para pelo menos uma das sementes e destes, três isolados – *Nectriaceae* sp. UFMGCB 15449, UFMGCB 15601 e UFMGCB 15784 – foram ativos para ambas as sementes. Os táxons ativos identificados são pertencentes a *Fusarium* (4 isolados), *Diaporthe* (4 isolados), *Lasiodiplodia* (4 isolados) e *Xylariaceae* (6 isolados). O isolado UFMGCB 15799 foi identificado em nível de filo como *Ascomycota* sp. e apresentou atividade herbicida e antimalárica.

A atividade herbicida de plantas do gênero *Piper* já foi relatada por alguns autores. Dayan et al. (2015) relataram atividade herbicida de amplo espectro sobre ervas daninhas relacionada a amida Sarmentina isolada do fruto da planta *Piper longum*. Xuan et al. (2003), avaliaram a atividade herbicida da espécie *Piper methysticum*, a qual apresentou potencial atividade contra as ervas daninhas *Monochoria vaginalis* e *Echinochloa crus-galli*. Schulz et al. (1999) compararam a atividade herbicida de fungos endofíticos isolados de uma ampla variedade de árvores, arbustos e plantas herbáceas decíduas e coníferas da Alemanha com fungos provenientes do solo, fungos epifíticos e fitopatogênicos. A proporção de isolados endofíticos que produziram substâncias com atividade herbicida foi três vezes maior do que os isolados do solo e duas vezes maior do que os fungos fitopatogênicos. Schulz et al. (2002) isolaram fungos endofíticos de plantas provenientes da Alemanha, Costa Rica e Ilha da Mallorca (Espanha) e 43% dos fungos endofíticos isolados apresentaram atividade herbicida frente a alga *Chorella fusca*. Amorim (2018), ao estudar os fungos endofíticos provenientes da planta *Lafoensia pacaria*, obteve 233 extratos fúngicos, dentre os quais 46 apresentaram

atividade herbicida contra as sementes de *Lactuca sativa* e *Allium schoenoprasum*, 21 para ambas as sementes, 21 para *Allium schoenoprasum* e 4 para *Lactuca sativa*.

O Brasil, desde 2009, é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Maciel et al. 2017). Os herbicidas, no Brasil, representam 45% do total de agrotóxicos e esse número vem aumentando, já que ervas daninhas têm se tornado cada vez mais resistentes a esses compostos (Carneiro et al. 2015). Dessa forma, os herbicidas produzidos em sistemas naturais, como os produzidos por meio dos metabólitos secundários isolados a partir de fungos endofíticos, no lugar dos químicos comercializados hoje em dia, podem ser uma alternativa para reduzir os impactos ambientais e à saúde humana.

10

### 5.2.2 Determinação da atividade antiviral

Um total de 363 extratos foram avaliados para atividade antiviral contra o DENV-2 em uma concentração de 20 mg/mL e foram considerados ativos aqueles que protegeram as células da infecção do vírus acima de 30%. Desta forma, apenas 30 (8%) foram considerados ativos e destes, 6 isolados apresentaram porcentagem maior que 70%. Nenhum extrato vegetal apresentou atividade. Os isolados UFMGCB 15544 e UFMGCB 15703, além de apresentarem atividade antiviral, também apresentaram atividade herbicida. Dos isolados identificados, apenas *Fusarium* sp. UFMGCB 15603 e *Diaporthe* sp. UFMGCB 15653 apresentaram atividade antiviral,  $76 \pm 2$  e  $70 \pm 3$ , respectivamente.

20

Na literatura, há apenas um relato de fungos endofíticos que apresentaram atividade antiviral contra o vírus da dengue. Peyrat et al. (2017) isolaram 38 endofíticos das folhas e da casca da *Diospyros carbonaria*, onde os extratos de acetato de etila de apenas 9 isolados, pertencentes aos gêneros *Phomopsis* sp., *Syncephalastrum* sp., *Botryosphaerales* sp. e *Aspergillus* sp., apresentaram inibição da replicação do vírus DENV-NS5 sem citotoxicidade a 10 µg/mL. No entanto, há relatos sobre a atividade antiviral a partir de fungos endofíticos contra outros vírus. Zhang et al. (2011) testaram 8 substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Emericella* sp. associado à planta de mangue *Aegiceras corniculatum* contra o vírus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>. Das substâncias testadas, duas apresentaram atividade: Emerimidina A e Emerimidina B com valores de CI<sub>50</sub> de 42,07 µg/mL e 62,05 µg/mL, respectivamente. Isaka et al. (2001) testaram a atividade antiviral das substâncias Pulularina A, Pulularina B, Pulularina C contra o herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1). A melhor atividade foi expressa pela substância Pulularina A com CI<sub>50</sub> de 3,3 µg/mL (controle positivo Aciclovir com CI<sub>50</sub> de 1,9 µg/mL).

30

A dengue ressurgiu como um desafio de saúde pública em todo mundo com mais de 100 milhões de casos e 25.000 mortes sendo relatadas todo ano. Como não tem nenhuma vacina e nenhum tratamento licenciado, medidas preventivas são as melhores estratégias para o combate à doença (Mustafa et al. 2015). Dessa forma, moléculas bioativas produzidas pelos  
5 fungos endofíticos podem se tornar protótipos para o desenvolvimento de medicamentos no combate ao vírus causador da doença.

### 5.2.3 Determinação da atividade tripanosomicida

Dos 363 extratos fúngicos testados, apenas onze apresentaram atividade  
10 tripanosomicida (3%), onde nove apresentaram atividade maior que 70% e os extratos vegetais não apresentaram atividade. O isolado mais eficiente foi o *Fusarium* sp. UFMGCB 15299 com percentual de inibição de 95%. Além da atividade tripanosomicida, os isolados UFMGCB 15299, UFMGCB 15564, UFMGCB 15572, *Fusarium* sp. UFMGCB 15611, UFMGCB 15612 e UFMGCB 15615 também apresentaram atividade herbicida.

15 Rosa et al. (2010) testaram a atividade de 121 fungos endofíticos associados as plantas farmacológicas presentes no ecossistema brasileiro. Destes, 24 extratos inibiram a atividade da enzima Tripanotiona Redutase, que ajuda o parasita a manter um ambiente intracelular redutor, reduzindo seu substrato natural disulfídio de tripanotiona, sendo considerada alvo para potenciais drogas tripanosomicidas. Dentre estes, nove isolados que apresentaram  
20 atividade  $\geq 90\%$  no ensaio da TryR foram testados contra o parasita *T. cruzi*, onde três isolados, um não cultivável e os outros dois pertencentes ao gênero *Gibberella*, inibiram o crescimento do parasita em uma porcentagem maior ou igual a 60%, apresentando valores de  $CI_{50}$  entre 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Ferreira et al. (2013) também testaram a atividade tripanosomicida de 209 extratos fúngicos provenientes de fungos endofíticos associados à *Carapa guianensis*  
25 Aublet (andiroba). Apenas 3 isolados foram ativos e *Phomopsis* sp. UFMGCB 4830 inibiu em 100% o desenvolvimento das formas amastigotas de *T. cruzi*.

Amorim (2018) testou a atividade tripanosomicida de 233 fungos endofíticos provenientes da planta *Lafoensia pacaria*, onde 21 deles apresentaram atividade em uma triagem inicial e no reteste, apenas em 14 deles foi confirmada a atividade. E após o recultivo,  
30 apenas quatro mantiveram a atividade frente ao parasita: *Valsariaceae* sp., *Coniothyrium* sp., *Aspergillus aculeatus* e um isolado não identificado.



A OMS estima que o número de pessoas infectadas com o *T. cruzi* em todo o mundo varia de 6 a 7 milhões (Dias et al. 2016). Desde a década de 1970, as drogas mais eficientes e utilizadas para o tratamento da Doença de Chagas são o Benznidazol e o Nifurtimox. No entanto, essas drogas possuem reações adversas quando administradas, o que causa, um  
5 abandono no tratamento por muitos pacientes (Aldasoro et al. 2018). Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que as moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos podem ser promissoras na ação contra o *T. cruzi*, assim, mais estudos precisam ser feitos, para que, no futuro, elas possam ser utilizadas na prevenção e/ou no tratamento da doença.

10

#### 5.2.4 Determinação da atividade leishmanicida

Dos 540 extratos produzidos, apenas os extratos de UFMGCB 15817, *Xylariaceae* sp. UFMGCB 15818, UFMGCB 15825, *Colletotrichum* sp. UFMGCB 15826 e *Colletotrichum gigasporum* UFMGCB 15841 apresentaram atividade de inibição/morte do parasita *L.*  
15 *amazonensis*. Os extratos vegetais não apresentaram atividade. *Colletotrichum gigasporum* UFMGCB 15841 apresentou maior inibição do parasita com percentual de inibição de 72%, bem como atividade herbicida frente à *A. schoenoprasum* de 3,5. O extrato UFMGCB 15817 também apresentou atividade antimalárica com porcentagem de 56%.

A atividade leishmanicida de fungos endofíticos já foi relatada por diversos autores.  
20 Cota et al. (2018) isolaram as substâncias Ácido 10-acetil tricoderônico, Ácido 6'-acetoxipilifórmico e Ácido hidroheptelídico a partir do fungo endofítico *Nectria pseudotrichia*, o qual foi isolado da planta *Caesalpinia echinata*, as quais apresentaram atividade contra forma amastigota de *L. braziliensis*, com valores de  $CI_{50}$  de 21,4  $\mu$ M, 28,3  $\mu$ M e 24,8  $\mu$ M, respectivamente.

25 Brissow et al. (2017) obtiveram o composto 18-des-hidroxi citocalasina H do fungo endofítico *Diaphorte phaseolorum*, isolado a partir das raízes de *Combretum lanceolatum*, tendo como resultado uma redução da viabilidade de *L. amazonensis* com  $CI_{50}$  de 9,2  $\mu$ g/mL. Já Alves et al. (2018) isolaram lipases dos fungos endofíticos *Vermisporium-like*, *Emericella nidulans*, *Dichotomophthora portulacae* e *Dichotomophthora boerhaaviae* isolados das  
30 sementes da planta *Jatropha curcas* L. e avaliaram o seu potencial leishmanicida contra *L. amazonensis*. Todos os extratos inibiram a proliferação celular em uma concentração de 5

mg/mL, exibindo efeito antiproliferativo igual ao padrão Glucantime (Antimoniato de meglumina) (250 µg/mL) depois de 24 horas.

As leishmanioses afetam os seres humanos em 98 países por mais de 20 espécies de *Leishmania* diferentes. Segundo a Organização Mundial da Saúde há aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose cutânea por ano (Hailu et al. 2016). Com os resultados aqui apresentados, fica evidente que há a possibilidade de novas drogas leishmanicidas provenientes de fungos endofíticos, porém é preciso estudos mais aprofundados nesta área.

