

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Bioprospecção de
metabólitos secundários
bioativos de fungos
endofíticos associados à
Carapichea ipecacuanha
(Rubiaceae)**

Rafaela Nogueira de Azevedo

Ouro Preto
2020



UFOP



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



RAFAELA NOGUEIRA DE AZEVEDO

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae)**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Co-orientadora: Dra Mariana Costa Ferreira

Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais – ICB/UFMG

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 Industrial.

Ouro Preto
2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A994b Azevedo, Rafaela Nogueira de .
Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos de fungos
endofíticos associados à Carapichea ipecacuanha (Rubiaceae).
[manuscrito] / Rafaela Nogueira de Azevedo. - 2020.
74 f.: il.: color., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa.
Coorientadora: Dra. Mariana Costa Ferreira.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Metabolismo microbiano. 2. Ipecacuanha. 3. Metabólitos . 4.
Herbicidas. I. Ferreira, Mariana Costa. II. Rosa, Luiz Henrique. III.
Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 633.883

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 03 dias do mês de março do ano de 2020, às 14:00 horas, nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais, foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Rafaela Nogueira de Azevedo, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa (Presidente - Externo), pela Profa. Dra. Camila Rodrigues de Carvalho (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Iara Furtado Santiago (Membro - Externo) e pela Profa. Dra. Mariana Costa Ferreira (Co-Orientadora - Externo). 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 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Bioprospecção de Metabólitos Secundários Bioativos de Fungos Endofíticos Associados à *Carapichea Ipecacuanha* (Rubiaceae)", na área de concentração: Biotecnologia Industrial. 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. Dra. Camila Rodrigues de Carvalho; segundo Profa. Dra. Iara Furtado Santiago; terceiro Profa. Dra. Mariana Costa Ferreira; quarto Prof. Dr. 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, 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, 03 de março de 2020.

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Presidente

Profa. Dra. Mariana Costa Ferreira

Profa. Dra. Camila Rodrigues de Carvalho

Profa. Dra. Iara Furtado Santiago

Mestranda

COLABORAÇÃO

Química de Produtos Naturais Bioativos

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

Dr. Carlos Leomar Zani

Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma a cruzi*

Dr. Policarpo Ademar Sales Junior

Dr. Silvane Maria Fonseca Murta

Imunologia Celular e Molecular

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Dr. Emerson de Castro Barbosa

Instituto René Rachou – FIOCRUZ/Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado em minha vida pessoas tão fantásticas que me acolheram e me ajudaram e ser uma pessoa melhor nestes dois anos.

A minha família e minha esposa que sempre me apoiaram, motivaram e me ensinaram que as maiores vitórias são resultados de grandes sacrifícios.

Ao orientador Prof. Dr^o. Luiz Henrique Rosa por ter aberto às portas de seu laboratório, por ter me dado uma oportunidade de apreender e ter proporcionado tanto conhecimento.

A co-orientadora Mariana Ferreira pela paciência, dedicação e seus ensinamentos. Com certeza levarei todo o aprendizado para o resto da vida.

Os colegas do LabFungo que com companheirismo e parceria deixavam os dias mais leves.

A migs Débora que foi uma grande parceira nessa jornada, que desde o início sempre esteve presente para ajudar a segurar a marimba. Obrigada pelas risadas, as confidências e os ótimos momentos nessa estrada Ouro Preto – BH.

Os amigos do Micropolar e conexões tropicais em especial, Mayara, Thamar, Marina, Babi, Lívia, Lauren Matheus e Eldon que sempre estavam por perto pra tirar aquela dúvida ou para alegrar o dia, comer um docinho e acalmar o coração. Sou grata a todos pela amizade e o convívio.

Aos profissionais do Instituto René Rachou – FIOCRUZ/Minas Gerais

A FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....	9
Lista de Figuras	11
Resumo	13
Abstract.....	15
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Micro-organismos endofíticos.....	19
2.2. Fungos endofíticos: interação micro-organismo e planta hospedeira	20
2.3. Produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos.....	22
2.4. Doenças tropicais negligenciadas (DTNs)	26
2.5. Herbicidas sintéticos.....	28
2.6. <i>Carapichea ipecacuanha</i> (Rubiaceae) e o Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais.....	29
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. Obtenção dos fungos endofíticos	33
4.2. Preparo de extratos diclorometânicos a partir dos isolados fúngicos.....	33
4.3. Determinação da atividade herbicida	33
4.4. Ensaio <i>in vitro</i> com a forma amastigota-like de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	34
4.5. Ensaio <i>in vitro</i> com células <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> intracelular....	35
4.6. Teste de avaliação da atividade citotóxica sobre células da linhagem THP-1 .	35
4.7. Ensaio <i>in vitro</i> com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
4.8. Testes de avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> dos extratos tripanomicidas	37
4.9. Avaliação da atividade antiviral contra o vírus da Dengue sorotipo 2.....	37
4.10. Identificação dos fungos endofíticos bioativos	38
4.10.1. Extração do DNA total	38
4.10.2. Amplificação da região ITS.....	39
4.10.3. Amplificação do gene da β -tubulina.....	39
4.10.4. Purificação dos amplicons	40
4.10.5. Reação de sequenciamento.....	40

4.10.6.	Análise computacional das sequencias.....	41
4.11.	Análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)	42
5.	RESULTADOS	43
5.1.	Atividades biológicas dos extratos e identificação dos fungos bioativos	43
5.2.	Determinação da atividade herbicida	47
5.3.	Determinação da atividade leishmanicida	48
5.4.	Determinação da atividade tripanocida	48
5.5.	Desreplicação: análise química dos metabólitos bioativos	49
6.	DISCUSSÃO	51
6.1.	Relação fungo endofítico, tecido/órgão colonizado e bioatividade	51
6.2.	Atividade herbicida	52
6.3.	Atividade leishmanicida	54
6.4.	Atividade tripanocida	56
6.5.	Desreplicação: análise química dos metabólitos bioativos	57
7.	CONCLUSÕES	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

°C: Graus Celsius

%: Por cento

$\mu\text{g mL}^{-1}$: micrograma por mililitro

μL : Microlitro

μM : Micromolar

BDA: Ágar Batata Dextrosado

BLASTn: *Basic Local Alignment Search Tool*

CTAB: Brometo de cetrimônio

DENV-2: Dengue Vírus Sorotipo 2

DMEM: Meio de Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: Dimetilsufóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DTNs: Doenças Tropicais Negligenciadas

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acética

g: Grama

IC₅₀: Concentração Inibitória de 50%

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

LC: Leishmaniose cutânea

LV: Leishmaniose visceral

mg mL^{-1} : Miligrama por mililitro

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$: Nanograma por microlitro

M: Molar

MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: Pares de bases

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PERD: Parque Estadual do Rio Doce

pmol: Picomol

rpm: Rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal

SDS: Dodecil sulfato sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

TBE: Tris borato

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UI mL⁻¹: Unidades internacionais por mililitro

V: Volts

Lista de Figuras

Figura 1. Hipótese do múltiplo antagonismo balanceado proposto por Schulz et al. (2015), onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do micro-organismo e as respostas de defesa do hospedeiro.....	22
Figura 2. Moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos: taxol, vincristina com atividade anticancerígena; hipericina com atividade antiviral; camptotecina com atividade antitumoral; podofilotoxina com atividade antimicrobiana (SANTOS, 2016).	23
Figura 3. Estrutura química da podofilotoxina produzida pela planta medicinal <i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	26
Figura 4. Mapa do Parque Estadual do Rio Doce situado na região do Vale do Aço, inserido nos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo, Minas Gerais, Brasil.	30
Figura 5. <i>Carapichea ipecacuanha</i> (Rubiaceae). FONTE: Próprio autor.....	31
Figura 6. Cromatograma de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa das frações ativas.	50
Figura 7. Estrutura do dicerandrol C ($C_{39}H_{40}O_{15}$), dímero de xantona.	50
Figura 8. Estrutura dos principais alcaloides presentes nas raízes da <i>Carapichea ipecacuanha</i>	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade herbicida.	29
Tabela 2. Atividades biológicas dos extratos diclorometânicos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados à <i>Carapichea ipecacuanha</i>	44
Tabela 3. Identificação dos fungos endofíticos associados à <i>Carapichea ipecacuanha</i> bioativos por meio de técnicas de biologia molecular.	46
Tabela 4. Tecido de origem dos fungos endofíticos de <i>Carapichea ipecacuanha</i> com atividades biológicas.	47

Resumo

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são causadas por diferentes agentes infecciosos que podem acometer bilhões de pessoas nas regiões tropicais do planeta. Entre as DTNs, a leishmaniose visceral e a doença de chagas são as mais preocupantes, além da dengue e a malária que vêm aumentando suas incidências ao longo das décadas. A descoberta de novos metabólitos bioativos tem se tornado um foco de estudo na busca de métodos mais eficientes para a prevenção, controle e tratamento destas enfermidades tropicais. Além da busca de novos fármacos para uso na medicina, as moléculas bioativas também podem ser estudadas como novos herbicidas naturais para uso na agricultura, e, por isso, representam uma alternativa para a substituição dos herbicidas sintéticos tóxicos para o homem e animais e de difícil degradação no meio ambiente. Fungos endofíticos, aqueles que residem assintomaticamente no interior dos tecidos vegetais por pelo menos um período do seu ciclo de vida, são potenciais produtores de metabólitos bioativos de interesse econômico, os quais podem ser empregados tanto na medicina quanto na agricultura. Estes fungos desempenham papéis ecológicos e fisiológicos na interação com suas plantas hospedeiras, garantido vantagens evolutivas tanto para a comunidade vegetal quanto para sua própria sobrevivência. Entre as plantas alvo para estudos de fungos endofíticos, as medicinais são consideradas um promissor reservatório de endofíticos produtores de moléculas bioativas. Plantas com histórico etnobotânico também são potenciais hospedeiras de fungos endofíticos bioativos. *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (Rubiaceae), encontrada nas florestas tropicais da América do Sul, é uma planta medicinal com propriedades eméticas e amebicidas e, por isso, um alvo promissor para o estudo de sua comunidade de fungos endofíticos. A partir do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial dos fungos endofíticos associados à *C. ipecacuanha* como fonte de metabólitos secundários ativos contra os parasitas causadores das DTNs *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), *Leishmania amazonensis* (leishmaniose) e vírus da Dengue sorotipo 2. Os fungos endofíticos de *C. ipecacuanha* também foram avaliados quanto à capacidade de produzir substâncias herbicidas com potencial uso na agricultura. Extratos diclorometânicos foram produzidos a partir do cultivo em fermentação sólida de 275 isolados de fungos endofíticos obtidos a partir das folhas, caule e raízes de *C. ipecacuanha*, os quais foram avaliados nos diferentes ensaios biológicos. Dentre os extratos fúngicos testados, 10 (3,62%) apresentaram atividade herbicida, 4 (1,45%)

apresentaram atividade contra *T. cruzi*, um (0,36%) apresentou atividade frente a *L. amazonensis* e nenhum extrato apresentou atividade contra o vírus da Dengue sorotipo 2. Os isolados bioativos foram identificados por meio do sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. Dos 15 isolados que apresentaram atividade biológica, nove foram identificados como pertencentes aos gêneros *Colletotrichum* (4 isolados), *Diaporthe* (3), *Leptobacillium* (1) *Calonectria* (1). Dois isolados foram identificados como *Trichoderma caerulescens* e *Trichoderma spirale*. O táxon UFMGCB 15290 apresentou promissora atividade de inibição do crescimento da *L. amazonensis* ($IC_{50} = 0,3783 \text{ mg mL}^{-1}$). *Leptobacillium* sp. UFMGCB 15183 apresentou atividade tripanocida e representa o primeiro relato desta atividade em fungos endofíticos destes gêneros. Duas frações do extrato de *Diaporthe* sp. UFMGCB 15138 apresentaram potencial atividade contra *T. cruzi* (inibição de 100 e 91,55%) e a partir das análises desreplicativas das frações ativas foi identificado um dímero de xantonas como o possível responsável pela bioatividade. Entre os fungos que exibiram atividade herbicida, os extratos de UFMGCB 15027 e *Colletotrichum* sp. UFMGCB 15029 foram capazes de inibir em 100% a germinação das sementes de *Lactuca sativa*. O presente trabalho também relatou pela primeira vez atividade herbicida relacionada ao gênero *Calonectria*. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a planta *C. ipecacuanha* é um reservatório natural de fungos endofíticos produtores de substâncias bioativas, em especial aquelas capazes de atuar contra agentes causadores de DTNs e também com atividades herbicidas e, por isso, podem ser considerados bons candidatos para estudos químicos mais detalhados para isolamento das substâncias ativas capazes de controlar DTNs e herbicidas para uso na agricultura.

Palavras-chave: fungos endofíticos, *Carapichea ipecacuanha*, metabólitos bioativos, doenças negligenciadas, herbicida.

Abstract

Neglected tropical diseases (NTDs) are caused by different infectious agents that can affect billions of people in the tropical regions of the planet. Among NTDs, visceral leishmaniasis and chagas disease are the most worrying, in addition to dengue and malaria, which has been increasing its incidence over the decades. The discovery of new bioactive metabolites has become a focus of study in the search for more efficient methods for the prevention, control and treatment of these tropical diseases. In addition to the search for new drugs for use in medicine, bioactive molecules can also be studied as new natural herbicides for use in agriculture, and therefore represent an alternative for the replacement of toxic synthetic herbicides to man, animals and of difficult degradation in the environment. Endophytic fungi, those residing asymptotically inside plant tissues for at least one period of their life cycle, are potential producers of bioactive metabolites of economic interest, which can be used in medicine and agriculture. They play important ecological and physiological roles in the interaction with their host plants, ensuring evolutionary advantages both for the plant community as for its own survival. Among the target plants for studies of endophytic fungi, medicinal plants are considered a promising reservoir of endophytic producers of bioactive molecules. Plants with an ethnobotanical history are also potential hosts for bioactive endophytic fungi. *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (Rubiaceae), found in the tropical forests in South America, is a medicinal plant with emetic and amoebicidal properties and, therefore, a promising target for the study of its endophytic fungi community. Based on the above, this study evaluated the potential of the endophytic fungi associated with *C. ipecacuanha* as a source of active secondary metabolites against the parasites that cause NTDs, *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease), *Leishmania amazonensis* (leishmaniasis) and Dengue virus serotype 2. The endophytic fungi of *C. ipecacuanha* were also evaluated for the ability to produce herbicidal substances with potential use in agriculture. Dichloromethane extracts were produced from the solid fermentation culture of 275 isolates of endophytic fungi obtained from leaves, stem and roots of *C. ipecacuanha*, which were evaluated in different biological tests. Among the tested fungal extracts, 10 (3.62%) showed herbicidal activity, 4 (1.45%) showed activity against *T. cruzi* and 1 (0.36%) against *L. amazonensis*. The bioactive isolates were identified by sequencing the ITS- 5.8S internal transcribed region of the rRNA gene region. Of the 15 isolates that showed biological activity, nine were identified as

belonging to the genera *Colletotrichum* (4 isolates), *Diaporthe* (3), *Leptobacillium* (1) *Calonectria* (1). Two isolates were identified as *Trichoderma caerulescens* and *Trichoderma spirale*. Taxon UFMGCB15290 showed promising growth inhibiting activity of *L. amazonensis* with an ($IC_{50} = 0.3783 \text{ mg mL}^{-1}$). *Leptobacillium* sp. UFMGCB15183 presented trypanosomicidal activity and represents the first report of this activity in endophytic fungi of these genera. Two fractions of the extract of *Diaporthe* sp. UFMGCB 138 showed potential activity against *T. cruzi* (100 and 91,55% inhibition) and from the dereplicative analyses of the active fractions, a xanthone dimer was identified as the possible responsible for bioactivity. Among the fungi that exhibited herbicidal activity, extracts from UFMGCB 15027 and *Colletotrichum*. sp UFMGCB 15029 were able to 100% inhibit the germination of *Lactuca sativa* seeds. The present work also reported for the first time herbicidal activity related to the genus *Calonectria*. The results obtained in this study demonstrate that the plant *C. ipecacuanha* is a natural reservoir of endophytic fungi that produce bioactive substances, especially those capable of acting against agents that cause NTDs and also with herbicidal activities and, therefore, they can be considered good candidates for more detailed chemical studies for the isolation of active substances capable of controlling NTDs and herbicides for use in agriculture.

Key words: endophytic fungi, *Carapichea ipecacuanha*, bioactive metabolites, neglected diseases, herbicide.

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os fungos endofíticos, aqueles que residem nos tecidos vegetais vivos sem causar sinais aparentes de doenças por pelo menos um período do seu ciclo de vida, são considerados um grupo promissor para exploração e descobertas biotecnológicas (RADIC & STRUKELJ, 2012). Tendo em vista o impacto das doenças tropicais negligenciadas que acometem milhões de pessoas nas diferentes regiões tropicais do planeta (OLIVEIRA et al., 2018), a busca por novos fármacos eficientes com maior poder de atuação é de grande importância (PHOTITA et al., 2001). Atualmente, plantas daninhas resistentes ao controle com herbicidas químicos avançam em áreas cultiváveis no Brasil e ameaçam sistemas de culturas, principalmente as de soja e milho (GIOVANELLI, 2019). Por décadas o glifosato foi referido como o herbicida químico mais eficiente e bem sucedido do mercado no controle de plantas indesejáveis (DA SILVA, 2014). No entanto, o que antes era a solução definitiva na agricultura, hoje não possui a mesma eficiência. Além de gerar seleção de plantas resistentes, devido ao seu uso contínuo, este composto é considerado, do ponto de vista ambiental, um poluente devido ao seu acúmulo no solo, podendo atingir os lençóis subterrâneos (MELO et al., 2017). Frente a essa necessidade, a diversidade de vegetais e de micro-organismos compõe uma fonte promissora a fim de obter metabólitos bioativos que sirvam como moléculas protótipos para a descoberta de novas substâncias úteis na medicina e agricultura (KUMARESAN & SURYANARYANAN, 2001).

Grande parte da diversidade vegetal pode ser encontrada em florestas como a Mata Atlântica, que abriga um vasto número de espécies como, por exemplo, a *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (Rubiaceae). A *C. ipecacuanha* é um subarbusto popularmente conhecido como poaia ou ipeca utilizada como agente medicinal no combate a amebíase. O seu amplo uso farmacológico está associado à presença de alcaloides bioativos encontrados em suas raízes (emetina e cefalina), que possibilitam seu uso também como expectorante, anti-inflamatório e no combate a diarreia (DE OLIVEIRA & VIEGAS, 1997; OLIVEIRA, 2010). De acordo com Strobel et al. (2004), algumas propriedades medicinais atribuídas a algumas espécies vegetais podem estar estreitamente relacionadas à produção de metabólitos secundários por sua comunidade de fungos endofíticos, indicativo que torna tais plantas hospedeiras promissoras para estudos de diversidade e bioprospecção de fungos.

A partir do exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico da comunidade de fungos endofíticos associados à *C. ipecacuanha* no maior fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, o Parque Estadual do Rio Doce, de modo a responder as seguintes questões:

- 1) A comunidade de fungos endofíticos associados a *C. ipecacuanha* são potenciais produtores de metabólitos bioativos?
- 2) Os metabólitos bioativos produzidos possuem atividade contra doenças tropicais negligenciadas?
- 3) As moléculas bioativas produzidas pela comunidade de fungos endofíticos possuem atividade herbicida?
- 4) Quais espécies dos fungos endofíticos associados a *C. ipecacuanha* são produtoras de moléculas bioativas?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Micro-organismos endofíticos

Micro-organismos endofíticos podem ser representados por fungos, bactérias e protozoários que, em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, habitam os espaços inter ou intracelular de tecidos vivos de plantas sem causar sinais aparente de doença ou efeito negativo (PETRINI, 1986; SCHULZ et al., 2002; YAN et al., 2019). As primeiras evidências de uma possível relação entre endofíticos e vegetais surgiram por meio da análise de tecidos fossilizados de caules e folhas de plantas, o que sugere que esta relação tenha se iniciado há milhares de anos (STROBEL, 2006).

Estes micro-organismos alojam-se em todos os tecidos das plantas e vivem de maneira simbiótica com seu hospedeiro, podendo desempenhar impactos vantajosos para a comunidade vegetal e para sua própria sobrevivência, recebendo nutriente e proteção do hospedeiro. Em geral, os endofíticos adentram os tecidos vegetais por meio de transmissão horizontal, que ocorre a partir de estômatos, hidatódios, feridas causadas por insetos e por meio da produção de enzimas que facilitam sua penetração (AZEVEDO, 1998). Outra forma de transmissão é a vertical, que ocorre de uma planta mãe para suas filhas por meio de sementes (OKI, 2008).

Todas as espécies vegetais possuem uma comunidade de micro-organismos endofíticos abrigoando seus tecidos, tornando-se possível o isolamento de um elevado número de espécies a partir de um único hospedeiro (STROBEL et al., 2004; FERRARA, 2006). De acordo com Nair & Padmavathy (2014), as diferentes espécies endofíticas possuem variados papéis e aplicações, tais como:

- 1) Fitoestimulação: possuem papel na captura de elementos essenciais para a planta hospedeira;
- 2) Produção de pigmentos: são capazes de produzir pigmentos que podem ser usados como fonte natural de corante;
- 3) Produção de enzimas de importância comercial: lipases, amilases, proteases, peroxidases e celulases;
- 4) Fonte de metabólitos bioativos: são capazes de produzir moléculas bioativas que são utilizadas pelas plantas na defesa contra patógenos, podendo ter aplicações biotecnológicas na medicina;

- 5) Agentes de controle biológico: são considerados eficientes agentes de controle biológico, estratégia alternativa para o controle químico;
- 6) Ciclagem de nutrientes: possuem a habilidade de degradar compostos orgânicos incluindo celulose, lignina e hemicelulose;
- 7) Biorremediação/biodegradação: possuem uma poderosa capacidade de degradar compostos recalcitrantes.

2.2. Fungos endofíticos: interação micro-organismo e planta hospedeira

Os fungos representam uma das formas de vida mais diversas neste planeta, com estimativa de cerca de 2,2 a 3,8 milhões de espécies existentes, sendo destas 130 mil espécies já conhecidas pela ciência (HAWKSWORTH & LÜECKING, 2017). Estes organismos compõem um grupo variado e apresentam ampla distribuição em vários ambientes, como é o caso dos fungos endofíticos, um grupo polifilético que habitam tecidos internos de plantas, em ambientes biologicamente diversos (ARNOLD, 2007).

A diversidade biológica dos fungos endofíticos, especialmente em florestas tropicais e temperadas é enorme, principalmente levando-se em consideração que estes micro-organismos podem ser encontrados em cerca das 300 mil espécies de plantas terrestres estimadas (STROBEL & DAISY, 2003). De acordo com Peixoto et al. (2002), as espécies de fungos endofíticos mais frequentemente isoladas pertencem ao filo *Ascomycota*. Em plantas brasileiras, espécies do gênero *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum/Glomerella*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phomopsis/Diaporthe*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* e *Xylaria* são as mais descritas.

Os fungos endofíticos podem ser divididos em dois grandes grupos básicos: os fungos generalistas, os quais são encontrados em alta abundância e em diferentes espécies de plantas; e os especialistas, que são encontrados em baixa abundância e em plantas hospedeiras específicas. Acredita-se que as plantas tropicais abrigam uma população altamente diversificada de fungos endofíticos (DREYFUSS & CHAPELA, 1994; FLORINDO, 2019).

Rodriguez et al. (2009) dividem os fungos endofíticos em dois grupos, de acordo com suas características, tais como hospedeiro, órgão de localização e funções ecológicas: os endofíticos clavicipitáceos (C-endofíticos), que infectam somente gramíneas e os endofíticos não clavicipitáceos (NC-endofíticos) que são isolados de tecidos assintomáticos de angiospermas e também de plantas não vasculares e

samambaias. Entretanto, o grupo dos não clavicipitaceos são fungos diversos que se divide em pelo menos três grupos funcionais distintos, baseado em particularidades de colonização do hospedeiro, mecanismo de transmissão entre gerações, níveis de biodiversidade e funções ecológicas.

A composição, frequência e especificidade das espécies endofíticas podem ser significativamente afetadas por inúmeros fatores abióticos e bióticos como, por exemplo, a espécie do vegetal, distribuição geográfica, umidade relativa do ambiente, posição relativa da planta (sua altura em relação ao solo), idade e parte da planta, entre outros fatores (ARNOLD & HERRE, 2003; SIEBER, 2007; ALY et al., 2011).

O estabelecimento da interação fungo/planta pode ser moldado por fatores como modo de transmissão, padrão de infecção, idade da planta, fatores ambientais, além de propriedades genéticas (SAIKKONEN et al., 1998; ALY et al., 2011). A especificidade com o hospedeiro requer uma estreita adaptação entre a planta e o endófito, sugerindo uma influência mútua decorrente de uma coabitação e coevolução desenvolvida durante milhares de anos (KUSARI et al., 2012). De acordo com Moricca & Ragazzi (2008), com o decorrer do tempo, essa associação tornou-se, permanentemente, gravada na constituição genética de ambos, que passaram a desenvolver sistemas genéticos complementares.

A relação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira é algo bem complexa, envolvendo interações entre as espécies endofíticas, a planta e os fatores ambientais externos (OKI et al., 2009). Devido à grande diversidade de fungos existentes, algumas hipóteses consideram que estes micro-organismos possam ser sapróbios, que se alimentam de matéria orgânica proveniente de organismos em decomposição, ou patógenos oportunistas, sendo aqueles que se aproveitam quando a defesa do organismo está debilitada (STROBEL & DAISY, 2003). Porém, de acordo com Shulz & Boyle (2005) a colonização assintomática de um tecido vegetal por um endófito é resultado de uma relação de antagonismo balanceado, gerado a partir do equilíbrio entre a virulência do micro-organismo e as respostas de defesa do hospedeiro. A hipótese estabelecida inicialmente teve como objetivo demonstrar como um endófito seria capaz de impedir a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, garantindo assim sua própria existência antes de ser inibido pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro e sem causar sinais visíveis de infecção ou doença (SCHULZ & BOYLE, 2005). Esta fase é definida por uma compensação mútua no qual os mecanismos de virulência do fungo e os mecanismos de defesa da planta devem se manter em equilíbrio para garantir uma

associação aparentemente assintomática. Se os mecanismos de defesa da planta neutralizarem completamente os fatores de virulência do fungo, o mesmo pode morrer e se a planta sucumbir à virulência do fungo, o relacionamento planta/patógeno pode levar a planta à doença. (KUSARI et al., 2012). Além disso, Schulz et al. (2015) também propõem que, para garantir que esta associação permaneça assintomática no interior da planta hospedeira, os fungos endofíticos precisam manter um antagonismo balanceado não apenas com a planta hospedeira, mas também com os outros micro-organismos competidores que vivem em associação com a planta, sejam eles fungos, bactérias, patógenos ou endofíticos (Figura 1).