### 10 5.2.5 Atividade antimalárica

Dos 177 extratos testados, 44 extratos (25%) apresentaram atividade antimalárica, mas somente 11 (6,21%) apresentaram inibição do parasita maior que 70%. Os extratos vegetais não apresentaram atividade. O isolado UFMGCB 15601 foi o que apresentou maior atividade antimalárica (92,31%), bem como 100% de atividade herbicida contra *L. sativa* e *A. schoenoprasum*. Os extratos dos fungos UFMGCB 15582, UFMGCB 15744, UFMGCB 15784, UFMGCB 15787, UFMGCB 15788, *Nectriaceae* sp. UFMGCB 15795, *Ascomycota* sp. UFMGCB 15799, UFMGCB 15805, UFMGCB 15828 e UFMGCB 15830 também apresentaram atividade herbicida frente pelo menos uma das sementes testadas.

Isaka et al. (2001) isolaram duas substâncias, Fomoxantana A e Fomoxantana B, do fungo endofítico *Phomopsis* sp. com atividade significativa contra o *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  de 0,11 e 0,33 µg/mL, respectivamente. Já Tansuwan et al. (2007) isolaram duas Benzoquinonas, 2-cloro-5-metoxi-3-metilciclo-hexa-2,5-dieno-1,4-diona e Xilariaquinona A, do fungo endofítico *Xylaria* sp., atividade *in vitro* contra o mesmo parasita com  $IC_{50}$  de 1,84 e 6,68 µM, respectivamente. Monocerina e 11-hidroximonicina, duas substâncias isoladas do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* associado a *Stenoma* sp., também apresentaram atividade contra o parasita causador da malária com  $IC_{50}$  0,68 e 7,70 µM, respectivamente (Sappanan et al. 2008). O extrato etanólico do fungo endofítico *Phomopsis archeri* isolado do caule da *Vanilla albidia* apresentou atividade antiparasitária com  $IC_{50}$  de 5,0 µg/mL (Hemtasin et al. 2011).

Higginbotham et al. (2013) isolaram 3307 fungos endofíticos das folhas de 3.198 plantas coletadas em Parques Nacionais do Panamá. Destes 2.121 foram testados contra o *P.*

*falciparum*, onde 358 (16,9%) foram ativos. Esses trabalhos mostram o potencial dos metabólitos secundários na produção de novos fármacos capazes de inibir o parasita, auxiliando na prevenção e no tratamento da doença.

### 5 5.3 Identificação dos fungos endofíticos biologicamente ativos

Após o agrupamento morfológico dos isolados de fungos endofíticos obtidos, foi utilizada a análise de perfis moleculares utilizando-se a técnica de PCR microssatélite [iniciador (GTG)<sub>5</sub>]. Em seguida, um isolado de cada grupo foi escolhido para o sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rDNA ou da região  $\beta$ -tubulina do rDNA (**Tabela 3**). Ao todo, 107 fungos apresentaram, ao menos, uma atividade biológica de interesse. No entanto, não foi possível a identificação de 45 (42,06%), porque não amplificaram a região ITS e/ou  $\beta$ -tubulina. Outros 23 isolados também não foram identificados quando sequenciados, uma vez que, não apresentaram sequências de qualidade para comparação no banco de dados. A não identificação de alguns fungos pode estar associada à não obtenção de um DNA bruto de boa qualidade, tornando inviável a amplificação das regiões propostas. Segundo Malvick e Grunden (2005), o método da PCR é simples e rápido, porém alguns problemas podem surgir como substâncias que inibem a amplificação do DNA. Alguns isolados produziram metabólitos secundários que foram capazes de mudar a coloração do meio de cultura, impossibilitando a recuperação de DNA translúcido. De acordo com Sahu et al. (2012), a obtenção de um DNA puro, intacto e de alta qualidade é crucial para qualquer estudo molecular e os metabólitos secundários podem influenciar diretamente, uma vez que, eles podem inibir as reações de amplificação, bem como as de sequenciamento.

Dos 39 táxons identificados, 13 mostraram pouca semelhança com a região ITS ou com a região  $\beta$ -tubulina quando confrontado com as espécies fúngicas conhecidas depositadas no GenBank e/ou apresentaram informações inconclusivas. Dez desses táxons foram identificados em nível de família (*Xylariaceae* sp., *Diaportheaceae* sp. e *Nectriaceae* sp.), dois em ordem (*Hypocreales* sp. e *Pleosporales* sp.) e um em filo (*Ascomycota* sp.). Esses dados sugerem que esses isolados podem se tratar de espécies novas ainda não descritas.

Os isolados UFMGCB 15449, UFMGCB 15617 e UFMGCB 15795, identificados como *Nectriaceae* sp., apresentaram atividade herbicida e o isolado UFMGCB 15795 também

apresentou atividade antimalárica. Dentre os gêneros pertencentes a esta família, um deles é o *Fusarium*. Cinco isolados foram identificados como *Fusarium* sp. e apresentaram pelo menos uma das seguintes atividades: herbicida (UFMGCB 15299, UFMGCB 15395, UFMGCB 15403 e UFMGCB 15611), antiviral (UFMGCB 15603) e tripanosomicida (UFMGCB 5 15611). Nesse gênero há um grande número de espécies que produzem diferentes metabólitos secundários biologicamente ativos (Moretti, 2009). Fato que está relacionado com a grande diversidade genética, biológica e ecológica existente dentro das espécies pertencentes a *Fusarium* (Stępień *et al.*, 2019). Na literatura não há relatos de espécies de *Fusarium* capazes de produzir substâncias com atividade antiviral, principalmente frente ao vírus DENV-2. Por 10 outro lado, a atividade tripanosomicida de fungos deste gênero já foi relatada. Campos *et al.* (2015), isolaram 82 fungos endofíticos do caule e da casca da planta *Caesalpinia echinata* e o extrato do fungo *Fusarium* sp. inibiu o parasita *T. cruzi* em 40% numa concentração de 20 mg/mL. Ao fazer o fracionamento do extrato orgânico deste fungo, observou-se que ele produz uma substância conhecida como Beauvericina, responsável pela atividade 15 tripanosomicida. Além disso, Osborne *et al.* (2002) concluíram que a resistência de ratos ao parasita *T. cruzi* estava relacionada com a substância Fumonisina, quando eles foram alimentados com material de cultura do fungo *Fusarium verticillioides*. Vesper *et al.* (1992) analisaram a fitotoxicidade de cinco compostos produzidos pelo fungo *Fusarium moniliforme*: Fumonisina B<sub>1</sub>, Ácido fusárico, Ácido 4-acetamido-4hidroxi-2-butenóico, Ácido 9,10- 20 dihidroxifusárico e Moniliformina frente a *Lemna minor* (lentilha). Fumonisina B<sub>1</sub> foi a substância mais ativa, reduzindo o crescimento da planta em 53%. O Ácido fusárico reduziu a taxa de crescimento em 59%, o Ácido 4-acetamido-4hidroxi-2-butenóico em 62%, o Ácido 9,10-dihidroxifusárico em 22% e a Moniliformina teve uma menor taxa de redução do crescimento com 16%.

25

**Tabela 4.** Identificação molecular dos fungos endofíticos produtores de metabólitos bioativos associados à *Piper* sp.

Órgão da planta	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Nº de isolados	Resultado Top Blast (Nº de acesso no GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de pb analisados	Táxon proposto
Caule	15379 <sup>1</sup>	1	<i>Diaporthe kochmanii</i> (NR111614) <sup>b</sup>	99	96,31	376	<i>Diaportheceae</i> sp.
	15325 <sup>1</sup>	1	<i>Diaporthe longicolla</i> (NR144924) <sup>b</sup>	100	97,64	424	<i>Diaporthe</i> sp. 1
	15338 <sup>1</sup>	1	<i>Diaporthe</i> sp. (MG828894) <sup>b</sup>	100	98,98	392	<i>Diaporthe</i> sp. 2
	15653 <sup>2</sup>	1	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> (NR111862) <sup>b</sup>	100	98,65	368	<i>Diaporthe</i> sp. 3
	15299 <sup>1,3</sup>	1	<i>Fusarium concolor</i> (MH855479) <sup>b</sup>	100	97,69	387	<i>Fusarium</i> sp. 1
	15395 <sup>1</sup>	2	<i>Fusarium continuum</i> (NR159818) <sup>b</sup>	98	93	381	<i>Fusarium</i> sp. 2
	15416 <sup>1</sup>	1	<i>Fusarium fujikuroi</i> (AB725606) <sup>c</sup>	60	94,62	310	<i>Hypocreales</i> sp. 1
	15725 <sup>1</sup>	1	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> (MH863401) <sup>b</sup>	100	100	381	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1
	15335 <sup>1</sup>	1	<i>Muscodor equiseti</i> (NR154155) <sup>b</sup>	100	99	421	<i>Muscodor</i> sp. 1
	15362 <sup>1</sup>	2	<i>Nemania primolutea</i> (EF026121) <sup>b</sup>	98	95,17	417	<i>Xylariaceae</i> sp. 1
	15348 <sup>1</sup>	1	<i>Nigrospora pyriformis</i> (NR153469) <sup>b</sup>	100	99,04	416	<i>Nigrospora</i> sp. 1
	15822 <sup>1</sup>	2	<i>Nigrospora pyriformis</i> (KY019457) <sup>c</sup>	96	98,44	266	<i>Nigrospora</i> sp. 2
	15432 <sup>1</sup>	1	<i>Pestalotiopsis kenyana</i> (NR147549) <sup>b</sup>	100	98,69	382	<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1
	15349 <sup>1</sup>	1	<i>Phyllosticta capitalensis</i> (MH865128) <sup>b</sup>	100	99,5	404	<i>Phyllosticta</i> sp. 1
	15377 <sup>1</sup>	2	<i>Xylaria bambusicola</i> (NR153200) <sup>b</sup>	100	93,81	415	<i>Xylariaceae</i> sp. 2
Folha	15442 <sup>1</sup>	1	<i>Colletotrichum gigasporum</i> (NR145380) <sup>b</sup>	99	100	391	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
	15466 <sup>1</sup>	1	<i>Colletotrichum lentis</i> (MH864628) <sup>b</sup>	100	100	301	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
	15826 <sup>1,5</sup>	1	<i>Colletotrichum theobromicola</i> (MH863434) <sup>b</sup>	100	99,71	343	<i>Colletotrichum</i> sp. 2

Órgão da planta	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Nº de isolados	Resultado Top Blast (Nº de acesso no GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de pb analisados	Táxon proposto
Folha	15458 <sup>1</sup>	1	<i>Diaporthe passifloricola</i> (NR147595) <sup>b</sup>	99	96,8	468	<i>Diaporthe</i> sp. 4
	15451 <sup>1</sup>	1	<i>Diaporthe rosae strain</i> (MG843878) <sup>c</sup>	100	94,04	386	<i>Diaporthe</i> sp. 5
	15743 <sup>1</sup>	1	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i> (NR147350) <sup>b</sup>	98	100	361	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1
	15449 <sup>1</sup>	1	<i>Neocosmospora gamsii</i> (NR159548) <sup>b</sup>	99	95,18	349	<i>Nectriaceae</i> sp. 1
	15831 <sup>1</sup>	1	<i>Neopestalotiopsis brasiliensis</i> (MG686469) <sup>b</sup>	100	99,49	391	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1
	15443 <sup>1</sup>	1	<i>Neopestalotiopsis musae</i> (KX789686) <sup>b</sup>	100	98,45	323	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2
	15447 <sup>1</sup>	2	<i>Xylaria bambusicola</i> (NR153200) <sup>b</sup>	100	93,81	415	<i>Xylariaceae</i> sp. 3
Raiz	15853 <sup>1</sup>	1	<i>Acrocalymma fici</i> (NR137953) <sup>b</sup>	100	95,67	392	<i>Pleosporales</i> sp. 1
	15841 <sup>1,5</sup>	1	<i>Colletotrichum gigasporum</i> (NR145380) <sup>b</sup>	100	100	332	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
	15611 <sup>1,3</sup>	1	<i>Fusarium concolor</i> (MH855479) <sup>b</sup>	97	99,69%	331	<i>Fusarium</i> sp. 3
	15603 <sup>2</sup>	1	<i>Fusarium zealandicum</i> (NR138298) <sup>b</sup>	97	93,51	393	<i>Fusarium</i> sp. 4
	15795 <sup>1,4</sup>	2	<i>Fusarium zealandicum</i> (NR138298) <sup>b</sup>	98	93,45	402	<i>Nectriaceae</i> sp. 2
	15786 <sup>1</sup>	2	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> (MH863401) <sup>b</sup>	100	100	367	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2
	15799 <sup>1,4</sup>	1	<i>Pseudolachnella brevicoronata</i> (NR154277) <sup>b</sup>	95	88,45	366	Ascomycota sp.

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade. <sup>b</sup> Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. <sup>c</sup> Identificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos do gene da  $\beta$ -tubulina. <sup>1</sup>Atividade herbicida. <sup>2</sup>Atividade antiviral. <sup>3</sup>Atividade contra *Trypanosoma. cruzi*. <sup>4</sup>Atividade contra *Plasmodium falciparum*. <sup>5</sup>Atividade contra *Leishmania amazonensis*.

Fumosina B1 também já foi isolada do fungo *F. nygamai* e o seu potencial bioherbicida foi avaliado em sementes de *Striga hermonthica* e *Striga asiatica*. A substância foi aplicada durante a fase de condicionamento das sementes, reduzindo a taxa de germinação das duas sementes em uma faixa de 19,8-32,2% e 34,5-47,6%, respectivamente (Kroschel e Elzein, 2004). A Mevalocidina isolada de *Fusarium* sp. também mostrou atividade herbicida em espécies de folhas largas e gramíneas. Essa atividade foi mais intensa, quando aplicada na pós-emergência das plantas, com mais de 50% de lesões observadas em todas as espécies na pós-emergência a 4 kg/ha após 16 dias (Gerwick et al. 2013).

Seis isolados foram identificados como pertencentes à família *Xylariaceae*. Dos fungos pertencentes a este táxon, 5 (UFMGCB 15300, UFMGCB 15362, UFMGCB 15377, UFMGCB 15447 e UFMGCB 15536) apresentaram atividade herbicida e um isolado (UFMGCB 15818) apresentou atividade leishmanicida. *Xylariaceae* é uma das maiores e mais importantes famílias pertencentes ao filo *Ascomycota*. Representa um dos grupos mais predominantes entre os endofíticos e vêm despertando interesse, uma vez que, são fontes de vários metabólitos secundários (Stadler, 2011). Dentro de *Xylariaceae* encontramos o gênero *Xylaria* que tem mais de 100 espécies descritas (Macías-Rubalcava e Sánchez-Fernández, 2016). García-Méndez et al. (2016) isolaram a partir do fungo endofítico *X. feejeensis*, associado a *Sapium macrocarpum*, três substâncias naturais já conhecidas: Coriloxina, 2-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona e Fumiquinona. Eles testaram a fitotoxicidade destas três substâncias e de outros quatro novos derivados da Coriloxina, sendo capazes de inibir a germinação da semente, o crescimento das raízes e a capacidade de capturar oxigênio das plantas *Trifolium pratense*, *Medicago sativa*, *Panicum miliaceum* e *Amaranthus hypochondriacus*.

Foram identificados 6 isolados pertencentes a *Diaportheaceae*. Destes, o isolado *Diaportheaceae* sp. UFMGCB15379 foi identificado apenas em nível de família e os outros 5 isolados identificados em nível de gênero como *Diaporthe* sp. Dos quais, 4 apresentaram atividade herbicida (UFMGCB 15325, UFMGCB 15338, UFMGCB 15451 e UFMGCB 15458) e 1 antiviral (UFMGCB 15653). Várias espécies deste gênero têm sido descritas como endofíticas de diversas espécies de plantas (Guanatilaka, 2006; Firákóva et al. 2007; Abreu et al. 2010; Rosa et al. 2011; Higginbotham, 2013; Deshmukh et al. 2014; Correia et al. 2018). Espécies *Diaporthe* são conhecidos como produtores de enzimas e outros metabólitos secundários com atividades biológicas como antibióticos, anticancerígenos, metabólitos com atividade lignocelulolítica e herbicida, além de impedir a herbivoria (Gomes et al. 2013). Pes

(2015), avaliou a atividade herbicida dos metabólitos secundários do fungo *Diaporthe* sp. frente às sementes das espécies *Lolium multiflorum*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Cucumis sativus*, *Glycine max* e *Sorghum halepense*. O filtrado proveniente do caldo de fermentação inibiu em 100% a germinação de todas as espécies. Não se tem muitos relatos sobre a atividade antiviral deste gênero contra o vírus DENV-2. Mas Peyrat et al. (2017) relatou que *Phomopsis* sp. (forma sexuada de *Diaporthe* sp.) foi capaz de inibir a replicação do vírus DENV-NS5.

O isolado UFMGCB 15535 foi identificado como *Muscodor* sp. e apresentou atividade herbicida. Espécies deste gênero têm sido relatadas como produtoras de compostos voláteis orgânicos bioativos que são letais para uma ampla quantidade de fungos e bactérias patogênicos em plantas e em humanos (Strobel, 2011). Não há relatos na literatura sobre atividade herbicida apresentada por fungos deste gênero.

Os isolados UFMGCB 15348, 15822 e 15851 apresentaram atividade herbicida e foram identificados como *Nigrospora* sp. Na literatura, não há relatos de fungos endofíticos do gênero *Nigrospora* com atividade herbicida. No entanto, Fukushima (1997) isolaram três lactonas do extrato de acetato de etila do fungo *Nigrospora sacchari*, isolado de folhas doentes de *Canna indica*, e analisaram a atividade herbicida delas frente ao capim-arroz (*Echinochola crus-galli*), foxtail verde (*Setaria viridis*), amaranto esbelto (*Amaranthus viridis*) e folhas de veludo (*Abutilon theophrasti*). A substância que teve maior efeito herbicida foi a Fomalactona que causou lesões na área onde foi aplicada dentro de 24 horas em uma concentração de 1000 ppm. Plântulas e plantas maduras de *Sporobolus fertilis* foram inoculadas com conídios de *Nigrospora oryzae* por meio de escoamento superficial, aplicação na copa e usando spray. As plantas inoculadas com os conídios foram as menores, com maiores proporções de folhas mortas do que as plantas controle, além de apresentarem maiores proporções de folhas necróticas em todos os tratamentos que o controle (Durai, 2008). Além da atividade herbicida, metabólitos secundários dos fungos pertencentes ao gênero *Nigrospora* têm sido relatados com outras atividades biológicas como antimicrobiana (Tanaka, 1997; Kim et al. 2001; Yang et al. 2012; Zhao et al. 2012; Pawle, 2014) e antioxidante (Pawle 2014).

O isolado *Phyllosticta* sp. UFMGCB 15349 apresentou atividade herbicida. Este gênero vem sendo amplamente relatado como fungo endofítico (Leuchtman et al. 1992; Pandey et al. 2003; Glienke et al. 2011; Wikee et al. 2013). A atividade herbicida de fungos



endofíticos pertencentes ao gênero *Phyllosticta* ainda não foi relatada, mas já se sabe que estes fungos, isolados de outros substratos, já foram descritos com tal atividade. Zonno et al. (2008) isolaram a substância Phyllostictine A do fungo *Phyllosticta cirsii*, a qual foi fitotóxica para protoblastos de tabaco e protoblastos de *Cirsium arvense*. Evidente et al. (2008) estudaram a atividade desta mesma substância e de outras três – Phyllostictine B, C e D –, isoladas da mesma espécie de fungo, contra a mesma erva daninha, *Cirsium arvense*. A Phyllostictine A foi a mais tóxica para a planta e eles notaram que essa atividade está relacionada com a liberdade conformacional do anel macrocíclico, as Phyllostictine B e D tiveram atividade moderada e a toxicidade foi totalmente perdida na Phyllostictine C. Outras atividades biológicas de metabólitos secundários produzidos por fungos pertencentes a este gênero já foram relatadas, como por exemplo, anticancerígena, (Kumaran et al. 2008) e antioxidante (Srinivasan et al. 2010).

O isolado *Hypocreales* sp. UFMGCB 15416 também apresentou atividade herbicida. Na ordem *Hypocreales* estão inseridas as famílias *Hypocreaceae*, *Nectriaceae*, *Bionectriaceae*, *Clavicipitaceae* e *Niessliaceae* (Gams et al. 2004). Diversos trabalhos têm descrito fungos pertencentes a esta ordem como sendo produtores de metabólitos secundários bioativos. Zhu et al. (2013) isolaram duas substâncias – 1R, 6R, 7R,10S,10-hidroxi-4(5)-cadinen-3-ona e (R)-5,6-di-hidro-6-pentil-2H-piran-2-ona – do fungo *Hypocreales* sp. obtido da esponja *Gelliodes carnosus*, que apresentaram atividade anti-inflamatória moderada. Fungos desta ordem têm sido descritos como entomopatógenos e alguns deles são fungos endofíticos como *Beauveria bassiana* e *Lecanicillium* spp. que são utilizados como controles biológicos, tanto no controle de insetos considerados pragas quanto no controle de patógenos de plantas (Ownley et al. 2010).

*Pestalotiopsis* sp. UFMGCB 15432, *Neopestalotiopsis* sp. UFMGCB 15443 e 15831 apresentaram atividade herbicida. Espécies destes gêneros são constantemente descritas como endofíticas (Lee et al. 1996; Guo et al. 2008; Santos et al. 2015; Zhao et al. 2015; Chen et al. 2016; Samaga e Rai, 2016; Bhattacharya et al. 2018). Não há muitos relatos sobre a atividade herbicida de *Pestalotiopsis* sp., porém atividades biológicas de substâncias isoladas deles, já são conhecidas como antimicrobiana (Tejesvi et al. 2007; Oliveira et al. 2011); anticancerígena (Kumaran et al. 2010); antioxidante e imunossupressante (Xu et al. 2010).