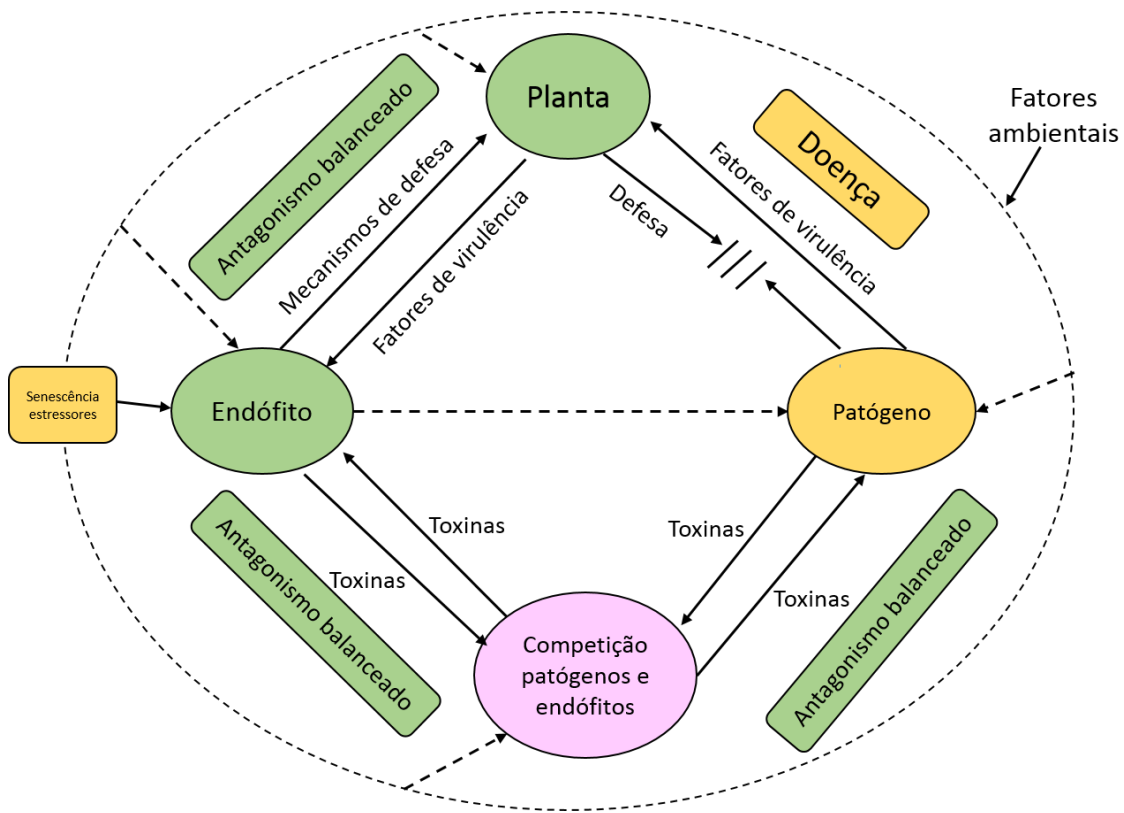


Figura 1. Hipótese do múltiplo antagonismo balanceado proposto por Schulz et al. (2015), onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do micro-organismo e as respostas de defesa do hospedeiro.

2.3. Produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos

Produtos naturais são compostos químicos produzidos por organismos vivos. A natureza fornece uma enorme variação de moléculas extremamente complexas, mais sofisticadas do que qualquer molécula obtida de forma sintética ou por meio de combinações químicas (PETSKO, 1996). A alta diversidade química em produtos

naturais está relacionada com a disponibilidade de precursores e reações biossintéticas, além de suas funções nos sistemas biológicos (GUIMARÃES, 2009). Os metabólitos secundários são produzidos durante o crescimento e diferenciação de um organismo vivo e têm sido isolados e caracterizados principalmente para fins industriais e farmacêuticos (SPECIAN, 2015).

Dentre todos os grupos de fungos, um que merece destaque é o dos fungos endofíticos devido à grande diversidade de moléculas produzidas e suas atividades biológicas (Figura 2) (FIRAKOVA et al., 2007).

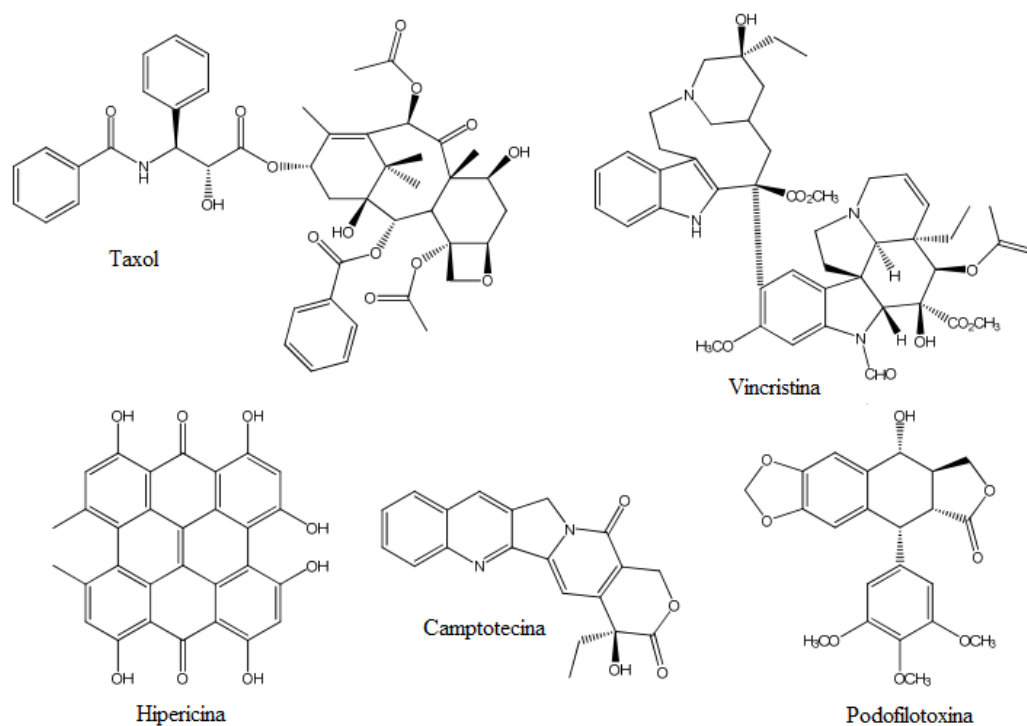


Figura 2. Moléculas bioativas produzidas por fungos endofíticos: taxol e vincristina com atividade anticancerígena; hipericina com atividade antiviral; camptotecina com atividade antitumoral; podofilotoxina com atividade antimicrobiana (SANTOS, 2016).

A interação fungo endofítico e planta hospedeira permite a produção de uma vasta diversidade de metabólitos secundários, tornando estes micro-organismos uma rica fonte de produtos naturais e moléculas bioativas aplicáveis (ROMOFF, 2018). Os produtos naturais obtidos a partir de fungos endofíticos têm um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antimicrobianos, antioxidantes (JALGAONWALA et

al., 2011), propriedades imunossupressoras, antivirais, antitumorais, herbicida, antiparasitária (STROBEL & DAISY, 2003) e citotóxicas (ALY et al., 2011).

Os metabólitos produzidos podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, ácidos fenólicos, entre outros (ZHANG et al., 2006; SANTOS et al., 2013). Estudos demonstram que os endófitos podem produzir um grande número de metabólitos secundários bioativos importantes, conhecidos apenas em plantas (ALY et al., 2011; JALGAONWALA et al., 2011). Um exemplo é a produção do taxol pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, um importante fármaco anticancerígeno, isolado inicialmente da planta *Taxus brevifolia* T. Nuttal (STIERLE et al., 1993). Fungos do gênero *Colletotrichum* são também de grande importância para a agricultura, devido à sua característica de produzir moléculas bioativas, como o ácido coletótrico, produzido por *C. gloeosporioides*, isolado de *Artemisia mongolica* R. Pampanini que apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e contra o fungo patogênico *Helminthosporium sativum* (ZOU et al., 2000).

Desta forma, os fungos endofíticos são uma excelente fonte para a exploração de metabólitos secundários com potencial biotecnológico. O isolamento e a utilização desses metabólitos em bioensaios são uma alternativa na busca por produtos naturais bioativos para controle biológico e produção de produtos farmacêuticos (AZEVEDO et al., 2000). Neste contexto, vários estudos demonstram a importância da investigação nesta área e a eficiência dos metabólitos secundários que atuam principalmente como inibidores de patógenos. Use et al. (2014) demonstraram a importância da prospecção de metabólitos. O fungo endofítico *Pestalotiopsis virgatula* foi isolado da planta medicinal *Vitex negundo* C. P'ei e seu extrato parcialmente purificado foi testado contra linhagens de células de câncer de mama humano e linhagens de bactérias multirresistentes. Os resultados deste estudo indicaram que o extrato fúngico apresentou atividade antibacteriana eficaz contra linhagens de *S. aureus* resistente a múltiplos fármacos, bem como, atividade citotóxica intensa contra células humanas de câncer de mama. Garcia et al. (2012), investigaram o potencial biotecnológico de extratos brutos de isolados de fungos endofíticos obtidos de *Sapindus saponaria* C. Linnaeus testando-os contra cinco bactérias patogênicas. A atividade antibacteriana dos extratos obtidos a partir dos quatro isolados endofíticos foi promissora, uma vez que, todos eles inibiram o crescimento de pelo menos uma de todas as bactérias avaliadas. Estes resultados

mostraram que os isolados de *S. saponaria* possuem potencial biotecnológico para o controle de bactérias patogênicas testadas *in vitro*.

A pesquisa de novos produtos que sejam eficazes contra as mais diversas doenças e a descoberta de novas alternativas para o controle biológico na área da agricultura é um processo contínuo. Rubini et al. (2005), a fim de avaliar o potencial de endófitos no controle biológico do fungo *Crinipellis pernicioso*, agente da enfermidade vassoura-de-bruxa do cacau, estudaram a comunidade de fungos endofíticos de plantas de cacau resistentes e suscetíveis à enfermidade. Os fungos isolados foram identificados e avaliados *in vitro* e *in vivo* pela habilidade de inibir o patógeno. Entre os fungos avaliados, *Gliocladium catenulatum* reduziu a incidência da doença em 70% (RUBINI et al., 2005). Schulz et al. (2002) sugerem que a busca por novos metabólitos secundários, oriundos da natureza, deve ser feita em organismos que habitem nichos ecológicos potenciais, e neste contexto se inserem os fungos endofíticos.

Dentre estes nichos habitados por diferentes endofíticos, destacam-se as plantas medicinais como um grande reservatório de moléculas bioativas e comunidades microbiológicas diversas. As plantas medicinais foram identificadas e usadas ao longo da história da humanidade por terem a capacidade de sintetizar uma grande variedade de compostos que são utilizados para desempenhar funções biológicas importantes no tratamento, cura e prevenção de doenças (BORGES et al., 2018). O conhecimento sobre tais funções é baseado em descobertas casuais, através da observação do ambiente e da interação das espécies (GOMES et al., 2018).

De acordo com Arnold et al. (2000) e Ferrara (2006), é razoável supor que a atividade farmacológica atribuída a algumas plantas medicinais, possa estar relacionada, de alguma forma, as substâncias produzidas por micro-organismos endofíticos ou pela planta, em resposta da interação entre eles. Como por exemplo, as plantas pertencentes ao gênero *Sinopodophyllum* são utilizadas na medicina popular devido a sua ação antitumoral, antioxidante, antiviral, antibacteriana, imunossupressora e antirreumática. As propriedades atribuídas às plantas deste gênero estão relacionadas à produção de podofilotoxina (PDT) (Figura 3). Yang et al. (2003) relataram pela primeira vez fungos endofíticos obtidos a partir de *Sinopodophyllum hexandrum* T. Ying capazes de produzir podofilotoxina e seus análogos. Outros estudos relatam um importante anticancerígeno, a vincristina, isolado da planta *Catharanthus roseus* G. Don, isolado do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (JALGAONWALA, 2011).

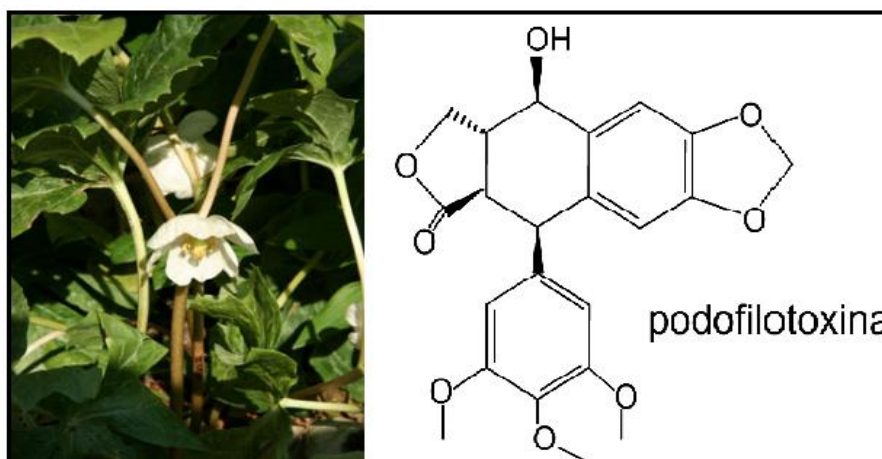


Figura 3. Estrutura química da podofilotoxina produzida pela planta medicinal *Sinopodophyllum hexandrum*.

Acredita-se que alguns endofíticos em associação com a planta medicinal hospedeira podem promover o acúmulo de metabólitos secundários originalmente produzidos pelas plantas. Estes metabólitos podem ser produzidos por ambos, planta hospedeira e/ou fungo endofítico (SHWAB & KELLER 2008; JIA et al., 2016). Tais descobertas fazem com que estes micro-organismos se tornem ainda mais atrativos como fonte de metabólitos bioativos.

2.4. Doenças tropicais negligenciadas (DTNs)

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) é um grupo de doenças endêmicas causadas por bactérias, vírus e parasitas que atingem bilhões de pessoas, sobretudo na faixa tropical do globo, onde se concentram as populações mais vulneráveis dos países em desenvolvimento. Estas enfermidades incapacitam ou matam milhões de pessoas e representam uma necessidade médica importante, pois passam a configurar um entrave ao desenvolvimento humano e econômico das nações (ADAMS et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose visceral e a doença de chagas estão entre as DTNs mais preocupantes, além de doenças como a dengue e a malária que vem aumentando drasticamente ao longo das décadas (WHO, 2017).

A Leishmaniose é uma das mais devastadoras DTN, sendo considerada endêmica em mais de 98 países. São as formas mais comuns da doença a leishmaniose visceral (LV), que leva à morte se não for tratada nas primeiras semanas, e a leishmaniose cutânea (LC), que provoca lesões crônicas ou de cura espontânea na pele e

nas cartilagens. Ao serem picados por insetos flebotomíneos infectados, animais silvestres e domésticos, como cães e gatos, se tornam repositório do parasita, contribuindo com a propagação da doença (WHO, 2005). Ainda não existe vacina eficiente para controlar a doença (DAWITT et al., 2013) e o tratamento atual consiste no uso da anfotericina B, que apesar de eficaz, possui efeitos colaterais altamente nefrotóxicos. O tratamento também pode ser prejudicado devido ao custo elevado e pela dificuldade na obtenção de formulações orais da droga (HEFNAWY et al., 2017).