Quatro isolados foram identificados como pertencentes a *Colletotrichum* – *Colletotrichum* sp. UFMGCB 15466 e 15826, *Colletotrichum gigasporum* UFMGCB 15442 e 15841. Espécies deste gênero são descritas como endofíticas em uma grande variedade de

plantas (Gonzaga et al. 2014). Neste trabalho, os isolados pertencentes ao gênero *Colletotrichum* apresentaram atividade herbicida, sendo que *Colletotrichum gigasporum* UFMGCB 15826 apresentou também atividade leishmanicida. Esta espécie tem aplicações biológicas como micoherbicidas. Duas substâncias conhecidas como Collego e Lubao são micoherbicidas originados destes fungos. Collego é uma preparação de conídios secos de *Colletotrichum aeshynomenesis* solúveis em água, utilizado para controlar *Aeshynomene virginica*, erva daninha anual, nativa em campos de arroz e soja nos Estados Unidos. *C. gloeosporioides* foi desenvolvido como um micoherbicida Lubao 1, contra *Cuscuta australis* e *Cuscuta chinensis* (Jayawardena et al. 2016). Há poucos relatos sobre a atividade leishmanicida de fungos deste gênero na literatura. Fátima et al. (2016) cita que dentre outras espécies, *Colletotrichum* sp. inibiu *L. amazonensis* com valores de IC<sub>50</sub>, variando entre 4,60 a 24,40 µg/mL.

Os isolados UFMGCB 15607, 15725, 15743 e 15786, os quais também apresentaram atividade herbicida foram identificados como *Lasiodiplodia* sp. –Várias espécies deste gênero já foram isoladas como endofíticas e apresentaram atividades biológicas como antimicrobiana e anticancerígena (Mohali et al. 2005; Deng et al. 2014; Chen et al. 2016). Adetunji et al. (2017) produziram várias formulações de bioherbicidas, utilizando o isolado *Lasiodiplodia pseudotheobromae* obtido de pequenas lesões cloróticas e necróticas de folhas de *Tridax procumbens*, contra *Amaranthus hybridus*. Todas as formulações tiveram resultado significativo e a formulação denominada BH4 (32 g de sêmola + 6 g de caulim + 20 mL de glicerol + cepa mutante de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* + glicose + sacarose + frutose + dextrose + açúcar lactose + peptona) foi a mais ativa quando comparada com as outras.

Um isolado identificado em ordem, *Pleosporales* sp. UFMGCB 15853, apresentou atividades herbicida. Fungos pertencentes a esta ordem já foram descritos como endofíticos (Glenn e Bodri, 2012; Orlandelli et al. 2012; Yang et al. 2016). A atividade herbicida destes fungos já foi relatada, por exemplo, por Vieira e Barreto (2010) e Masi e colaboradores (2013).

Todos os fungos filamentosos identificados neste trabalho pertencem ao filo *Ascomycota*. Alguns estudos sugerem que os principais grupos de fungos endofíticos pertencem a este filo. Os gêneros mais encontrados foram *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Xylaria*, os quais são frequentemente obtidos de espécies vegetais presentes em ambientes tropicais e temperados (Promputtha, 2007; Rodriguez et al. 2009).

## 6. CONCLUSÕES

O Brasil tem uma das maiores diversidades de plantas do mundo e conseqüentemente um grande reservatório de micro-organismos endofíticos, os quais são potenciais produtores de metabólitos secundários bioativos com possíveis aplicações em diversas áreas, entre elas a terapêutica e agrônoma. Com o presente trabalho foi possível avaliar a comunidade de fungos endofíticos associados a *Piper* sp. e o seu potencial como fonte de metabólitos secundários bioativos, concluindo que:

- As folhas, caules e raízes desta planta podem ser considerados um reservatório de possíveis espécies novas de fungos filamentosos;
- O total de isolados de fungos endofíticos foi menor na raiz, o que pode estar relacionado com a produção da substância 1-butil-3,4metilendioxibenzeno, que está relacionada diretamente com os mecanismos de defesa da planta;
- Os fungos filamentosos associados à *Piper* sp., em sua maioria, já são conhecidos por serem endofíticos;
- Com o sequenciamento da região ITS ou da  $\beta$ -tubulina foi possível identificar alguns isolados em nível de filo, ordem, família, gênero ou espécie. Para conseguir chegar ao nível de espécie, novas técnicas deverão adotadas;
- Os extratos biologicamente ativos podem ser considerados candidatos a estudos de isolamento e caracterização dos metabólitos ativos;
- A comunidade de fungos endofíticos associados a *Piper* sp. pode ser considerada uma fonte promissora de potenciais produtores de metabólitos secundários bioativos, que podem vir a ser explorados em novos estudos para determinar possíveis utilizações como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Tais fatos reforçam a importância de estudos sobre as plantas e micro-organismos presentes no ecossistema brasileiro, uma vez que estes podem ser fontes de produtos naturais com aplicações terapêuticas e aplicações na agricultura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Heidelberg, v. 9, n. 4, p. 559–566, 2010.
- 5 ADETUNJI, C. O.; OLOKE, J. K.; PRASAD, G. S.; ADEJUMO, I. O. Effect of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* isolates, a potential bioherbicide for *Amaranthus hybridus* L. in maize culture. **Notulae Scientia Biologicae**, Roménia, v. 1, n. 1, p. 131-137, 2017.
- AIME, M. C.; BREARLEY, F. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species discovery. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 21, n. 9, p.  
10 2177-2180, 2012.
- ALDASORO, E.; POSADA, E.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; CALVO-CANO, A.; SERRET, N.; CASELLAS, A.; SANZ, S.; SOY, D.; PINAZO, J.; GASCON, J. What to expect and when: Benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 73, n. 4, p. 1060–1067, 2018.
- 15 ALMEDA, F.; ASTORGA, L.; ORELLANA, A.; SAMPUEL, L.; SIERRA, P.; GAITÁN, I.; CÁCERES, A. *Piper* genus: source of natural products with anti-tyrosinase activity favored in phytocosmetics. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, Estados Unidos, v. 2, n. 1, p. 6, 2015.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with  
20 great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011.
- AMORIM, S. S. Taxonomia, diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta *Lafoensia pacari* A. St. Hil. (mangava-brava) presente no Pantanal Mato-grossense. 2018. 153 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas,  
25 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- APARECIDO, H.; YAMAGUCHI, L. F.; CLÁUDIA, M.; YOUNG, M.; RAMOS, C. S. Antifungal piperamides from *Piper mollicomum* Kunth ( Piperaceae ). **Eclética Química Journal**, São Paulo, v. 43, n. May, p. 33–38, 2018.
- ARACHEVALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND, C. S.; RADCLIFFE, D. E. Effect of  
30 the Tall Fescue Endophyte on Plant Response to Environmental Stress. **Agronomy Journal**,

Madison, v. 81, n. 1, p. 83, 1989.

- ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M.; PEARSON, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGILL, A. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, McLean, v. 96, n. 1, p. 24–45, 2017.
- AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; SILVA, C. S. B. DA; SANTOS, G. K. N.; CÂMARA, C. A. G. D.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, Oxford, v. 100, n. 7, p. 2284–2288, 2009.
- BANO, N.; RIZVI, I. F.; SHARMA, N.; SIDDIQUI, M. H.; KALIM, M.; KHAN, A.; AKHTAR, S. Production of Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic fungi. **International Research Journal of Engineering and Technology**, Tamilnadu, v. 03, n. 06, p. 2395–56, 2016.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555–557, 2004.
- BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, Washington, v. 336, n. 6088, p. 1576–1577, 2012.
- BHARDWAJ, A.; AGRAWAL, P. K. A Review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Bulgaria, v. 3, n. 9, p. 228–237, 2014.
- BHATTACHARYA, S.; DEBNATH, S.; DAS, P.; SAHA, A. K. Diversity of fungal endophyte of *L. var. kew* from Unokoti district, Ananus comosus Tripura with bioactive potential of *Neopestalotiopsis piceana*. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, China, v. 5, n. 2, p. 353-360, 2019.
- BISCHOFF, K. M.; WICKLOW, D. T.; JORDAN, D. B.; REZENDE, S. T. DE; LIU, S.; HUGHES, S. R.; RICH, J. O. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. **Current Microbiology**, New York, v. 58, n. 5, p. 499–503,

2009.

BLASCHKE-HELLMESSEN, R.; SCHWARZE, R.; SCHMEISER, H.; WEIGL, I. **Microbial Ecology of Leaves**, New York: Springer, 1991, 504 p., v. 22.

- BRISSOW, E. R.; SILVA, I. P.; SIQUEIRA, K. A.; SENABIO, J. A.; PIMENTA, L. P.;  
5 JANUÁRIO, A. H., MAGALHÃES, L. G.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; JUNIOR,  
P. A. S.; SANTOS, J. L.; SOARES, M. A. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic  
compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum  
lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitology research**, New York, v. 116, n. 7, p. 1823-1830,  
2017.
- 10 BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; FLAMME, A. C. LA; VOORHIS, W. C. VAN.  
Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites  
expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.  
40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.
- CAMPOS, F. F.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; ARAÚJO, M. SS.; SIQUEIRA, E.  
15 P.; RESENDE, J. M.; ALVES, T. MA.; MARTINS-FILHO, O. A.; SANTOS, V. L.; ROSA,  
C. A.; ZANI, C. L.; COTA, B. B. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia  
echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite  
from *Fusarium sp.* **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 1, p. 1–  
10, 2015.
- 20 CARD, S. D.; HUME, D. E.; ROODI, D.; MCGILL, C. R.; MILLNER, J. P.; JOHNSON, R.  
D. Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica* – A review. **Biological Control**, San  
Diego, v. 90, p. 102–112, nov. 2015.
- CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; PINHEIRO,  
A. R. O.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIENDRICH, K.; MELLO, M. S. C.  
25 Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.;  
AUGUSTO, L. G. S.; FRIENDRICH, K.; BÚRIGO A. C. **Dossiê abrasco: um alerta sobre os  
impactos dos agrotóxicos na saúde**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Rio de  
Janeiro/ São Paulo, 2015, Capítulo 1, p. 49-87.
- CASELLA, T. M.; EPARVIER, V.; MANDAVID, H.; BENDELAC, A.; ODONNE, G.;  
30 DAYAN, L.; DUPLAIS, C.; ESPINDOLA, L. S.; STIEN, D. Antimicrobial and cytotoxic  
secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolation of antibacterial agent

- pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. **Phytochemistry**, England, v. 96, p. 370–377, 2013.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal American of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 42, p. 181–184, 1967.
- CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B. DE; OLIVEIRA, P. D. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A. DE; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. D. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. DE. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 141, n. 3, p. 975–981, 2012.
- CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. J. S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 22, n. 5, p. 481–486, 2006.
- CHEN, L.; ZHANG, Q. Y.; JIA, M.; MING, Q. L.; YUE, W.; RAHMAN, K.; QIN, L. P.; HAN, T. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, New York, v. 42, n. 3, p. 454-473, 2016.
- COHEN, J.; DUPAS, P.; SCHANER, S. Price Subsidies, Diagnostic Tests, and Targeting of Malaria Treatment: Evidence from a Randomized Controlled Trial. **American Economic Review**, Pittsburgh, v. 105, n. 2, p. 609–645, 2015.
- CORREIA, A. M.; LIRA, S. P.; ASSIS, M. A.; RODRIGUES, A. Fungal Endophyte Communities in *Begonia Species* from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Current microbiology**, New York, v. 75, n. 4, p. 441-449, 2018.
- COSTA, A. G. D.; SANTOS, J. D. D.; CONCEIÇÃO, J. K. T. D.; ALECRIM, P. H.; CASSEB, A. A.; BATISTA, W. C.; HECKMANN, M. I. O. Dengue: aspectos epidemiológicos e o primeiro surto ocorrido na região do Médio Solimões, Coari, Estado do Amazonas, no período de 2008 a 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 4, p. 471-474, 2011.
- COTA, B. B.; TUNES, L. G.; MAIA, D. N. B.; RAMOS, J. P.; OLIVEIRA, D. M. D.; KOHLHOFF, M.; ALVES, T. M. A.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CAMPOS, F. F.; ZANI, C. L. Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotrichia*, an endophytic fungus isolated

- from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 113, n. 2, p. 102-110, 2018.
- COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.
- CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JR., A.; MONACHE, DELLE, F.; KERBER, V. A.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Gênero *Ottonia*: uma revisão das principais características botânicas, fitoquímicas e biológicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínea, v. 7, n. 2, p. 17–21, 2005.
- 10 CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste in vivo. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 77–82, 2003.
- 15 DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D. K.; RUNYON, J. B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, New York, v. 148, n. 11, p. 3737-3741, 2002.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.
- 20 DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; WATSON, S. B.; ASOLKAR, R. N.; BODDY, L. G. Sarmentine, a natural herbicide from *Piper* species with multiple herbicide mechanisms of action. **Frontiers in Plant Science**, Suíça, v. 6, 2015.
- DENG, Z.; ZHANG, R.; SHI, Y.; TAN, H.; CAO, L. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, Suíça, v. 21, n. 3, p. 2346-2357, 2014.
- 25 DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in microbiology**, Suíça, v. 5, p. 715, 2015.
- DEVARAJAN, P.; SURYANARAYANAN, T. Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. **Fungal Diversity**, New York, v. 23, n. October
- 30



2006, p. 111–119, 2006.

DHARMARATNE, H. R. W.; NANAYAKKARA, N. P. D.; IKHLAS, A. K. Kavalactones from *Piper methysticum*, and their <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analyses. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 59, n. 4, p. 429–433, 2002.

5 DIAS, J. C. P.; RAMOS Jr., A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R.; TORRES, R. M.; MELO, J. R. C.; ALMEIDA, E. A.; OLIVEIRA Jr., W.; SILVEIRA, A. C.; REZENDE, J. M.; PINTO, F. S.; FERREIRA, A. W.; RASSI, A.; FILHO, A. A. F.; SOUZA, A. S.; FILHO, D. C.; JANSEN, A. M.; ANDRADE, G. M. Q.; BRITTO, C. F. D. P. C.; PINTO, A. Y. N.; RASSI Jr., A.; CAMPOS, D. E.;  
10 ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, S. E.; CHIARI, E.; HASSLOCHER-MORENO, A. M.; MOREIRA, E. F.; MARQUES, D. S. O.; SILVA, E. L.; MARIN-NETO, J. A.; GALVÃO, L. M. C.; XAVIER, S. S.; VALENTE, S. A. S.; CARVALHO, N. B.; CARDOSO, A. V.; SILVA, R. A.; COSTA, V. M.; VIVALDINI, S. M.; OLIVEIRA, S. M.; VALENTE, V. C.; LIMA, M. M.; ALVES, R. V. II Congresso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.

15 **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.

DOGNINI, J.; MENEGHETTI, E. K.; TESKE, M. N.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; VERDI, M.; GASPER, A. L. DE. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 24, n. 3, p. 241–244, 2012.

20 DUNSTAN, W. R.; GARNETT, H. The constituents of *Piper ovatum*. **Journal of the Chemical Society**, Cambridge, v. 67, n. Xii, p. 94–100, 1895.

DURAI, M. T. R. T. S. R. **Investigations into Group J herbicide resistance in *Nassella trichotoma* and *Sporobolus fertilis* and biological control of *S. fertilis* using the pathogen *Nigrospora oryzae***. 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Agrícola). Instituto Real  
25 de Tecnologia de Melbourne, Melbourne, 2008.

ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, China, v. 2, n. 2, p. S1081-S1085, 2012.

ESTRADA, C.; DEGNER, E. C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; BAEL, S. A. VAN. The  
30 role of endophyte diversity in protecting plants from defoliation by leaf-cutting ants. **Current Science**, Bangalore, v. 109, n. 1, p. 19–25, 2015.

- EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; CANTRELLI, C. L.; MOTTA, A. Phyllostictines A–D, oxazatricycloalkenones produced by *Phyllosticta cirsii*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Tetrahedron**, Inglaterra, v. 64, n. 8, p. 1612-1619, 2008.
- 5 FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; FILHO, R. B. Constituintes Químicos de *Ottonia corcovadensis* MIQ. da Floresta Amazônica – Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Hidrogênio e Carbono. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 79–83, 2004.
- FÁTIMA, N.; MUHAMMAD, S. A.; MUMTAZ, A.; TARIQ, H.; SHAHZADI, I.; SAID, M. S.; DAWOOD, M. Fungal metabolites and leishmaniasis: a review. **British Journal of**  
 10 **Pharmaceutical Research**, Inglaterra, v. 12, n. 2, 2016.
- FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 179–200, 2010.
- FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, Polônia, v. 62, n. 3, p. 251-257,  
 15 2007.
- FRANK, A.; SALDIERNA GUZMÁN, J.; SHAY, J. Transmission of Bacterial Endophytes. **Microorganisms**, Switzerland, v. 5, n. 4, p. 70, 2017.
- FRIEDRICH, K.; ALMEIDA, V. E. S.; GURGEL, A. M.; SOUZA, M. M. O.; ALEXANDRE, V. P.; CARNEIRO, F. F. AGROTÓXICOS: mais venenos em tempos de  
 20 retrocessos de direitos. **OKARA: Geografia em debate**, Paraíba, v. 12, n. 2, p. 326, 2018.
- FRISCHKORN, C. G. B.; FRISCHKORN, H. E.; CARRAZZONI, E. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. **Naturwissenschaften**, New York, v. 65, n. 9, p. 480–483, 1978.
- FUKUSHIMA, T.; TANAKA, M.; GOHBARA, M.; FUJIMORI T. Phytotoxicity of three  
 25 lactones from *Nigrospora sacchari*. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 48, n. 4, p. 625-630, 1998.
- GAMS, W.; DIEDERICH, P.; PÖLDMMA, K. Fungicolous fungi. In: MULLER, G. M. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. New York: Elsevier, 2004, v. 59, Cap. 17, p. 343-392.
- GANJHU, R. K.; MUDGAL, P. P.; MAITY, H.; DOWARHA, D.; DEVADIGA, S.; NAG,  
 30 S.; ARUNKUMAR, G. Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral

- diseases. **VirusDisease**, Suíça, v. 26, n. 4, p. 225–236, 2015.
- GARCÍA-MÉNDEZ, M. C.; MACÍAS-RUVALCABA, N. A.; LAPPE-OLIVERAS, P.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S.; MACÍAS-RUBALCAVA, M. L. Phytotoxic potential of secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e-1b isolated from *sapium macrocarpum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, n. 21, p. 4255–4263, 2016.
- GERWICK, B. C.; BREWSTER, W. K.; FIELDS, S. C.; GRAUPNER, P. R.; HAHN, D. R.; PEARCE, C. J.; SCHMITZER, P. R.; WEBSTER, J. D. Mevalocidin: a novel, phloem mobile phytotoxin from *Fusarium* DA056446 and *Rosellinia* DA092917. **Journal of chemical ecology**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 253-261, 2013.
- 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**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1323–1330, 1995.
- GLENN, A.; BODRI, M. S. Fungal endophyte diversity in *Sarracenia*. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e32980, 2012.
- GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, Holanda, v. 26, p. 47, 2011.
- 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: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Holanda, v. 31, n. 1, 2013.
- GONZAGA, L. L.; COSTA, L. E. O.; SANTOS, T. T.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *P haseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, Estados Unidos, v. 118, n. 2, p. 485-496, 2015.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of natural products**, Washington, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A

- review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, n. 2, p. 136–142, 2008.
- HAN, L. C.; STANLEY, P. A.; WOOD, P. J.; SHARMA, P.; KURUPPU, A. I.; BRADSHAW, T. D.; MOSES, J. E. Horner-Wadsworth-Emmons approach to piperlongumine analogues with potent anti-cancer activity. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 14, n. 31, p. 7585–7593, 2016.
- HAILU, A.; DAGNE, D. A.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. In: GYAPONG, J. e BOATIN, B. **Neglected Tropical Diseases-Sub-Saharan Africa**. Springer, Suíça, 2016, p. 87-112.
- HEAP, I. Herbicide Resistant Weeds. In: PIMENTEL, D.; PESHIN, R. **Integrated Pest Management**. Springer, Dordrecht, v. 3, Capítulo 12, 2014, p. 281–301.
- HEMTASIN, C.; KANOKMEDHAKUL, S. KANOKMEDHAKUL, K.; HAHNVAJANAWONG, C.; STOYTONG, K.; PRABPAI, S. KONGSAEREE, P. Cytotoxic Pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 74, n. 4, p. 609–613, 2011.
- HIGGINBOTHAM, S. J.; ARNOLD, A. E.; IBÁÑEZ, A.; SPADAFORA, C.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73192, 2013.
- HODGSON, S.; CATES, C. DE; HODGSON, J.; MORLEY, N. J.; SUTTON, B. C.; GANGE, A. C. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. **Ecology and Evolution**, Estados Unidos, v. 4, n. 8, p. 1199–1208, 2014.
- IBAMA. Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto 4.074/2002. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo\\_agrotoxicos\\_2000-2017.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo_agrotoxicos_2000-2017.pdf)> Acesso em: 01 de fevereiro de 2019.
- ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthenes A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 64, n. 8, p. 1015–1018, 2001.
- JAYAWARDENA, R. S.; LI, X. H.; LIU, M.; ZHANG, W.; YAN, J. Y. Mycosphere essay

- 16: *Colletotrichum*: biological control, biocatalyst, secondary metabolites and toxins. **Mycosphere**, China, v. 7, n. 8, p. 1164-1176, 2016.
- JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Gurgaon, v. 1, n. 2, p. 21–32, 2011.
- JUNIOR, O. P. DE A.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.
- KANDEL, S.; JOUBERT, P.; DOTY, S. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. **Microorganisms**, Suíça, v. 5, n. 4, p. 77, 2017.
- KAUR, H.; ALLAN, E. L.; MAMADU, I.; HALL, Z.; IBE, O.; SHERBINY, M. E.; WYK, A.; YEUNG, S.; SWAMIDOSS, I.; GREEN, M. D.; DWIVEDI, P.; CULZONI, M. J.; CLARKE, S.; SCHELLENBERG, D.; FERNÁNDEZ, F. M.; ONWUJEKWE, O. Quality of artemisinin-based combination formulations for malaria treatment: Prevalence and risk factors for poor quality medicines in public facilities and private sector drug outlets in Enugu, Nigeria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2015.
- KENNEDY, D. O. DO; WIGHTMAN, E. E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, Estados Unidos, v. 2, p. 32–50, 2011.
- KIM, J. C.; CHOI, G. J.; PARK, J. H.; KIM, H. T.; CHO, K. Y. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. **Pest Management Science**, Inglaterra, v. 57, n. 6, p. 554-559, 2001.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 4, p. 358–363, 2006.
- KROSCHEL, J.; ELZEIN, A. Bioherbicidal effect of fumonisin B1, a phytotoxic metabolite naturally produced by *Fusarium nygamai*, on parasitic weeds of the genus *Striga*. **Biocontrol Science and Technology**, Inglaterra, v. 14, n. 2, p. 117-128, 2004.
- KUMARAN, R. S.; KIM, H. J.; HUR, B. K. Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japão, v. 110, n. 5, p. 541-546, 2010.

- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012.
- KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host  
5 plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 91, p. 81–87, 2013.
- KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, London, v. 32, n. 6, p. 297–303, jun. 2014.
- 10 KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 28, n. 7, p. 1203, 2011.
- LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **The Journal**  
15 **of Organic Chemistry**, Estados Unidos, v. 61, n. 10, p. 3232-3233, 1996.
- LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L. E.; CARROLL, G. C. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* species. **Mycological Research**, Reino Unido, v. 96, n. 4, p. 287-294, 1992.
- LI, G.; KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; SCHÜFFLER, A.; LAATSCH, H.; SPITELLER, M.  
20 Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp. LG41. **Journal of Natural Products**, San Diego, v. 77, n. 11, p. 2335–2341, 2014.
- LI, H.; LI, D.-W.; HE, C.-M.; ZHOU, Z.-P.; MEI, T.; XU, H.-M. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb e Zn mine wasteland in China. **Fungal Ecology**, Inglaterra, v. 5, n. 3, p. 309–315, 2011.
- 25 LI, H. Y.; SHEN, M.; ZHOU, Z. P.; LI, T.; WEI, Y. L.; LIN, L. B. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. **Fungal Diversity**, New York, v. 54, p. 79–86, 2012.
- LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖRNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 33, n.  
30 6, p. 413–425, 1993.

- LIMA, D. K. S.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONÇALVES, H. P.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; WERNER, F. M. P.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents.
- 5 **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 142, n. 1, p. 274–282, 2012.
- LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 37, n. 7, p. 1325–1334, 2015.
- MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E. Secondary metabolites of endophytic *Xylaria* species with potential applications in medicine and agriculture. **World**
- 10 **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 33, n. 1, p. 15, 2017.
- MACIEL, L. M.; CARNEIRO, F. F.; FILHO, J. T.; NASCIMENTO, F. M. F.; LIMA, A. E. F. Agricultura, saúde e ambiente: análise sobre o consumo e comercialização de agrotóxico no Ceará. XVI Encontro Regional de Agroecologia do Nordeste, Rio Largo, v. 1, n. 1, 2017.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.;
- 15 CROUS, P. W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, Holanda, v. 79, p. 121-186, 2014.
- MALINOWSKI, D. P.; ALLOUSH, G. A.; BELESKY, D. P. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 227, n. 1–2, p. 115–126, 2000.
- 20 MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. **Japanese Society of Grassland Science**, Nasushiobara, v. 52, n. 1, p. 1–14, 2006.
- MALVICK, D. K.; GRUNDEN, E. Isolation of fungal DNA from plant tissues and removal of DNA amplification inhibitors. **Molecular Ecology Notes**, Estados Unidos, v. 5, n. 4, p.
- 25 958–960, 2005.
- MANJU, K.; K., J. R.; ANJU, G. A Review on Medicinal Plants used as a source of Anticancer agents. **International Journal of Drug Research and Technology**, Estados Unidos, v. 2, n. 3, p. 177–183, 2012.
- MARQUES, A. M.; VELOZO, L. S.; CARVALHO, M. A.; SERDEIRO, M. T.; HONÓRIO,
- 30 N. A.; KAPLAN, M. A. C.; MALECK, M. Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites

- against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 54, n. 1, p. 61–68, 2017.
- MASI, M.; EVIDENTE, A.; MEYER, S.; NICHOLSON, J.; MUÑOZ, A. Effect of strain and cultural conditions on the production of cytochalasin B by the potential mycoherbicide  
5 *Pyrenophora semeniperda* (Pleosporaceae, Pleosporales). **Biocontrol science and technology**, Inglaterra, v. 24, n. 1, p. 53-64, 2014.
- MEEPAGALA, K. M.; BRISCOE, W. E.; TECHEN, N.; JOHNSON, R. D.; CLAUSEN, B. M.; DUKE, S. O. Isolation of a phytotoxic isocoumarin from *Diaporthe eres* - infected  
10 *Hedera helix* (English ivy) and synthesis of its phytotoxic analogs. **Pest Management Science**, Inglaterra, v. 74, n. 1, p. 37-45, 2018.
- MELO, M. S. C. DE; ROSA, L. E.; BRUNHARO, C. A. D. C. G.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Alternativas para o controle químico de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistente ao glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 195, 10 ago. 2017.
- 15 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Parque Estadual do Rio Doce é é sítio Ramsar desde 2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/meio-ambiente/2015/02/parque-estadual-do-rio-doce-e-sitio-ramsar-desde-2010>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2019.
- MITCHELL, A. M.; STROBEL, G. A.; MOORE, E.; ROBISON, R.; SEARS, J. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 156, n.  
20 1, p. 270-277, 2009.
- MOHALI, S.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, Estados Unidos, v. 35, n. 6, 385-396, 2005.
- MOLYNEUX, D. Neglected tropical diseases. **Community Eye Health**, London, v. 26, n.  
25 82, p. 21–4, 2013.
- MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; ANJOS JÚNIOR, J. F. DOS; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; SOUZA NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 670–675, out. 2007.
- 30 MORETTI, A. Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and



- splitters. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, Eslovênia, n. 117, p. 7–13, 2009.
- MUSTAFA, L. C. M. S.; RASOTGI, C. V.; JAIN, C. S.; GUPTA, L. C. V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medicinal Journal Armed Forces India*, India, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.
- 5 NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, London, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- NASCIMENTO, J. C.; DAVID, J. M.; BARBOSA, L. C.; PAULA, V. F. DE; DEMUNER, A. J.; DAVID, J. P.; CONSERVA, L. M.; FERREIRA, J. C.; GUIMARÃES, E. F. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (*Piperaceae*). **Pest Management Science**, Inglaterra, v. 69, n. 11, p. 1267–1271, 2013.
- 10 NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 467–470, jun. 2006.
- 15 OLIVEIRA, R. G. Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 7, p. 2291–2302, 2018.
- ORLANDELLI, R. C.; ALBERTO, R. N.; FILHO, C. J. R.; PAMPHILE, J. A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p. 1575-1585, 2012.
- 20 OSBORNE, C. D.; NOBLET, G. P.; ENONGENE, E. N.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A. Host resistance to *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced in mice fed *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) culture material containing fumonisins. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 1789-1798, 2002.
- 25 OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D.; VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **Biological Control**, San Diego, v. 55, n. 1, p. 113-128, 2010.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the
- 30

- genus *Piper*. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 46, n. 4, p. 597–673, 1997.
- PANDEY, A. K.; REDDY, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Reino Unido, v. 107, n. 4, p. 439-444, 2003.
- 5 PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.
- PAWLE, G.; SINGH, S. K. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. **Current**  
10 **Research in Environmental Applied Mycology**, China, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2014.
- PES, M. P. **Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle de plantas daninhas**. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- PES, M. P.; MAZUTTI, M. A.; ALMEIDA, T. C.; CURIOLETTI, L. E.; MELO, A. A.;  
15 GUEDES, J. V.; KUHN, R. C. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 11, n. 42, p. 4242-4249, 2016.
- PEYRAT, L-A.; EPARVIER, V.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J-C.; LITAUDON, M.;  
STIEN, D. Betulinic Acid, The First Lupane-Type Triterpenoid Isolated from Both a  
20 *Phomopsis* sp. and Its Host Plant *Diospyros carbonaria* Benoist. **Chemistry & biodiversity**, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2017.
- PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; HUGE, E.; MACKENZIE, C.; HYDE, K. D.; JEEWON, R. A. Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, New York, v.53, p.579-590, 2007.
- 25 QIU, M.; XIE, R.; SHI, Y.; CHEN, H.; WEN, Y.; GAO, Y.; HU, X. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 26, n. 6, p. 993–998, 30 jun. 2010.
- RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, S. M.  
30 Endophytic Fungi as Novel Resources of Natural Therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, Curitiba, v. 60, n. December, p. 1–26, 2017.

- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling and Behavior**, Estados Unidos, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, 2011.
- RAN, X.; ZHANG, G.; LI, S.; WANG, J. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*. **African Health Sciences**, Kampala, v. 17, n. 2, p. 566–574, 2017.
- RIVERA-ORDUÑA, F. N.; SUAREZ-SANCHEZ, R. A.; FLORES-BUSTAMANTE, Z. R.; GRACIDA-RODRIGUEZ, J. N.; FLORES-COTERA, L. B. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). **Fungal Diversity**, New York, v. 47, p. 65–74, 2011.
- 10 RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Malden, v. 182, n. 2, p. 314–330, abr. 2009.
- ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVEIRA, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.;  
15 CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. A. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.
- 20 ROSA, L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T.; RABELLO, A.; 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**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 420–430, 2010.
- 25 ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; RABELLO, A. L. T.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Cytotoxic, immunosuppressive, trypanocidal and antileishmanial activities of *Basidiomycota* fungi present in Atlantic Rainforest in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 95, n. 3, p. 227–237, 2009.
- 30 ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.

- (*Poaceae*). **Polar Biology**, New York, v. 32, n. 2, p. 161–167, 2009.
- ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L. A.; COTA, B. B.; JOHANN, S.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A. Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. In: RUNDFELDT, C. **Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies**. InTech, Croatia, 2011. v. 2, Capítulo 18, p. 469-486 64.
- SAHU, S. K.; THANGARAJ, M.; KATHIRESAN, K. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. **Molecular Biology**, New York, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- 10 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**, California, v. 29, n. 1, p. 319–343, 1998.
- SALES, V. S. *et al.* Antiparasitic activity and essential oil chemical analysis of the piper *Tuberculatum* Jacq fruit. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 17, n. 1, 15 p. 268–275, 2018.
- SAMAGA, P. V.; RAI, V. R. Diversity and bioactive potential of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorensense* and *Hypericum japonicum* collected from Western Ghats of India. **Annals of Microbiology**, New York, v. 66, n. 1, p. 229–244, 2016.
- SANDHU, S. S.; GUPTA, D. Role of Endophytic Fungi in Preservation of Plant Biodiversity. 20 **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, Estados Unidos, v. 4, n. 3, p. 635–647, 2015.
- SANTIAGO, I. F.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; JUNIOR, P. A. S.; 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. 25 and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, Tokyo, v. 16, n. 1, p. 95–103, 2012.
- SANTOS, I. P.; SILVA, L. C. N.; SILVA, M. V.; ARAÚJO, J. M.; CAVALCANTI, M. DA S.; LIMA, V. L. DE M. Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 6, n. MAY, p. 1– 30 7, 2015.