Responsável por 14 mil mortes ao ano, a doença de Chagas mata mais pessoas na América Latina do que a malária ou qualquer outra doença parasitária. Segundo a OMS (2010), dez milhões de pessoas sofrem da forma crônica da doença, para a qual não existe cura (MALAFAIA, 2009; VILLELA, 2009). A cardiopatia chagásica crônica, altamente incapacitante, constitui a mais séria complicação e atinge pelo menos um terço destes pacientes em algum momento de suas vidas (WHO, 2014). Atualmente apenas duas drogas, descobertas há mais de um século, estão disponíveis para o tratamento da doença: os derivados heterocíclicos benzonidazol (CHAGAS, 1908) e nifurtimox (CHAGAS, 1909), sendo que nenhuma destas é eficaz durante a fase crônica da doença, além de ocasionar inúmeros efeitos tóxicos (SANTIAGO et al., 2017). As novas infecções ocorrem, sobretudo, pela ingestão de alimentos contaminados. Se tratada no início da fase aguda, a chance de cura pelos medicamentos disponíveis aproxima-se dos 100%, no entanto, os sintomas podem levar até 30 anos para aparecer, ou seja, quando a fase crônica já está instalada (GONTIJO et al., 2008).

Dentre as arboviroses que afetam o homem, a dengue constitui-se em um sério problema de saúde pública no mundo, com aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas expostas ao risco de infecção em cerca de 100 países de clima tropical e subtropical (KNUDSEN, 1995; CAVALCANTE, 2013). Tauil (2001) e Cavalcante (2013) classificam a dengue como uma arbovirose causada por quatro sorotipos distintos: DEN – 1, DEN – 2, DEN – 3 e DEN – 4, todas pertencentes à família *Flaviviridae* ao gênero *Flavivirus*, que reúne 53 espécies de vírus, sendo o principal vetor de transmissão o mosquito *Aedes aegypti*. Embora haja estudos sobre a doença, ainda não há no mercado vacina contra dengue, apesar de várias vacinas estarem em processo de desenvolvimento (MARIMUTH & RAVINDLER, 2016; SHARP et al., 2017). Tendo em vista o aumento da prevalência e mortalidade da dengue globalmente, há uma

necessidade em ampliar a pesquisa clínica pela busca de drogas e vacinas que atuem no combate à doença (WHO, 2005; MARIMUTHU & RAVINDLER, 2016).

As opções terapêuticas disponíveis atualmente para as DTNs são muito limitadas, insuficientes e apresentam uma série de problemas, tais como baixa eficácia, elevada toxicidade e a emergência de cepas resistentes. Apesar dos avanços na descoberta e desenvolvimento de drogas derivadas de plantas, as DTNs continuam sendo responsáveis pela morbidade e mortalidade em centenas de milhões de pessoas, especialmente em áreas pobres (GOUPIL & MCKERROW, 2014). Entre os organismos vivos, os fungos representam uma fonte promissora de substâncias naturais que poderiam ser usadas como uma ferramenta eficiente para projetar drogas e ser utilizado como uma fonte alternativa na busca de um tratamento efetivo para estas doenças (MASI et al., 2018).

2.5. Herbicidas sintéticos

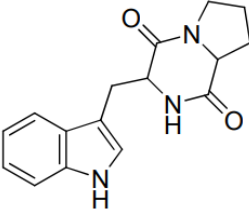
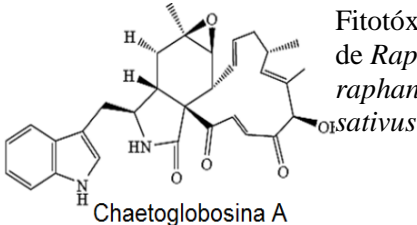
Herbicidas sintéticos são substâncias químicas aplicadas na agricultura com o objetivo de controlar o crescimento de ervas daninhas que competem com as plantas pelos nutrientes e podem abrigar pragas e doenças (VIRGINIO, 2014). O desenvolvimento acelerado da agricultura tem levado o aumento da necessidade do uso de herbicidas no sentido de reduzir a contaminação de culturas de interesse econômico (CMMAD, 1998). O glifosato, herbicida sistêmico de amplo espectro, é o mais utilizado no controle de ervas daninhas nas lavouras, uma vez que, evita a perda dos rendimentos das culturas, auxiliando no aumento da produção (MELO et al., 2017).

O uso extensivo de herbicidas, baseados em produtos químicos sintéticos, tornou-se danoso ao meio ambiente, pois além de serem responsáveis pela poluição do solo e lençóis freáticos, têm aumentado a resistência de plantas daninhas aos herbicidas utilizados, devido ao uso contínuo do mesmo produto durante anos (WAAGE, 1988; CLAY, 1989; GREEN, 2014). A ampla variabilidade genética é uma das principais características das plantas daninhas, que permite a adaptação e a sobrevivência dessas espécies em diferentes condições ambientais (CHRISTOFFOLETI & LÓPEZ, 2003).

Atualmente os fungos endofíticos têm contribuído de forma positiva na produção de novas oportunidades para diversificar o controle de pragas na agricultura e na prática agrícola. A produção de metabólitos secundários por essas espécies vem ganhando espaço devido à possibilidade de isolamento de substâncias que possam ser

aplicadas na inibição e no crescimento de plantas, especialmente as indesejáveis (SANTOS, 2008). A Tabela 1 ilustra exemplos de substâncias com atividade herbicida obtidas a partir de fungos endofíticos e suas respectivas características.

Tabela 1. Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade herbicida.

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Molécula bioativa/ Estrutura química	Atividade biológica	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Melia azedarach</i> C. Linnaeus (Meliaceae)	 Brevianamida F	Herbicida para semente de <i>Lactuca sativa</i>	Zhang et al. (2013)
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Ginkgo biloba</i> C. Linnaeus (Ginkgoaceae)	 Chaetoglobosina A	Fitotóxico para plântulas de <i>Raphanus raphanistrum</i> subsp. <i>sativus</i>	Li et al. (2014)

O potencial herbicida dos metabólitos produzidos pelos endófitos vem sendo alvo de estudo por diversos pesquisadores. Santos et al. (2008) testaram extratos obtidos da biomassa do fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*, oriundo de *Virola michelii* E. Heckel, na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de duas espécies de plantas daninhas, *Mimosa pudica* C. Linnaeus e *Senna obtusifolia* C. Linnaeus. Foi observado que os extratos apresentaram atividade herbicida, havendo variações no potencial de inibição, sendo que a germinação de sementes mostrou-se mais sensível aos efeitos dos extratos do que o desenvolvimento das plântulas.

2.6. *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae) e o Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais

O Parque Estadual do Rio Doce (PERD) está situado na porção sudoeste do estado de Minas Gerais, a 248 km de Belo Horizonte, na região do Vale do Aço, inserido nos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo (19°46'35.5"S, 42°36'08.3"W) (Figura 4). Em seus 35.970 hectares, a unidade de conservação abriga o

maior fragmento de Mata Atlântica do Estado de Minas Gerais e é a primeira unidade de conservação estadual. Sua rica diversidade natural abriga árvores centenárias, madeiras nobres de grande porte, uma infinidade de animais nativos, além da ampla diversidade de flora que compõem o cenário de uma das poucas áreas remanescentes de Mata Atlântica no Brasil (ARAÚJO, 2010).

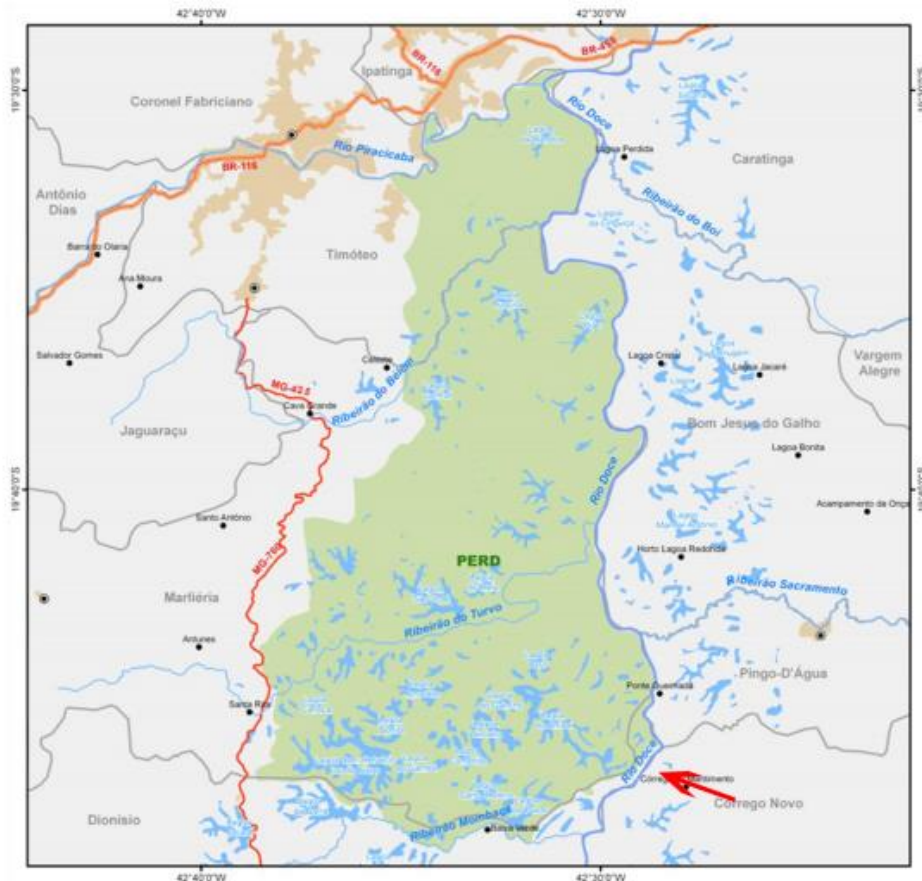


Figura 4. Mapa do Parque Estadual do Rio Doce situado na região do Vale do Aço, inserido nos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo, Minas Gerais, Brasil.

Dentre a variedade da flora presente no PERD encontram-se plantas da família Rubiaceae, uma das maiores famílias de angiospermas, com cerca de 10.700 espécies distribuídas em cerca de 640 gêneros. As espécies da família Rubiaceae apresentam grande plasticidade quanto a sua composição química, apresentando uma variedade de compostos como flavonoides, iridoides, alcaloides, antraquinonas, alguns derivados fenólicos, taninos, triterpenos e menos frequentes, saponinas (BOLZANI et al., 2001; SOUZA et al., 2013). Várias espécies pertencentes à família são estudadas com finalidades farmacológicas, além de serem utilizadas na medicina popular. Em estudos

realizados por Souza et al. (2013), das 102 espécies de Rubiaceae que foram inventariadas em estudos entobotânicos, 40 são empregadas como medicinal. Algumas espécies já possuem ação comprovada, destacando-se plantas do gênero *Psychotria* L., do qual são extraídos alcaloides indólicos utilizados como fortes analgésicos (MOURA et al., 2014). Estão presentes também plantas como a *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (Figura 5), conhecida popularmente como poaia, ipeca e reconhecida mundialmente como uma planta medicinal de grande importância econômica, por possuir dois alcaloides em suas raízes, a emetina e a cefalina. Estes alcaloides são usados no tratamento antidiarreico, amebicida, expectorante e inflamatório o que faz com que esta espécie desperte interesse nos diversos segmentos indústrias, principalmente farmacêutico, devido à possibilidade de isolamento destes compostos resultado do metabolismo secundário vegetal (ASSIS, 1999).



Figura 5. *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). FONTE: Azevedo, RN.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial dos fungos endofíticos associados à planta *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson, presente no fragmento de Mata Atlântica do Parque Estadual do Rio Doce, como fonte de metabólitos secundários bioativos.

3.2. Objetivos específicos

- Reativar os fungos endofíticos de *Carapichea ipecacuanha* obtidos da Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Preparar extratos brutos diclorometânicos a partir de todos os isolados cultivados;
- Verificar a atividade biológica dos extratos contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. e vírus da Dengue sorotipo 2;
- Avaliar a atividade herbicida dos extratos fúngicos frente a modelos de mono e dicotiledônea;
- Identificar os fungos bioativos utilizando técnicas de taxonomia moleculares.
- Caracterizar quimicamente extrato(s) do(s) fungo(s) promissor (es).

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos fungos endofíticos

Todos os fungos utilizados no presente trabalho foram isolados da planta hospedeira *C. ipecacuanha* obtidos no estudo de Ferreira et al. (2020). Todos os fungos foram adquiridos da Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. Preparo de extratos diclorometânicos a partir dos isolados fúngicos

Os fungos endofíticos obtidos foram cultivados em cinco placas de Petri 90x15 mm contendo 20 mL de meio Agar batata dextrosado (BDA) durante 15 dias e incubados a 25 °C, como controle foram utilizados 20 mL do meio de cultura sem o inóculo fúngico. Após o tempo de crescimento, o meio de cultura juntamente com o crescimento micelial, de cada uma das cinco placas, foi fragmentado e transferido para frascos Erlenmeyers de 125 mL, onde foram mantidos a -20 °C por 24 horas. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de liofilização (Liofilizador LioTop – K105) durante cinco dias. Após a completa liofilização da amostra, foi adicionado aproximadamente 100 mL de diclorometano, o frasco foi vedado e mantido a temperatura ambiente durante sete dias. Em seguida o sobrenadante (fase diclorometânica) de cada frasco foi filtrado em papel filtro (50x50 – 80g) autoclavado e transferido para tubos de vidro de aproximadamente 10 mL, previamente limpos e tarados, e mantidos na capela química para secagem à temperatura ambiente (ROSA et al., 2012). Após a obtenção dos extratos secos, os tubos de vidro foram pesados e registrada as massas obtidas dos extratos. Uma alíquota de cada extrato foi diluída em DMSO aq. 90%, a uma concentração de 20 mg mL⁻¹ e depositados na Extratoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais do IRR/FIOCRUZ a -20 °C e o restante foi armazenada a -4 °C no Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais da UFMG até a utilização nos ensaios biológicos.

4.3. Determinação da atividade herbicida

A determinação da atividade herbicida foi realizada de acordo com Gomes et al. (2018). No ensaio foram utilizadas sementes de alface crespa (*Lactuca sativa* C. Linnaeus) e de cebolinha (*Allium schoenoprasum* C. Linnaeus) como modelos de

dicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. Todas as sementes passaram por um processo de desinfestação superficial em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio a 2-2,5% (7 minutos e meio) e em seguida foram lavadas em água destilada esterilizada por quatro vezes e secas no fluxo laminar em placas de petri contendo papel de filtro estéril. Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 24 poços contendo um disco de papel filtro qualitativo (50x50 – 80 g) em cada poço. Os extratos brutos foram diluídos em acetona e testados na concentração de 1 mg mL⁻¹. Para tanto, aos poços testes foram adicionados 360 µL de água e 40 µL do extrato. Como controle negativo foi utilizado 400 µL de água deionizada autoclavada. Para o controle de toxicidade do solvente utilizado na solubilização dos extratos foi utilizado 360 µL de água e 40 µL de acetona P.A e como controle positivo de inibição de germinação foi utilizado 400 µL de glifosato (3 mg mL⁻¹). Em seguida, cinco sementes foram adicionadas em cada poço e as placas foram tampadas e seladas com parafilme e encubadas em BOD de fotoperíodo com luz contínua a 26°C por 10 dias para *L. sativa* e 14 dias para *A. schoenoprasum*. Todo o ensaio foi realizado em duplicata e em ambiente esterilizado para evitar possíveis contaminações. Após o período de germinação de cada espécie testada, foi realizada a quantificação do efeito da fitotoxicidade, para tanto, foi atribuindo uma classificação de 0 a 5, onde 0 = não houve efeito de inibição da germinação (todas as sementes germinaram) e 5 = houve inibição de 100% das sementes. Foram considerados ativos, aqueles extratos em que a média das sementes inibidas em ambos poços foi ≥ 3.

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 executados por técnicos especializados pertencentes ao Grupo de Pesquisa Química de Produtos Naturais Bioativos/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 aplicadas no ensaio. Foi utilizada uma concentração de parasita de 10⁸ células mL⁻¹ e 90 µL foram adicionados em cada poço de placas de 96 poços, seguidos de 10µL das soluções contendo as amostras e o controle da droga (0,2 mg mL⁻¹ Anfotericina B). As placas foram incubadas a 32 °C por 72 horas e o número de parasitas foi estimado pelo ensaio

colorimétrico do brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT). Os resultados foram calculados a partir das absorbâncias medidas usando a fórmula:

$$[1 - (\text{Abs}_{\text{experimento}} / \text{Abs}_{\text{controle}})] \times 100$$

A absorbância dos poços testes foi comparada com as absorbâncias dos controles com e sem drogas de referência (anfotericina B). Os extratos capazes de inibir acima de 70% a proliferação dos parasitas foram considerados ativos. Todas as amostras foram testadas em duplicata e aquelas que permaneceram ativas foram retestados para a análise da concentração necessária para redução do crescimento do parasito em 50% e para análise da concentração que induz 50% da morte celular.

4.5. Ensaio *in vitro* com células *Leishmania (Viannia) braziliensis* intracelular

Formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1994/H3227) expressando luciferase como gene repórter foram utilizadas como previamente descrito por (COTA et al., 2018). Monócitos humanos da linhagem THP-1 foram diferenciados na presença de miristato de forbol 20 ng mL⁻¹ por 72 horas a 37 °C. As células foram infectadas com *L. (V) brasilienses* na proporção parasita/macrófago de 10:1 por 3 horas. Os parasitas não internalizados foram removidos por cinco lavagens com tampão HEPES/NaCl. As células infectadas foram então tratadas com 20 µg mL⁻¹ do extrato bruto e 2 µg mL⁻¹ de anfotericina B (controle positivo) 0.006–0.8 µM. Após 72 horas a atividade da luciferase foi avaliada adicionando 20 µL de One-GloTM e detecção de luminescência usando 1 segundo de integração/poço. Células THP-1 infectada não tratada foram utilizadas como controle para comparação de crescimento.

4.6. Teste de avaliação da atividade citotóxica sobre células da linhagem THP-1

Células THP-1 (1 x 10⁶ mL⁻¹) foram colocadas em placas de 96 poços e incubadas com acetato de miristato de forbol por 72 horas a 37 °C em 5% de CO₂. As células foram então tratadas com anfotericina B (controle positivo) 0.006–0.8 µM. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas usando o ensaio MTT. 20 µL de uma solução contendo 10 mM de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adicionado a cada poço. Após 4 horas de incubação, o meio de cultura foi removido, os cristais de formazan dissolvido pela adição de 100 µL de DMSO a

absorbância ótica foi lida a $\lambda_{570\text{nm}}$. Os resultados foram calculados a partir das medidas de absorbância usando a porcentagem de morte celular em relação aos controles de células não tratadas.

4.7. Ensaios *in vitro* com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

O ensaio foi realizado por técnicos especializados da Plataforma de Ensaios Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti- *Trypanosoma Cruzii* (IRR/Fiocruz Minas) de acordo com protocolos estabelecidos por Buckner et al. (1996) e modificado por Romanha et al. (2010), usando *T. cruzi* (linhagem de Tulahuen) expressando o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli*. Para a triagem dos extratos 4.000 células L929 (fibroblasto de camundongo) em meio RPMI foram adicionadas em poços de placa de 96 poços, no volume de 80 μL , seguido de incubação para a adesão das células à superfície. Após o tempo de incubação, a infecção foi realizada com 40.000 formas tripomastigotas por poço no volume de 20 μL e as células foram incubadas por 2 horas. Em seguida, o meio contendo as formas tripomastigotas que não penetrarem nas células foi substituído por 200 μL de meio fresco e a placa novamente incubada por 48 horas para estabelecer a infecção. O meio foi então substituído pelos extratos a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio fresco (200 μL) e a placa 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 foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por 18 horas a 37 °C, e a absorbância foi medida a $\lambda_{570\text{nm}}$ em leitor automático de microplaca. Como controles foram utilizadas células infectadas não tratadas, células não infectadas e células infectadas e tratadas com benzinidazol a 3,8 μM (controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo). Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento do *T. cruzi* (redução da absorbância) dos poços experimentais em comparação com a absorbância dos poços com células infectadas e células infectadas não tratadas. Os extratos que apresentaram atividade igual ou maior que 50% foram considerados ativos e submetidos à confirmação. As amostras que se mantiveram ativas foram direcionadas para a etapa de determinação da concentração do extrato necessária para inibir o desenvolvimento de aproximadamente 50% dos parasitos e análise da concentração do composto que induz 50% da morte celular. Para isso, os extratos foram testados em concentrações decrescentes, a partir da solução

estoque de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO, utilizando-se de infecção de 10 tripomastigotas/célula/2 horas, com tempo de contato dos extratos ou frações por 4 dias.

4.8. Testes de avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos tripanomicidas

Os extratos brutos considerados ativos foram submetidos ao ensaio *in vitro* para determinação da atividade citotóxica em células L929 não infectadas utilizando o corante alamarBlue® (ROMANHA et al., 2010). As células foram expostas aos extratos em concentrações crescentes a partir do IC_{50} para *T. cruzi*. Após 96 h de exposição foi adicionado o alamarBlue® e a absorbância medidas nos λ_{570} e λ_{600} nm após 4-6 h. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem de redução entre células tratadas e não tratadas. Os valores de IC_{50} foram calculados por interpolação linear e o índice de seletividade (IS) foi determinado com base na razão do valor do IC_{50} na célula hospedeira dividida pelo valor do IC_{50} do parasita.

4.9. Avaliação da atividade antiviral contra o vírus da Dengue sorotipo 2

O ensaio antiviral com o vírus da dengue sorotipo 2 foi realizado por técnicos especializados do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (IRR/Fiocruz Minas). Os extratos na concentração de 20 mg mL^{-1} em solução aquosa com 90% de DMSO foram depositados em placas de 96 poços (1 μL poço⁻¹) e armazenados a 4 °C até o momento do ensaio. Inicialmente 7.000 células BHK-21 poço⁻¹ foram adicionadas à placa de 96 poços em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos. A monocamada celular com 80% de confluência foi observada após incubação de 24 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO_2 .

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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o volume de meio por poço foi de 200 μL . Aos poços controles foram adicionadas células não tratadas e não infectadas sem DMSO, células não tratadas e não infectadas com 0,25% de DMSO, células não tratadas e infectadas sem DMSO, células não tratadas e infectadas com 0,25% de DMSO e células infectadas e tratadas com 300 UI mL^{-1} e 600 UI mL^{-1} de interferon alfa 2B. Em seguida as placas foram reincubadas em estufa a 37 °C com 5 % de CO_2 por 72 horas.

Para a obtenção do resultado de atividade antiviral foi realizado o ensaio do brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT). Para isso o sobrenadante das placas foi removido e adicionou-se 30 μL de uma solução de MTT (2 mg mL^{-1}) dissolvido em PBS em cada poço. As placas foram incubadas novamente por 1 hora e 30 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 na velocidade de 200 rpm para dissolver os cristais. A partir dos valores de absorbância, foi calculada a porcentagem de proteção de cada extrato em comparação com os controles. Foram considerados ativos os extratos que protegeram a célula contra a infecção do vírus com porcentagem maior que 50%.

4.10. Identificação dos fungos endofíticos bioativos

Os extratos fúngicos que apresentaram atividade nos ensaios realizados tiveram seus respectivos isolados identificados no laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais da UFMG, por meio das metodologias descritas abaixo. As reações de sequenciamento foram realizadas em parceria com especialistas da Plataforma de sequenciamento de DNA (IRR/Fiocruz Minas).

4.10.1. Extração do DNA total

A metodologia aplicada para a realização da extração do DNA total dos fungos filamentosos foi à proposta por Rosa et al. (2009). Os fungos endofíticos foram crescidos durante 7 dias em meio BDA a 25°C e após o cultivo, pequenos fragmentos de micélio foram colocados em tubos de 2 mL e foram adicionados 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. Os tubos foram armazenados a -20°C por 10 minutos ou congelados até o momento da extração. Três esferas de aço inoxidável (3 mm de diâmetro) foram adicionadas no tubo contendo o fragmento do micélio e triturados em microdesmembrador por 5 minutos em rotação máxima por 3 vezes. Em seguida 162 μL de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%) foi adicionado ao tubo, homogeneizado em vórtex e incubado por 30 minutos a 65 °C. Foram acrescentados 570 μL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizados em vórtex e incubados por 30 minutos a 0 °C. O conteúdo foi centrifugado a 13200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril de 1,5 mL.

Posteriormente foram acrescentados 10% do volume de uma solução de acetado de sódio 3M, homogeneizado por inversão 10 vezes e incubado a 0 °C por 30 minutos. Em seguida a amostra foi centrifugada a 13200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. 50% do conteúdo do tubo de isopropanol (Merck) foi adicionado, homogeneizando por inversão e deixado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13200 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante descartado por inversão, seguido por homogeneização com 200 µL de etanol 70%. As amostras foram mantidas na bancada e colocadas para secar overnight à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) e a amostra foi incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenados em freezer a -20 °C.

4.10.2. Amplificação da região ITS

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para a amplificação da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng µL⁻¹). Os reagentes utilizados para a realização do MIX foram: 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 pmol, 5,0 µL de tampão de PCR (10x), 2,0 µL de MgCl₂ 1,5 M, 2,0 µL de dNTP 0,05 mM, 1,0 µL de betaína 5M, 1,0 µL de DMSO, 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf) com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Após o termino dos ciclos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em de gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5x eluídos durante 20 minutos a 120V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis revelados sob luz ultravioleta.

4.10.3. Amplificação do gene da β-tubulina

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) foram utilizados para amplificação parcial do gene da β- tubulina, conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi

realizada em um volume final de 50 μL contendo de 1,0 a 5,0 μL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). Os reagentes utilizados para a realização do MIX foram: 1,0 μL de cada iniciador BT2a e BT2b 10 pmol, 5,0 μL de tampão de PCR (10x), 2,0 μL de MgCl_2 1,5M, 2,0 μL de dNTP 0,05 mM, 1,0 μL de betaína 5M, 1,0 μL de DMSO, 0,2 μL de *Taq* DNA Polimerase e o volume final foi completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf) com a seguinte programação: 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. Após o término dos ciclos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em de gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5x eluídos durante 20 minutos a 120V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis revelados sob luz ultravioleta.

4.10.4. Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR com os iniciadores ITS e Beta-tubulina foram purificados antes de submetidos à etapa de sequenciamento. Em cada produto da PCR com volume de 47 μL foram adicionados 11,75 μL de EDTA 125 mM e 141 μL de etanol absoluto a temperatura ambiente. As amostras foram homogeneizadas por inversão por 10 vezes e mantidos por 15 minutos na bancada para a precipitação do DNA. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido por inversão e foram adicionados 120 μL de etanol 70% gelado na parede do tubo, para lavar o sedimento, e homogeneizados por inversão. Após nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol foi seco *overnight* a temperatura ambiente. O DNA, então, foi ressuspendido em 10 μL de água para injeção esterilizada e incubados em banho seco a 37 °C por aproximadamente 30 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) para em seguida ser utilizado nas reações de sequenciamento.

4.10.5. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento após a purificação dos amplicons 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. 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 adicionados: 1 μL do iniciador ($5 \mu\text{mol}^{-1}$), 1 μL de tampão presente no kit de sequenciamento, 1 μL de *Big Dye*, 1 a 5 μL de DNA de modo que a reação final contenha entre 10 e 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por um minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e quatro minutos de extensão final a 60 °C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 μL de EDTA 125 mM, 1,0 μL de acetato de sódio 3M e 50 μL de etanol absoluto foram adicionados em cada poço e a placa foi então submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 3700 rpm a 4° C e o sobrenadante descartado por inversão. Foram acrescentados 100 μL de etanol 70% 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).

4.10.6. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA dos fungos endofíticos foram comparadas com as sequências de espécies tipo 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), desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology*. A identificação dos fungos por meio das técnicas de biologia molecular seguiram os critérios propostos por Godinho et al. (2013). Os fungos que apresentaram sequências com valor de $E = 0$, cobertura e identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade quando analisadas com sequências de espécies tipo, 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. Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥ 350 pares de bases.

Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank.