- SAPPAPAN, R.; SOMMIT, D.; NGAMROJANAVANICH, N.; PENGPREECHA, S.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PUDHOM, K. 11-Hydroxymonocerin from the plant endophytic fungus *Exserohilum rostratum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 71, n. 9, p. 1657–1659, 2008.
- 5 SCHARF, D. H.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 10–12, 2014.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Reino Unido, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.
- 10 SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Reino Unido, v. 106, n. 9, p. 996–1004, 2002.
- SCHULZ, B.; HAAS, S.; JUNKER, C.; ANDRÉE, N.; SCHOBERT, M. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. **Current Science**, Bangalore, v. 109, n. 1, p. 39–45, 2015.
- 15 SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.-K.; DAMMANN, U.; AUST, H.-JÜR.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Reino Unido, v. 103, n. 10, p. 1275–1283, 1999.
- SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, Estados Unidos, v. 21, n. 2–3, p. 75–89, 2007.
- 20 SILVA, D. R.; BREZAN, M. A.; ALBIERO, A. L. M.; CORTEZ, L. E. R.; CORTEZ, D. A. G. Contribuição ao estudo farmacognóstico da *Piper ovatum* Vahl. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínea, v. 17, n. 2, p. 324–330, 2015.
- SILVA, D. R.; ENDO, E. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; SVIDZINSKI, T. I. E.; 25 SOUZA, A. DE; YOUNG, M. C. M.; TÂNIA, U. N.; CORTEZ, D. A. G. Chemical composition and antimicrobial properties of piper ovatum vahl. **Molecules**, Suíça, v. 14, n. 3, p. 1171–1182, 2009.
- SILVA, H. A.; YAMAGUCHI, L. F.; YOUNG, M. C. M.; RAMOS, C. S.; AMORIM, A. M. A.; KATO, M. J.; BATISTA, R. Antifungal piperamides from *Piper mollicomum* Kunth 30 (*Piperaceae*). **Eclética Química Journal**, São Paulo, v. 43, n. May, p. 33–38, 2018.

- SILVA, M. F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C.; LIRA, C. S.; ALBUQUERQUE, B. N. L.; NETO, A. C. A.; PONTUAL, E. V.; MACIEL, J. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (*Piperaceae*). **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 165, p. 64–70, 2016.
- 5 SIQUEIRA, R. C.; ORÉFICE, F. Dengue fever. **Intraocular Inflammation**, London, v. 4661, n. September, p. 1153–1156, 2016.
- SILKSTEIN, M.; SRIWILAJAROEN, N.; KELLY, J. X.; WILAIRAT, P.; RISCOE, M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 5, p. 1803-1806,  
10 2004.
- SONG, M. C.; KIM, E. J.; KIM, E.; RATHWELL, K.; NAM, S.-J.; YOON, Y. J. Microbial biosynthesis of medicinally important plant secondary metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 31, n. 11, p. 1497–1509, 2014.
- SOUZA, A. R. C.; BALDONI, D. B.; LIMA, J.; PORTP, V.; MARCUZ, C.; FERRAZ, R. C.;  
15 KUHN, R. C.; JACQUES, R. J. S.; GUEDES, J. V. C.; MAZUTTI, M. A. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, New York, v. 4, n. 4, p. 575-578, 2015.
- SOUZA, J. N. P. .; CANDOTTI, J. G. .; AMPARO, T. R. .; COELHO, F. F. .; RODRIGUES, I. V. .; SANTOS, O. D. H. .; MEDEIROS, L. F. T. .; FURTADO, N. A. J. C.; SOUZA, H. C.  
20 .; SOUZA, G. H. Bioprospecção das atividades antioxidante e antimicrobiana de espécies vegetais medicinais coletadas em Ouro Preto - MG. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2013.
- SRINIVASAN, K.; JAGADISH, L. K.; SHENBHAGARAMAN, R.; MUTHUMARY, J. Antioxidant activity of endophytic fungus *Phyllosticta* sp. isolated from *Guazuma tomentosa*.  
25 **Journal of phytology**, India, 2010.
- STADLER, M. Importance of secondary metabolites in the *Xylariaceae* as parameters for assessment of their taxonomy, phylogeny, and functional biodiversity. **Current Research in Environmental Applied Mycology**, China, v. 1, n. 2, p. 75-133, 2011.
- STĘPIEŃ, Ł.; LALAK-KAŃCZUGOWSKA, J.; WITASZAK, N.; URBANIAK, M.  
30 *Fusarium* Secondary Metabolism Biosynthetic Pathways: So Close but So Far Away. *In*: [s.l.:

s.n.]. p. 1–37.

STEPNIEWSKA, Z.; KUANIAR, A. Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 97, n. 22, p. 9589–9596, 2013.

- 5 STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE JR., J. F. Endophytic Fungi. In: MULLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of Fungi: Inventory and monitoring methods**, Elsevier Academic Press, New York, USA, p. 241–270, 2004.

STROBEL, G. *Muscodor* species-endophytes with biological promise. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 10, n. 2, p. 165-172, 2011.

- 10 STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 535–544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 67, n. 4, p. 491–402, 2003.

- 15 STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, San Diego, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.

SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte research: Going beyond isolation and metabolite documentation. **Fungal Ecology**, Inglaterra, v. 6, n. 6, p. 561–568, 2013.

- 20 TAKANO, K.; ITOH, Y.; OGINO, T.; KUROSAWA, K.; SASAKI, K. Phylogenetic analysis of manganese-oxidizing fungi isolated from manganese-rich aquatic environments in Hokkaido, Japan. **Limnology**, Tokyo, v. 7, n. 3, p. 219–223, 2006.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, n. 4, p. 448–459, 2001.

- 25 TANAKA, M.; FUKUSHIMA, T.; TSUJINO, Y.; FUJIMORI T. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, Japão, v. 61, n. 11, p. 1848-1852, 1997.

TANSUWAN, S.; PORNPAAKAKUL, S.; ROENGSUMRAN, S.; PESTON, A.; MUANGSIN, N.; SIHANONTA, P.; CHAICHIT, N. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, p. 1620–

1623, 2007.

TEJESVI, M. V.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, New York, v. 24, n. 3, p. 1-18, 2007.

- 5 TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 829, 2006.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, London, v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002.

- 10 VESONDER, R. F.; LABEDA, DAVID, P.; PETERSON, R. E. Phytotoxic activity of selected water-soluble metabolites of *Fusarium* against *Lemna minor* L.(duckweed). **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 118, n. 3, p. 185-189, 1992.

- VIEIRA, B. S.; BARRETO, R. W. Liquid culture production of chlamydospores of *Lewia chlamidosporiformans* (Ascomycota: Pleosporales), a mycoherbicide candidate for wild  
15 poinsettia. **Australasian Plant Pathology**, Austrália, v. 39, n. 2, p. 154-160, 2010.

WANG, L. G.; LIU, X. M.; KREIS, W.; BUDMAN, D. R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: A review. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, New York, v. 44, n. 5, p. 355–361, 1999.

- WANI, Z. A.; ASHRAF, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Plant-endophyte  
20 symbiosis, an ecological perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 99, n. 7, p. 2955–2965, 2015.

WEAVER, B. A. How Taxol/Paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 25, n. 18, p. 2677–2681, 2014.

- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of  
25 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: SELIGER, H. **PCR Protocols**: a guide to methods and applications. Elsevier, San Diego, 1990, Capítulo 38, p. 315–322.

- WIKKEE, S.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.;  
CHUKEATIROTE, E.; ALIAS, S. A.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. **Fungal Diversity**, New York, v. 60, n. 1, p.  
30 91-105, 2013.



- WIWANITKIT, V. Dengue fever: Diagnosis and treatment. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 8, n. 7, p. 841-845, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/5\\_strategies/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/5_strategies/en/)>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- 5 XIONG, Z.-Q.; YANG, Y.-Y.; ZHAO, N.; WANG, Y. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal Paclitaxel producer from *Anglojap yew*, *Taxus x media*. **BMC Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 71, 2013.
- XU, J.; EBADA, S. S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**, New York, v. 44, n. 1, p. 15-31.
- 10 XU, W.; LI, X. Antifungal compounds from *Piper* species. **Current Bioactive Compounds**, Chieti, v. 7, n. 4, p. 262–267, 2011.
- XUAN, T. D.; ELZAAWELY, A. A.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. Herbicidal and fungicidal activities of lactones in Kava (*Piper methysticum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 3, p. 720–725, 2006.
- 15 XUAN, T. D.; YUICHI, O.; JUNKO, C.; TSUZUKI, E.; HIROYUKI, T.; MITSUHIRO, M.; KHANH, T. D.; HONG, N. H. Kava root (*Piper methysticum* L.) as a potential natural herbicide and fungicide. **Crop Protection**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 873–881, jul. 2003.
- YAN, J. F.; BROUGHTON, S. J.; YANG, S. L.; GANGE, A. C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, Inglaterra, v. 13, p. 53–59, 2015.
- 20 YANG, J. W.; YEH, Y. H.; KIRSCHNER, R. A new endophytic species of *Neostagonospora* (*Pleosporales*) from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. **Botany**, Canadá, v. 94, n. 8, p. 593-598, 2016.
- YANG, K. L.; WEI, M. Y.; SHAO, C. L.; FU, X. M.; GUO, Z. Y.; XU, R. F.; ZHENG, C. J.; SHE, Z. G.; LIN, Y. C.; WANG, C. Y. Antibacterial anthraquinone derivatives from a sea anemone-derived fungus *Nigrospora* sp. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 75, n. 5, p. 935-941, 2012.
- YOUNG, C. A.; FELITTI, S.; SHIELDS, K.; SPANGENBERG, G.; JOHNSON, R. D.; BRYAN, G. T.; SAIKIA, S.; SCOTT, B. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. **Fungal Genetics and Biology**, San  
30 Diego, v. 43, n. 10, p. 679–693, 2006.

- ZHANG, G.; SUN, S.; ZHU, T.; LIN, Z.; GU, J.; LI, D.; GU, Q. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, Inglaterra, v. 72, n. 11-12, p. 1436-1442, 2011.
- ZHANG, Q.; WANG, S. Q.; TANG, H. Y.; LI, X. J.; ZHANG, L.; XIAO, J.; GAO, Y. Q.;  
5 ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain-many compounds method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 47, p. 11447–11452, 2013.
- ZHENG, Y. K.; QIAO, X. G.; MIAO, C. P.; LIU, K.; CHEN, Y. W.; XU, L. H.; ZHAO, L. X.  
10 Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, New York, v. 66, n. 2, p. 529–542, 2016.
- ZHAO, S.; CHEN, S.; WANG, B.; NIU, S.; WU, W.; GUO, L.; CHE, Y. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, Holanda, v. 103, p. 106-112, 2015.
- 15 ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Arab Emirates, v. 11, n. 2, p. 159–168, 2011.
- ZHAO, J. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, L. W.; WANG, J. Y.; ZHANG, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the  
20 medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, n. 5, p. 2107-2112, 2012.
- ZHU, H.; HUA, X. X.; GONG, T.; PANG, J.; HOU, Q.; ZHU, P. Hypocreaterpenes A and B, cadinane-type sesquiterpenes from a marine-derived fungus, *Hypocreales* sp. **Phytochemistry letters**, Holanda, v. 6, n. 3, 392-396, 2013.
- 25 ZONNO, M. C.; VURRO, M.; LUCRETTI, S.; ANDOLFI, A.; PERRONE, C.; EVIDENTE, A. Phyllostictine A, a potential natural herbicide produced by *Phyllosticta cirsii*: in vitro production and toxicity. **Plant science**, Irlanda, v. 175, n. 6, p. 818-825, 2008.
- ZUCCARO, A.; LAHRMANN, U.; GÜLDENER, U.; LANGEN, G.; PFIFFI, S.; BIEDENKOPF, D.; WONG, P.; SAMANS, B.; GRIMM, C.; BASIEWICZ, M.; MURAT, C.;  
30 MARTIN, F.; KOGEL, K-H. Endophytic life strategies decoded by genome and

transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 10, 2011.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Atividades biológicas dos extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados a *Piper* sp.