4.11. Análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS)

A análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) foi realizada por especialistas do Laboratório de Química e Produtos Naturais Bioativos (IRR/Fiocruz Minas), em cromatógrafo UHPLC modelo Nexera (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução modelo maXis ETD ESI-qTOF (Bruker) controlado pelo software Compass 1.5 (Bruker). Os extratos foram diluídos em acetonitrila (5mg mL^{-1}) e 3 mL da solução foram injetados em coluna Shim-Pack XR-ODS-III (partícula 2,2 mm; 2,0 x 150mm) a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fluxo de 400 mL min^{-1} . Para a coleta de frações, 5mL (50mg) foram injetados e fracionados no sistema cromatográfico descrito anteriormente. Entretanto, o fluxo foi de 200 mL min^{-1} e a coleta feita em microplacas de 96 poços com coletor automático modelo SF2120 (Avantec). A fase móvel foi constituída de A e B (A= água e B= acetonitrila ambas com 0,1% ácido fórmico) onde os 5 min iniciais com 5% B. Em seguida, um gradiente linear de 5-100% em 40 min. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo na razão de 5Hz. A fonte de íon foi ajustada para 500 V e a voltagem do capilar para 4500 V. A pressão do gás nebulizador foi de 3,0 bar com fluxo de 8L min^{-1} a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os espectros com fragmentação automática (dados dependentes) foram registrados utilizando energia de colisão entre 15 e 60 eV. A detecção dos íons foi realizada no intervalo de 100-1500 m/z. Como solução de calibração foi utilizado formato de sódio (1mM) em 2-propanol (50%). Os cromatogramas foram analisados por algoritmos que separam os picos com subsequente determinação das fórmulas estruturais de acordo com o padrão de massa isotópica (MS1) utilizado o programa Data Analysis v.4 e o Sirius v.4.

5. RESULTADOS

5.1. Atividades biológicas dos extratos e identificação dos fungos bioativos

Extratos diclorometânicos de 275 isolados de fungos endofíticos foram avaliados para as atividades leishmanicida, tripanocida, contra o vírus da Dengue sorotipo 2 e herbicida. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram inibição $\geq 50\%$ nos ensaios contra o vírus da Dengue e *T. cruzi*, inibição $\geq 70\%$ contra *L. amazonenses* e inibição ≥ 3 sementes no ensaio herbicida. Dentre os fungos que tiveram seus extratos avaliados, 15 isolados (5,45%) apresentaram atividade biológica contra pelo menos um dos alvos testados (Tabela 2).

Os fungos potencialmente ativos foram identificados por meio de técnicas de biologia molecular, tendo sido submetidos ao sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA ou da região β -tubulina do rDNA (Tabela 3). Das 15 amostras propostas para sequenciamento, o isolado UFMGCB 15148 não foi identificado devido a não amplificação da região ITS e/ou β -tubulina e as amostras UFMGCB 15027, UFMGCB15204 e UFMGCB15290 mesmo amplificando a região β -tubulina e/ou região ITS não foram identificadas quando sequenciadas, pois não apresentaram sequências de qualidade para comparação no banco de dados.

Ao final do sequenciamento foi possível identificar 11 isolados, os quais foram agrupados em oito táxons. Os isolados UFMGCB 15029, UFMGCB 15037, UFMGCB 15040 e UFMGCB 15277 foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* e todos apresentaram atividade herbicida. Três isolados foram identificados como *Diaporthe* sp. (UFMGCB 15087, UFMGCB 15138 e UFMGCB 15195) e todos apresentaram atividade tripanocida. O isolado UFMGCB 15183 foi identificado como *Leptobacillium* sp. também foi considerado ativo para *T. cruzi*. Foram identificados dois isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma*. *Trichoderma caeruleescens* UFMGCB 15088 e *Trichoderma spirale* UFMGCB 15093, os quais exibiram atividade herbicida. O isolado UFMGCB 15230 foi identificado como pertencente ao gênero *Calonectria* e apresentou atividade herbicida para ambos os modelos de semente avaliadas.

Tabela 2. Atividades biológicas dos extratos diclorometânicos produzidos a partir dos fungos endofíticos associados à *Carapichea ipecacuanha*.

Táxon	Código UFMGCB ^a	Atividade herbicida (n° de sementes)		<i>Trypanosoma cruzi</i>				<i>Leishmania amazonensis</i>	
		<i>Lactuca</i>	<i>Allium</i>	Inibição (%)	IC ₅₀ ¹	IC ₅₀ ² L929	IS ³	Inibição (%)	IC ₅₀ ¹
		<i>sativa</i>	<i>schoenoprasum</i>						
Não identificado	15027	5 ± 0	2,5 ± 0,5	6,5	-	-	-	30	-
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	15029	5 ± 0	2 ± 0	4,6	-	-	-	41	-
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	15037	3,5 ± 0,5	2 ± 1	37,3	-	-	-	36	-
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	15040	3,5 ± 0,5	1,5 ± 1,5	-	-	-	-	-	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15087	1,5 ± 0,5	2 ± 1	100	7,3	<80	<10,9	28	-
<i>Trichoderma caeruleum</i>	15088	3,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0	-	-	-	25	-
<i>Trichoderma spirale</i>	15093	3,5 ± 0,5	1 ± 0	28,8	-	-	-	38	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15138	1,5 ± 1,5	1,5 ± 0,5	100	7,5	<40	<5,3	31	-
Não identificado	15148	3 ± 0	1,5 ± 0,5	10,4	-	-	-	46	-
<i>Leptobacillium</i> sp.	15183	0 ± 0	0,5 ± 0,5	92,7	2,3	<10	<4,3	45	-
<i>Diaporthe</i> sp.	15195	0 ± 0	1,5 ± 0,5	100	3,5	<20	<5,7	21	-
Não identificado	15204	3 ± 0	2,5 ± 0,5	31,4	-	-	-	22	-
<i>Calonectria</i> sp.	15230	3 ± 0	5 ± 0	28,6	-	-	-	39	-
<i>Colletotrichum</i> sp.	15277	0 ± 0	3,5 ± 0,5	-	-	-	-	-	-
Não identificado	15290	1,5 ± 0,5	1 ± 1	17,5	-	-	-	73	0,3783

Controles	Glifosato	5 ± 0	5 ± 0	-	-	-	-	-	-
	Benzonidazol	-	-	-	1,0	625	625	-	-
	Anfotericina	-	-	-	-	-	-	-	0,00124

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ¹Concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento parasitário em $\mu\text{g mL}^{-1}$. ²Concentração do extrato que induz 50% de morte das células em $\mu\text{g mL}^{-1}$. ³Concentração Inibitória a 50% (IC_{50}) do extrato sobre as células dividido pelo IC_{50} do extrato sobre o parasita. (-) Não avaliado.

Tabela 3. Identificação dos fungos endofíticos bioativos associados à *Carapichea ipecacuanha* por meio de técnicas de biologia molecular.

Órgão da planta	Código UFMGCB ^a	Nº de isolados	Resultado Top Blast (Nº de acesso no GenBank)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de pb analisados	Táxon proposto
Folha	15230 ¹	1	<i>Calonectria lateralis</i> (KY653258) ^b	100	99	365	<i>Calonectria</i> sp.
	15029 ¹	2	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i> (NR120133) ^b	100	99,8	434	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
	15277 ¹			99	100	428	
	15037 ¹	1	<i>Colletotrichum brevisporum</i> (KC790943) ^b	100	99,8	455	<i>Colletotrichum</i> sp. 2
	15040 ¹	1	<i>Colletotrichum citri-maximae</i> (NR160823) ^b	100	99,5	535	<i>Colletotrichum</i> sp. 3
Caule	15087 ²	3	<i>Diaporthe miriciae</i> (NR147535) ^b	100	98,3	360	<i>Diaporthe</i> sp.
	15138 ²			100	98,3	360	
	15195 ²			100	98,9	376	
	15088 ¹	1	<i>Trichoderma caerulescens</i> (NR134432) ^b	100	99	441	<i>Trichoderma caerulescens</i> (MN206848)
Raiz	15183 ²	1	<i>Leptobacillium leptobactrum</i> (NR154111) ^b	99	100	516	<i>Leptobacillium</i> sp.
	15093 ¹	1	<i>Trichoderma spirale</i> (NR077177) ^b	100	99	453	<i>Trichoderma spirale</i> (MN206843)

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^bIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. ¹Atividade herbicida. ²Atividade contra *Trypanosoma cruzi*.

Dentre os 15 táxons que apresentaram atividade biológica (Tabela 2), sete foram isolados a partir dos tecidos foliares, seis a partir do caule e dois a partir das raízes (Tabela 4). A atividade herbicida foi a que mais detectou isolados bioativos (66,67%), seguido pelo ensaio contra *T. cruzi* (26,67%) e *L. amazonensis* (6,66%). Nenhum extrato apresentou atividade antiviral.

Tabela 4. Tecido de origem dos fungos endofíticos de *Carapichea ipecacuanha* com atividades biológicas.

Táxon	Código UFMGCB^a	Tecido de origem
Não identificado	15027	Folha
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	15029	Folha
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	15037	Folha
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	15040	Folha
<i>Diaporthe</i> sp.	15087	Caule
<i>Trichoderma caeruleascens</i>	15088	Caule
<i>Trichoderma spirale</i>	15093	Caule
<i>Diaporthe</i> sp.	15138	Caule
Não identificado	15148	Caule
<i>Leptobacillium</i> sp.	15183	Raiz
<i>Diaporthe</i> sp.	15195	Caule
Não identificado	15204	Folha
<i>Calonectria</i> sp.	15230	Folha
<i>Colletotrichum</i> sp.	15277	Folha
Não identificado	15290	Raiz

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais

5.2. Determinação da atividade herbicida

A atividade herbicida dos extratos dos fungos endofíticos foi determinada pela análise qualitativa da inibição da germinação das sementes frente a modelos de monocotiledôneas (*A. schoenoprasum*/cebolinha) e dicotiledôneas (*L. sativa*/alface). Foi levado em consideração valores dos poços controles e considerando como positivo os

poços cuja média dos valores obtidos foram igual ou superior a 3 sementes não germinadas. Dos 275 extratos testados, 10 (3,63%) apresentaram atividade herbicida, sendo que 8 (80%) inibiram somente as sementes de *L. sativa*, um (10%) inibiu apenas a semente de *A. schoenoprasum* e 1 (10%) inibiu as sementes de ambas as espécies. Dentre os extratos analisados, três destes foram capazes de inibir 100% da germinação das sementes de pelo menos uma das espécies alvo. Os táxons ativos foram identificados como pertencentes aos seguintes gêneros *Colletotrichum* (4 isolados), *Trichoderma* (2 isolados), *Calonectria* (1 isolado).

5.3. Determinação da atividade leishmanicida

Entre os 275 extratos testados contra *L. amazonensis*, apenas o extrato produzido a partir do isolado UFMGCB 15290 apresentou um percentual de inibição de 73% e foi submetido ao ensaio de determinação do IC₅₀ sobre o parasita. Os extratos dos isolados UFMGCB15239, UFMG15240 e UFMG15253 todos pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, apresentaram potencial atividade inicial, mas não mantiveram a atividade no ensaio de confirmação de atividade. O extrato do isolado UFMGCB 15290 apresentou valor de IC₅₀ de 0,3783 mg mL⁻¹. A partir deste resultado, o extrato foi então submetido a um novo ensaio para determinação de IC₅₀ de *L. brasilienses*, para avaliar o potencial do parasita dentro da célula, e IC₅₀ sobre as células da linhagem THP-1 para determinação da citotoxicidade do extrato. O resultado de IC₅₀ sobre o parasita foi de 42 µg mL⁻¹, o valor de IC₅₀ sobre as células >100 µg mL⁻¹, sugerindo baixa atividade citotóxica para as células THP-1. A caracterização química do extrato obtido a partir do isolado UFMGCB 15290 encontra-se em andamento para determinação dos possíveis metabólitos bioativos.

5.4. Determinação da atividade tripanocida

Dos 275 extratos testados, quatro apresentaram atividade contra *T. cruzi* (1,45%) sendo que todos apresentaram percentual de inibição superior a 90%. Os isolados pertencentes ao gênero *Diaporthe* apresentaram percentual de inibição de 100%. Os extratos ativos foram submetidos ao ensaio de determinação de IC₅₀ sobre o parasita, IC₅₀ sobre as células e o índice de seletividade foi calculado para a obtenção de dados mais acurados com relação à eficiência dos extratos avaliados. Na determinação dos resultados do ensaio IC₅₀ é relevante que se obtenha um baixo valor de IC₅₀ sobre o

parasita (concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento do parasita), um alto valor de IC₅₀ sobre as células (concentração de extrato que induz 50% da morte celular), e alto índice de seletividade (razão entre o IC₅₀ sobre as células e IC₅₀ sobre o parasita), assim como observado para o controle positivo benzonidazol. Os extratos dos isolados *Leptobacillum* sp. UFMGCB15183 e *Diaporthe* sp. UFMGCB 15195 apresentaram os menores valores de IC₅₀ no parasita, 2,3 e 3,5 µg mL⁻¹, respectivamente, sugerindo promissora atividade de inibição do crescimento das formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. O extrato referente ao isolado *Diaporthe* sp. UFMGCB 15138 apresentou IC₅₀ de 7,5 µg mL⁻¹ sobre o parasita e 40 µg mL⁻¹ sobre as células. Dentre as amostras testadas o extrato do isolado *Diaporthe* sp. UFMGCB15087 apresentou o maior valor de IC₅₀ na célula hospedeira (80 µg mL⁻¹) e maior índice de seletividade (10,9) sugerindo baixa atividade citotóxica e a potencial atividade do composto contra o parasito sem causar danos à viabilidade das células, comparado as outras amostras testadas. Os potenciais extratos com atividade contra *T. cruzi* estão sendo caracterizados para determinação dos possíveis metabólitos bioativos. No entanto, até o presente momento, foi possível concluir apenas a caracterização do isolado *Diaporthe* sp. UFMGCB 15138.

5.5. Desreplicação: análise química dos metabólitos bioativos

O extrato do isolado *Diaporthe* sp. UFMGCB 15138 foi submetido ao fracionamento químico pela técnica de UHPLC-MS visando à identificação dos possíveis metabólitos bioativos contra *T. cruzi*. Duas frações (72 e 73) apresentaram potencial atividade com percentuais de inibição de 100 e 91,55%, respectivamente, e IC₅₀ > 20 µg mL⁻¹ sobre as células L929. A partir da análise dos cromatogramas referente às frações ativas (Figura 6) foi possível identificar a substância como sendo um dímero de xantonas, como por exemplo, dicerandrol C (Figura 7) ou phomoxantona B. O dímero de xantona provável responsável pela atividade biológica apresenta a fórmula molecular C₃₉H₄₀O₁₅ e massa molecular de 750,6987 g mol⁻¹.

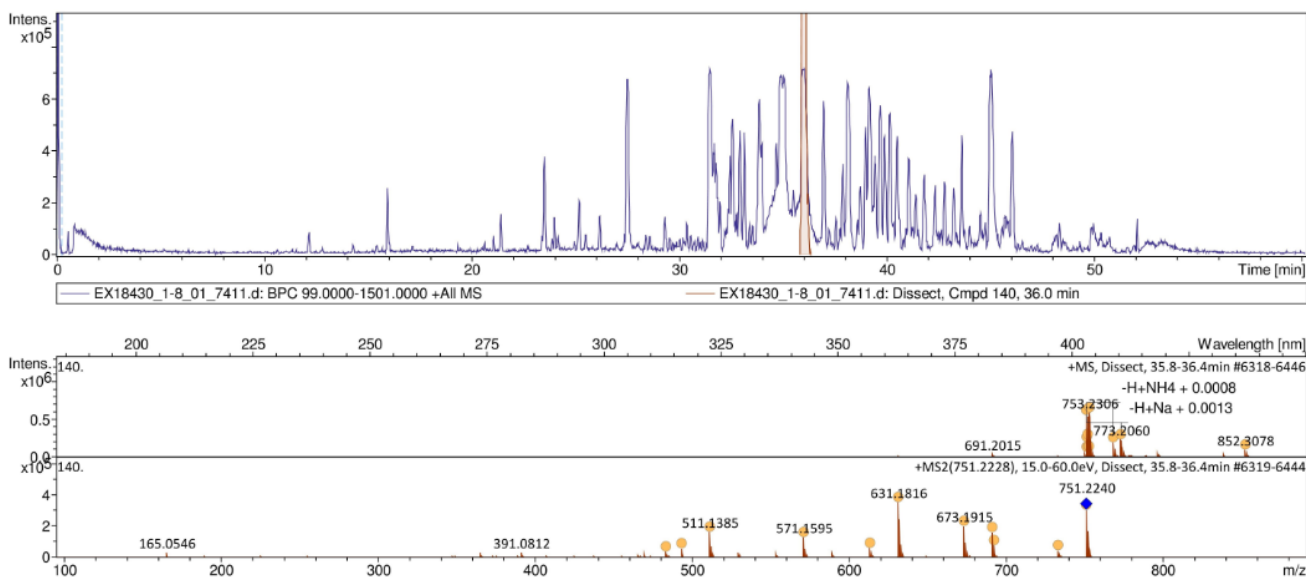


Figura 6. Cromatograma de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa das frações ativas.

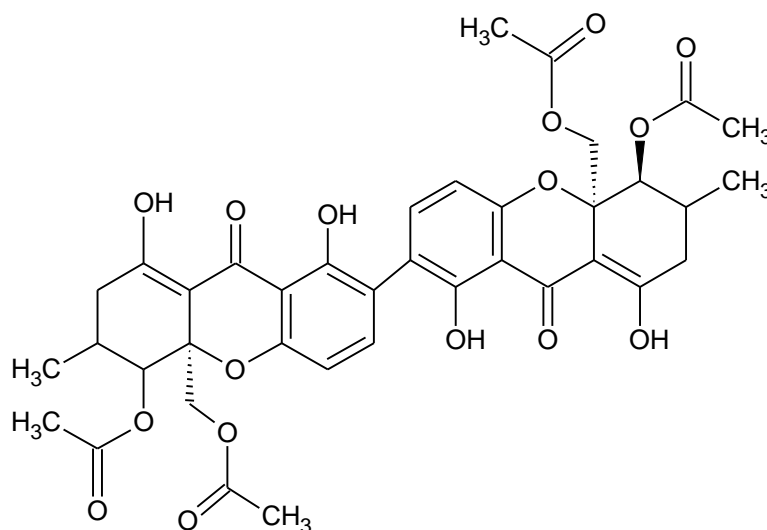


Figura 7. Estrutura do dicerandrol C ($C_{39}H_{40}O_{15}$), dímero de xantona.

6. DISCUSSÃO

6.1. Relação fungo endofítico, tecido/órgão colonizado e bioatividade

Segundo Araújo (2002), os mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais podem ser colonizados por diversas espécies de micro-organismos endofíticos. A preferência por determinados órgãos pode ser interpretada como a capacidade dos fungos utilizarem substratos específicos. No entanto, as folhas representam a porta de entrada para fungos, por possuírem tecidos frágeis, expostos e devido à presença de estômatos (SOUZA et al., 2004). De acordo com Verna et al. (2007), a folha vegetal é um tecido ideal para o estudo dos endofíticos e avaliação do potencial de seus metabólitos secundários e, também têm se mostrado ser o maior reservatório de riqueza de espécies. A menor taxa de isolamento obtida a partir das raízes pode estar relacionada com diversos fatores inerentes ao caráter medicinal da planta hospedeira. As propriedades terapêuticas deste vegetal deve-se a composição alcaloídica de suas raízes, sendo os principais emetina e cefalina (Figura 8). De acordo com Calixto et al. (2016), a emetina possui atividade citotóxica e atua inibindo a síntese de proteínas e de DNA que podem atuar como mecanismo de defesa da planta hospedeira.

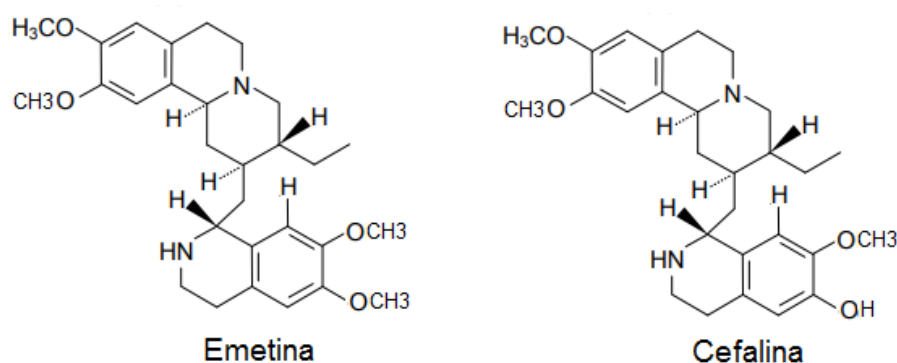


Figura 8. Estrutura dos principais alcaloides presentes nas raízes da *Carapichea ipecacuanha*.

Além disso, a partir do extrato das raízes e rizomas de *C. ipecacuanha* já foram isolados os metabólitos protoemetina, emetamina, 9-demetilprotoemetinol, neocefalina, isocefalina, 7'-O-demetilcefalina, 10-O-demetilcefalina, O-metilpsicotrina e 12 glicosídeos monoterpenos-tetraidroisoquinolínicos como 6-O-metilipecosídeo, ácido

ipecosídeo, alangisídeo, demetilalangisídeo, neoipecosídeo, 7-O-metilneoipecosídeo, 7-O-metilipecosídeo, 3,4-desidroneoipecosídeo, trans-cefalosídeo, cis-cefalosídeo, 6-O-metil-trans-cefalosídeo e 6-O-metil-cis-cefalosídeo relatados por alguns autores com atividade fungicida (HATFIELD et al., 1981; FERNÁNDEZ,1991; ITOH et al., 1991; NAGAKURA et al., 1993; ITOH et al., 1994; ITOH et al., 1999).

6.2. Atividade herbicida

Os táxons ativos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Colletotrichum*, *Trichoderma* e *Calonectria*. Durante as últimas décadas, diversos micro-organismos endofíticos têm sido estudados com objetivo de avaliar o seu potencial biológico e realizar a caracterização química de seus metabólitos (GUNATILAKA, 2006). Waqas et al. (2013), demonstraram que os extratos produzidos a partir do fungo endofítico *Cladosporium cladosporioides* LWL5, isolado de *Helianthus annuus* C. Linnaeus, produziu metabólitos com potencial inibitório de 100% a uma concentração de 1000 ppm frente à germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*). Schulz et al. (2002) isolaram fungos endofíticos de plantas originárias da Alemanha, Costa Rica e Ilha da Mallorca (Espanha) e 43% dos fungos manifestaram atividade herbicida contra a alga *Chorella fusca*. Amorim (2018) ao estudar fungos endofíticos isolados da planta *Lafoensia pacari* A. Saint-Hilaire obteve 46 extratos com potencial herbicida contra sementes de *L. sativa* e *A. schoenoprasum*.

Espécies do gênero *Colletotrichum* já foram encontradas como habitantes assintomáticos de tecidos de diversas plantas. Vários estudos foram realizados a fim de se obter metabólitos secundários desta espécie e observou-se que estes fungos são capazes de sintetizar compostos de diferentes classes químicas e com diversas atividades. García-Pajón & Collado (2003) realizaram uma revisão bibliográfica sobre o gênero *Colletotrichum*, onde aspergillomarasmina A e B, gloeosporona e ácido colletotricó foram isoladas de *C. gloeosporioides*. Outros metabólitos também foram isolados como, uracila, lumichroma e ferricrocina possuindo atividade fitotóxica (INÁCIO et al., 2006). A aplicação de estruturas de fungos deste gênero como, esporos e conídios, tem sido empregada como agente de biocontrole de plantas daninhas, preparados como herbicidas biológicos ou mico-herbicidas. Um método para controle de *Aeschynomene virginica* N. Britton ocorre por meio da aplicação de esporos do fungo *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* que levou ao desenvolvimento do produto

disponível comercialmente como COLLEGO, um mico-herbicida aplicado em campos de arroz nos Estados Unidos (JAYAWARDENA et al. 2016). BIOMAL foi outro mico-herbicida produzido a partir de esporos do fungo *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae* para o controle de *Malva pusilla* J. Smith, uma *Malvaceae* de difícil controle por métodos químicos. Estudos demonstram também que a aplicação de propágulos de *Colletotrichum malvarum* é capaz de controlar *Sida spinosa* C. Linnaeus, responsável pela intoxicação de culturas e a inviabilização da colheita (BARRETO et al., 2007; CARVALHO, 2013).

Os táxons *Trichoderma spirale* e *Trichoderma caerulescens* ainda não foram reportados como produtores de substâncias herbicidas, no entanto espécies deste gênero são frequentemente isolados e caracterizados pela produção de diversos metabólitos e enzimas utilizadas na indústria como agente de biocontrole contra patógenos de plantas e atuantes no desenvolvimento estrutural de plantas (SOUZA et al., 2004; KUBICEK et al., 2008). Javaid & Ali (2011) avaliaram o potencial herbicida de filtrados de cultura de quatro espécies, *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, *Trichoderma reesei* Simmons e *Trichoderma viride* Pers frente a *Phalaris minor* C. Linnaeus e *Rumex dentatus* C. Linnaeus, duas ervas daninhas prejudiciais à cultura do trigo. Todos os metabólitos produzidos pelas quatro espécies reduziram significativamente parâmetros de crescimento de raiz e de parte aérea das duas espécies alvo de plantas daninhas. Estes fungos são também utilizados como agente de biocontrole por serem antagonistas eficazes de uma ampla faixa de fungos fitopatogênicos devido à produção de metabólitos voláteis e não voláteis (MELO, 1996; HOWELL, 2003; ETHUR et al., 2007; ALMEIDA, 2009).

Em um experimento *in vivo* voltado para o controle de damping-off em feijão utilizando uma formulação constituída de três isolados de *Trichoderma* sp., Nashwa et al. (2008) notaram redução considerável da porcentagem de “tombamento” do feijoeiro. Em trabalhos envolvendo *Trichoderma* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Entrophospora colombiana* utilizados para o controle do agente causador da “murcha” em feijão, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*, Avendaño & Rondon (2006) detectaram que *Trichoderma* sp. sozinho foi o tratamento que apresentou melhor proteção para planta. Morsy et al. (2009) testaram *Trichoderma viride* no controle de *Fusarium solani* em tomate e obtiveram resultados promissores tanto para o estímulo de crescimento quanto

no controle do patógeno, além de ser observado aumento na produtividade e melhoria na qualidade nutricional da planta.

O gênero *Calonectria* ainda não foi reportado como produtor de substâncias herbicidas. Contudo, já é descrito na literatura a existência de fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários da família Nectriaceae, a qual abriga *Calonectria*. Segundo Guu (2007), fungos da família Nectriaceae constituem um grupo diverso e inclui espécies endofíticas, fitopatogênicas ou sapróbias. Um estudo químico de fungos endofíticos associados a plantas do bioma Caatinga foi realizado e caracterizados metabólitos não voláteis produzidos por 10 fungos da família Botryosphaeriaceae e um de Nectriaceae (OLIVEIRA, 2017). Dentre os gêneros pertencentes a Nectriaceae destaca-se *Fusarium*, que abriga diferentes espécies e linhagens capazes de produzir muitos metabólitos bioativos.

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e entre eles o glifosato é o herbicida mais comercializado no país (Brasil, IBAMA, 2018). De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2019), a chance destes agrotóxicos atingirem o solo e as águas é muito grande devido precipitação pluviométrica, que promove a contaminação dos lençóis freáticos. Além disso, o uso inapropriado de herbicidas tem provocado a evolução dos casos de resistência por diversas ervas daninhas (KARAM, 2018). Com isso, o emprego dos herbicidas naturais, produzidos por meio de metabólitos secundários isolados a partir de fungos endofíticos, passe a ser uma alternativa para reduzir os impactos ao meio ambiente.

6.3. Atividade leishmanicida

O extrato do isolado UFMGCB 15290 mostrou-se potencialmente ativo contra formas amastigota de *L. amazonenses* e formas intracelulares de *L. brasiliensis* e por isso, torna-se um alvo interessante para futuros estudos na investigação e caracterização de possíveis substâncias ativas. Apesar das diversas tentativas de identificação do táxon UFMGCB 15290, não foi possível alcançar um resultado satisfatório nas análises das sequências de seu DNA obtidas. Segundo Fulton et al. (1995), a dificuldade de identificação de alguns fungos pode estar relacionada com a degradação do DNA no processo de extração ou até mesmo a indisponibilidade de uma região que pode estar ocupada por uma biomolécula, impossibilitando a amplificação na etapa de PCR. Para aqueles que chegam a amplificar, a não identificação pode estar relacionada com a etapa

de purificação dos amplicons, que deve garantir a eliminação dos resíduos de primer, solvente e de DNA não amplificado, aumentando a qualidade das sequências produzidas na PCR.