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15291	-	-	82 ± 6	3	> 100	> 34	-	*	-
-	15292	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15293	-	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15294	4 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15295	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Fusarium</i> sp.	15299	5 ± 0	-	-	-	-	-	95 ± 11	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15300	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15302	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15304	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15305	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15310	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15311	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15313	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15315	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15325	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15326	-	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
<i>Muscodor</i> sp.	15335	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>		
<i>Diaporthe</i> sp.	15338	-	4 ± 0,5	-	-	-	-	*	-
-	15342	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15345	-	4 ± 0	-	-	-	-	*	-
-	15346	-	4 ± 0,5	-	-	-	-	*	-
<i>Nigrospora</i> sp.	15348	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
<i>Phyllosticta</i> sp.	15349	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15361	3 ± 0	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15362	5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15374	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15375	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15377	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaportheceae</i> sp.	15379	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15381	-	-	*	*	*	*	85 ± 4	-
-	15388	-	-	*	*	*	*	57 ± 26	-
-	15389	-	-	*	*	*	*	89 ± 3	-
-	15391	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15392	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15393	4 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15394	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>		
<i>Fusarium</i> sp.	15395	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15396	-	-	46 ± 5	*	*	*	-	*
-	15397	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*
-	15398	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-
-	15399	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*
-	15401	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*
<i>Fusarium</i> sp.	15403	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*
-	15406	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*
-	15409	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	-
<i>Hypocreales</i> sp.	15416	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*
-	15419	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*
-	15420	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*
-	15422	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*
-	15423	-	5 ± 0	-	-	-	-	-	*
-	15429	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	15432	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*
-	15435	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*
-	15436	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*
-	15440	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	15442	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	15443	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15444	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15445	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15447	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Nectriaceae</i> sp.	15449	5 ± 0	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15451	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15457	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15458	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15461	3,5 ± 0,5	-	60 ± 2	26	> 100	> 4	-	*	-
-	15462	-	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15465	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	15466	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15468	-	-	-	-	-	-	65 ± 0	*	-
-	15474	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15475	-	-	59 ± 7	2	> 100	> 59	-	*	-
-	15478	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15483	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>		
-	15484	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15489	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15491	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15492	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15495	-	-	*	*	*	*	45 ± 36	-
-	15504	-	3 ± 0	-	-	-	-	*	-
-	15505	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	-	-
-	15508	-	-	49 ± 8	10	> 100	> 10	-	*
-	15516	-	3 ± 0	45 ± 6	8	> 100	> 13	-	*
-	15519	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15521	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	-	-
-	15522	-	-	65 ± 24	14	> 100	> 7	-	*
-	15525	-	-	46 ± 26	12	> 100	> 8	-	*
-	15527	4 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15528	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
<i>Xylariaceae</i> sp.	15536	4,5 ± 0,5	3 ± 0	-	-	-	-	*	-
-	15538	-	4 ± 1	-	-	-	-	*	-
-	15540	-	-	94 ± 16	10	> 100	> 10	-	*
-	15544	4 ± 0	-	76 ± 10	42	> 100	> 2	-	*



Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15545	-	-	56 ± 17	10	> 100	> 10	-	*	-
-	15550	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15552	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15555	-	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15560	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15563	-	-	52 ± 7	13	> 100	> 8	-	*	-
-	15564	-	3 ± 0	-	-	-	-	85 ± 57	*	-
-	15567	3,5 ± 0,5	3 ± 0	*	*	*	*	*	52 ± 33	-
-	15571	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15572	-	3 ± 0	-	-	-	-	97 ± 35	*	-
-	15573	-	-	-	-	-	-	66 ± 34	*	-
-	15582	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	83 ± 14	-
-	15583	-	-	*	*	*	*	*	77 ± 8	-
-	15590	-	-	*	*	*	*	*	91 ± 3	-
-	15592	-	-	42 ± 17	9	> 100	> 11	-	*	-
-	15593	-	-	57 ± 8	24	> 100	> 4	-	*	-
-	15596	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15598	-	-	72 ± 4	12	> 100	> 8	-	*	-
-	15599	-	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15601	5 ± 0	5 ± 0	*	*	*	*	92 ± 2	-	
<i>Fusarium</i> sp.	15603	-	-	76 ± 2	10	> 100	> 9	-	*	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15607	-	5 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
<i>Fusarium</i> sp.	15611	5 ± 0	-	-	-	-	-	84 ± 31	*	-
-	15612	5 ± 0	4 ± 1	-	-	-	-	79 ± 43	*	-
-	15615	4 ± 0	-	-	-	-	-	89 ± 17	*	-
<i>Nectriaceae</i> sp.	15617	-	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15618	-	-	*	*	*	*	*	90 ± 3	-
-	15621	-	-	-	-	-	-	75 ± 87	*	-
-	15625	-	-	53 ± 8	4	> 100	> 23	-	*	-
-	15630	-	-	65 ± 7	*	*	*	-	*	-
-	15634	-	-	-	-	-	-	82 ± 57	*	-
-	15637	-	-	-	-	-	-	80 ± 92	*	-
-	15643	-	-	56 ± 20	5	> 100	> 20	-	*	-
-	15648	-	-	*	*	*	*	*	42 ± 45	-
-	15650	-	-	*	*	*	*	*	53 ± 29	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15653	-	-	70 ± 3	7	> 100	> 15	-	*	-
-	15661	-	-	51 ± 6	*	*	*	-	*	-
-	15663	-	-	65 ± 10	12	> 100	> 8	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15668	-	-	43 ± 22	7	> 100	> 13	-	*	-
-	15671	-	-	*	*	*	*	*	53 ± 26	-
-	15673	-	-	53 ± 10	7	> 100	> 13	-	*	-
-	15675	-	-	50 ± 5	27	> 100	> 4	-	*	-
-	15682	-	-	65 ± 12	7	> 100	> 15	-	*	-
-	15688	-	-	53 ± 10	10	> 100	> 9	-	*	-
-	15699	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15700	-	-	51 ± 11	9	> 100	> 10	-	*	-
-	15703	4 ± 0	-	43 ± 12	4	> 100	> 22	-	*	-
-	15704	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15707	4 ± 0	3 ± 0	-	-	-	-	-	*	-
-	15709	-	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15710	-	-	54 ± 22	4	> 100	> 23	-	*	-
-	15716	-	4 ± 1	-	-	-	-	-	*	-
-	15718	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15723	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15725	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15728	3 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15730	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	*	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15732	4 ± 1	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15733	4,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	*	-
-	15738	4 ± 0	-	-	-	-	-	-	*	-
-	15740	-	-	*	*	*	*	*	52 ± 27	-
-	15741	-	-	*	*	*	*	*	52 ± 29	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15743	4 ± 1	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15744	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	57 ± 25	-
-	15746	-	-	*	*	*	*	*	54 ± 27	-
-	15752	-	-	*	*	*	*	*	57 ± 27	-
-	15753	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15755	-	-	*	*	*	*	*	50 ± 32	-
-	15757	-	-	*	*	*	*	*	47 ± 39	-
-	15760	-	-	*	*	*	*	*	50 ± 37	-
-	15761	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	51 ± 26	-
-	15765	-	-	*	*	*	*	*	47 ± 8	-
-	15766	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15768	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15769	3 ± 0	3,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	-	-
-	15774	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	52 ± 33	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15775	-	-	*	*	*	*	*	56 ± 29	-
-	15784	5 ± 0	5 ± 0	*	*	*	*	*	92 ± 2	-
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	15786	-	4 ± 1	*	*	*	*	*	-	-
-	15787	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	51 ± 36	-
-	15788	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	53 ± 30	-
-	15789	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	83 ± 6	-
-	15791	-	-	*	*	*	*	*	53 ± 29	-
-	15792	-	-	*	*	*	*	*	47 ± 29	-
-	15794	-	4 ± 0	*	*	*	*	*	-	-
<i>Nectriaceae</i> sp.	15795	5 ± 0	-	*	*	*	*	*	66 ± 13	-
<i>Ascomycota</i> sp.	15799	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	92 ± 2	-
-	15802	-	4 ± 0	*	*	*	*	*	-	-
-	15803	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15804	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	55 ± 24	-
-	15805	-	4,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	54 ± 28	-
-	15807	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15808	-	-	*	*	*	*	*	51 ± 34	-
-	15809	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15811	3 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2			% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>		
-	15814	-	-	*	*	*	*	58 ± 23	-
-	15817	-	-	*	*	*	*	56 ± 25	70 ± 5
<i>Xylariaceae</i> sp.	15818	-	-	*	*	*	*	-	73 ± 1
<i>Nigrospora</i> sp.	15822	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	-	-
-	15825	-	-	*	*	*	*	-	71 ± 2
<i>Colletotrichum</i> sp.	15826	3 ± 0	-	*	*	*	*	-	70 ± 0
-	15827	3 ± 0	-	*	*	*	*	-	-
-	15828	4 ± 1	-	*	*	*	*	63 ± 23	-
-	15830	5 ± 0	-	*	*	*	*	60 ± 21	-
<i>Neopetalotiopsis</i> sp.	15831	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	-	-
-	15834	-	-	*	*	*	*	54 ± 30	-
-	15835	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	*	*	*	*	-	-
-	15836	5 ± 0	-	*	*	*	*	-	-
-	15837	-	-	*	*	*	*	86 ± 4	-
-	15839	3,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	-	-
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	15841	-	3,5 ± 0,5	*	*	*	*	-	72 ± 0
-	15848	4,5 ± 0,5	-	*	*	*	*	-	-
<i>Nigrospora</i> sp.	15851	4 ± 0	-	*	*	*	*	-	-

Identificação	Código UFMGCB <sup>a</sup>	Atividade herbicida (n° de sementes)		% de proteção contra DENV-2				% de inibição contra <i>T. cruzi</i>	% de inibição contra <i>P. falciparum</i>	% de inibição contra <i>L. amazonensis</i>
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>	% inibição re-teste	CE <sub>50</sub> <sup>1</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	IS <sup>3</sup>			
-	15852	-	-	*	*	*	*	*	57 ± 23	-
<i>Pleosporales</i> sp.	15853	5 ± 0	-	*	*	*	*	*	-	-
-	15854	-	3,5 ± 0,5	*	*	*	*	*	58 ± 23	-
Controles	Glifosato	5 ± 0	5 ± 0	-	-	-	-	-	-	-
	Benzonidazol	-	-	-	-	-	-	73,73 ± 7,9	-	-
	Interferon Alfa-2B	-	-	61,5 ± 3,23	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>UFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade. <sup>1</sup>Concentração efetiva a 50%. <sup>2</sup>Concentração citotóxica a 50% do tapete celular.

<sup>3</sup>Índice de seletividade. (-) Resultado negativo. (\*) Não foi testado.