Diversos trabalhos têm sido realizados com objetivo de explorar o potencial biotecnológico da comunidade de fungos endofíticos na busca de metabólitos bioativos contra *Leishmania*. Santiago et al. (2012) isolaram 564 fungos endofíticos de *Deschampsia antarctica* E. Desvaux e *Colobanthus quitensis* F. Bartling provenientes da Antártica, que foram avaliados quanto a sua capacidade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. amazonenses*. Destes, 12 extratos fúngicos inibiram a proliferação do parasita com IC₅₀ entre 0,2 e 12,5 µg mL⁻¹. Já Campos et al. (2008), isolaram o fungo endofítico *Cochliobolu* sp. (UFMGCB-555) da planta *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) e seu extrato apresentou atividade leishmanicida inibindo 90% das formas amastigotas de *L. amazonensis*. Posteriormente, estes autores determinaram que as substâncias coclioquinona A e isococlioquinona A foram as responsáveis pela atividade leishmanicida.

O estudo e a caracterização de moléculas que atuam inibindo o parasita tem se tornado também um foco de estudo. Cota et al. (2018), isolaram as substâncias ácido 10-acetil tricoderônico, ácido 6'-acetoxipilifórmico e ácido hidroheptelídico a partir do fungo endofítico *Nectria pseudotrichia* associado a planta *Caesalpinia echinata* J. Lamarck. Estas substâncias apresentaram atividade contra a forma amastigota de *L. braziliensis*, com valores de IC₅₀ de 21,4, 28,3 e 24,8 µM, respectivamente. Alves et al. (2018), isolaram lipases dos fungos endofíticos *Vermisporium-like*, *Emericella nidulans*, *Dichotomophtora portulacae* e *Dichotomophtora boerhaaviae* associados as sementes da planta *Jatropha curcas* C. Linnaeus e avaliaram o seu potencial leishmanicida contra *L. amazonensis*. Todos os extratos inibiram a proliferação celular em uma concentração de 5 mg mL⁻¹, exibindo efeito antiproliferativo igual ao padrão glucantime após de 24 horas.

Estimativas apontam haver no mundo 12 milhões de pessoas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, estando 350 milhões de pessoas em 88 países em situação de risco (MARTÍNEZ et al., 2011). De acordo com o Ministério da saúde do Brasil, no período de 2001-2012, dos 40.883 casos de leishmaniose visceral notificados, 2.669 levaram ao óbito, evidenciando-se assim, o grave problema de saúde pública no âmbito nacional e mundial decorrente de infecções por este parasita (RAMOS, 2013). A

busca por novos metabólitos leishmanicidas tem gerado grande investimento nas pesquisas atuais, portanto a partir dos resultados aqui apresentados, fica evidente a possibilidade de utilização de fungos endofíticos como fonte promissora para estas novas moléculas e a necessidade aparente de estudos mais aprofundados nessa área.

6.4. Atividade tripanocida

Os extratos dos isolados pertencentes ao gênero *Diaporthe* e *Leptobacillium* mostraram-se potenciais quanto à produção de metabólitos bioativos tripanocidas. Em se tratando do potencial biotecnológico dos fungos endofíticos como uma fonte promissora de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, diversos estudos já foram realizados objetivando a avaliação de extratos fúngicos com possível atividade contra *T. cruzi*. Guimarães (2008) ao realizar a prospecção biológica em fungos endofíticos associados à *Viguiera arenaria* Baker verificou que o extrato VA14A (1 mg mL⁻¹) exibiu um bom nível de atividade (95%) frente às enzimas gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase de *T. cruzi*. Cota et al. (2008) verificaram que o extrato orgânico da cultura de *Alternaria* sp., isolado de *Trixis vauthieri* A. Candolle, foi capaz de inibir a atividade da enzima TryR de *T. cruzi* em 99%, quando testado a uma concentração de 20 µg mL⁻¹. Amorim (2018) testou a atividade tripanocida de 233 fungos endofíticos provenientes da planta *Lafoensia pacari* e 14 deles apresentaram atividade frente ao parasita, dos quais *Valsariaceae* sp. (IC₅₀ 25,5 µg mL⁻¹), *Coniothyrium* sp. (IC₅₀ >5 µg mL⁻¹), *Aspergillus aculeatus* (IC₅₀ 9,1 µg mL⁻¹) e UFMGCB11413 (IC₅₀ <5 µg mL⁻¹) demonstraram as melhores atividades.

Espécies do gênero *Diaporthe* são frequentemente encontrados em associação com plantas medicinais e o seu potencial na produção de metabólitos bioativos já foi descrito (CARVALHO et al., 2012; VIEIRA et al., 2014; SILVA-HUGHES et al., 2015). Ferreira et al. (2015) investigaram a comunidade de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Carapa guianensis* J. Aublet e seu potencial para a produção de substâncias bioativas. Dos 162 fungos endofíticos isolados, as espécies *Diaporthe* cf. *mayteni* e *Endomelanconiopsis endophytica* apresentaram alta atividade contra as formas amastigotas de *T. cruzi*. Oliveira et al. (2017) produziram 23 extratos de fungos endofíticos isolados da semente e raízes de *Paullinia cupana* K. Kunth e avaliaram sua ação tripanocida. Entre eles, 19 extratos se mostraram ativos frente à forma epimastigota do parasita, sendo os isolados *Marianna camptospora*, *Xylogone*

ganodermophthora, *Fusarium solani*, *Gibberella zea*, *Glomerella acutata* e *Diaporthe phaseolorum* os que apresentaram maior atividade tripanocida. Para *Marianna camptospora* e *Xylogone ganodermophthora* foram obtidos percentuais de lise parasitária de 100% quando comparados ao padrão benzonidazol, mesmo na menor concentração avaliada ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Não foram encontrados relatos na literatura que descrevam espécies do gênero *Leptobacillium* com atividade contra *T. cruzi*. Porém estudos relatam à existência de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales, a mesma de *Leptobacillium*, produtores de metabólitos secundários utilizados no controle biológico de insetos e pragas. Este é o caso de *Beauveria bassiana*, endofítico do milho que protege o hospedeiro contra o ataque de insetos a partir da produção de metabólitos secundários (BING & LEWIS 1993; WAGNER & LEWIS 2000; PIMENTEL, 2001).

A doença de Chagas é uma enfermidade com elevada carga de mortalidade afetando aproximadamente sete a oito milhões de indivíduos. Estima-se que mais de 90 milhões de pessoas estejam em risco de infecção pelo agente etiológico da doença (COURA & DIAS 2009; WHO, 2014b; VAZQUEZ et al., 2015). Os atuais medicamentos utilizados no tratamento da doença apresentam eficácia limitada, possuindo mais efeito na fase aguda da doença e estão associados a presença de efeitos colaterais graves, o que leva ao abandono no tratamento por muitos pacientes (GUEDES et al., 2011; SOUSA, 2018). Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram a existência de fungos endofíticos com potencial atividade biotecnológica contra *T. cruzi*, sendo necessários estudos futuros para o conhecimento e a aplicação das moléculas bioativas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos úteis no tratamento da doença.

6.5. Desreplicação: análise química dos metabólitos bioativos

A análise cromatográfica das frações ativas extrato bioativo de *Diaporthe* sp. UFMGCB 15138 identificou a substância ativa como um dímero de xantona, Entretanto, será necessário o isolamento e a caracterização da substância por meio de técnicas mais refinadas, como ressonância magnética nuclear (RMN), para assegurar certificação da identificação da molécula. Substâncias como dicerandrol e fomoxantona, pertencentes a esta classe de substâncias químicas, já foram isoladas de fungos endofíticos e suas atividades biológicas descritas na literatura. Erbert et al. (2012)

descreveram dois metabólitos secundários, dicerandrol C e ácido micofenólico, isolados do fungo endofítico *Phomopsis longicolla* obtido da alga vermelha *Bostrychia radicans*. O dicerandrol C revelou ação antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. saprophyticus* (ATCC 15305), com MIC de 1 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Dicerandrol A, B e C isolados a partir de *P. longicolla* obtido da planta *Dicerandra frutescens* L. Shinnars apresentaram zonas de inibição de 11, 9,5 e 8,0 mm, respectivamente, contra *Bacillus subtilis* e 10,8, 9,5 e 7,0 mm e contra *S. aureus*, quando testado em 300 $\mu\text{g disco}^{-1}$ (DESHMUKH et al., 2015). *Phomopsis* sp. HNY29-2B isolado do ramo de *Acanthus ilicifolius* C. Linnaeus coletada na China foi relatado como fonte de dicerandrol A, dicerandrol B, dicerandrol C e penexantone A. Dicerandrol A exibiu atividade citotóxica de amplo espectro contra as linhagens de células cancerígenas, MDA-MB-435 (mama), HCT-116 (colón), Calu-3 (pulmão) e Huh7 (fígado) com valores de IC_{50} de 3,03, 2,64, 1,76 e 4,19 μM , respectivamente. Dicerandrol B exibiu atividade citotóxica contra MDA-MB-435, HCT-116, Calu-3 ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) e efeitos citotóxicos menos acentuados na linhagem celular epitelial da mama humana (DING et al., 2013). Isaka et al. (2011) utilizaram o endófito *Phomopsis* sp. BCC depositado na coleção de cultura BIOTEC e isolaram duas xantonas, fomoxantona A e B. Estes dois compostos exibiram significativa atividade contra *Plasmodium falciparum* (IC_{50} 0,11 e 0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e contra *Mycobacterium tuberculosis* (IC_{50} 0,50 e 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

7. CONCLUSÕES

A extensa diversidade de plantas medicinais presentes nos diferentes biomas naturais do Brasil representa um rico reservatório de fungos endofíticos, os quais possuem potencial de produzir metabólitos secundários bioativos que podem ser utilizados em processos biotecnológicos úteis na medicina e agricultura. *C. ipecacuanha* faz parte desse cenário da rica biodiversidade brasileira e se mostrou um reservatório natural de fungos endofíticos produtores de moléculas bioativas, em especial contra agentes causadores de DTNs e também herbicidas. Por isso, estes fungos podem ser considerados bons candidatos para estudos fermentativos e químicos mais detalhados para obtenção e caracterização das substâncias ativas capazes de controlar DTNs e herbicidas para uso na agricultura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.; GURNEY, K.A.; PENDLEBURY, D. Thomson Reuters Global Research Report: Neglected Tropical Diseases. Leeds: Evidence, 2012.
- ALVES, D.R.; DE MORAIS, S.M.; TOMIOTTO-PELLISIER, F.; VASCONCELOS, F.R.; FREIRE, F.D.C.O.; DA SILVA, I.N.G.; NORONHA, A.D.A.A. Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. *PloS one*, 13: 196796, 2018.
- ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology Biotechnology*, 90: 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. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- ARAÚJO, V.R.M.; PACHECO, D.; SÁ, A.; SANTOS, J.; SILVA, N. Análise do impacto do uso público da Trilha do Vinhático, localizada no Parque Estadual do Rio Doce-MG. VI Congresso Nacional de Excelência em Gestão, 2010.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. Manual isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba, 86, 2002.
- ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21: 51-66, 2007.
- ARNOLD, A.E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3): 541-549, 2007.
- ARNOLD, A.E.; HERRE, E.A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388-398, 2003.
- ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, 3: 267-274, 2000.

- ASSIS, M.C.; GIULIETTI, A.M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha”-*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, 22: 205-16, 1999.
- AVENDAÑO, C.; ARBELÁEZ, G.; RONDÓN, G. Biological control of *Phaseolus vulgaris* bean vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* with combined *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp. and *Pseudomonas fluorescens* action. *Agronomía Colombiana*, 24: 62-67, 2006.
- AZEVEDO, J.L.; JÚNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O.; ARAÚHO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Eletronic Journal of Biotechnology*, 3, 2000.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In Melo IS, Azevedo JL, *Ecologia microbiana*. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 117-137, 1998.
- BACON, C.W.; WHITE, J.F. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker 10 Inc, 2000.
- BARRETO, R.W.; NECHET, K.L.; VIEIRA, B.S. Herbicida biológico para controle de plantas daninhas contendo propágulos do fungo *Lewia chlamidosporiformans*. Número de protocolo PI0701556-9.2007. 2007.
- BING, L.A.; LEWIS, L.C. Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Agriculture, ecosystems & environment*, 45: 147-156, 1993.
- BOLZANI, V.S.; YONG, M.C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S.; LOPES, M.N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomic and biological significance. *Recent Research developments in phtochemistry*, 5: 19-31, 2001.
- BORGES, K.N.; BAUTISTA, H. Etnobotânica de plantas medicinais na comunidade de Cordoaria, litoral norte do estado da Bahia, Brasil. *PLURAIIS-Revista Multidisciplinar*, 1(2), 2018.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>Acesso: Dezembro, 2019.
- BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C.L.; FLAMME, A.C.L.A; VOORHIS, W.C.V. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi*

- using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, 40: 2592–2597, 1996.
- CALIXTO, N.O.; PINTO, M.E.F.; RAMALHO, S.D.; BURGER, M.; BOBEY, A.F.; YOUNG, M.C.M.; PINTO, A.C. The Genus *Psychotria*: phytochemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and biological properties. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 1-24, 2016.
- CAMPOS, F.F.; ROSA, L.H.; COTA, B.B.; CALIGIORNE, R.B.; RABELLO, A.L.T.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L. Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(12), 2008.
- CAMPOS, F.F.; JUNIOR, P.A.S.; ROMANHA, A J.; ARAÚJO, M.S.S.; SIQUEIRA, E.P.; RESENDE, J M.; ALVES, T.M.A.; 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, 110: 1– 10, 2015.
- CARVALHO, C.R.; GONÇALVES, V.N.; PEREIRA, C.B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I.V.; ALVES, T.M.; RABELLO, A.L.T.; SOBRAL, M.G.; ZANI, C.L.; ROSA, A.C.; ROSA, H.L. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, 57:95-107, 2012.
- CARVALHO, L. B. Plantas daninhas. Lages, Santa Catarina, 1: 82, 2013.
- 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, 141: 975–981, 2012.
- CHEN, C.A.; CHANG, C.C.; WEI, N.V.; CHEN, C.H.; LEIN, Y.T.; LIN, H.E.; DAI, C.F.; WALLACE, C.C. Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in *Scleractinian corals*. *Zoological Studies*. 43: 759-771, 2004.

- CHRISTOFFOLETI, P.J.; LÓPEZ-OVEJERO, R.F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Coord.) Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Londrina: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2-21, 2003.
- CMMAD – COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. Nosso futuro comum. Rio de Janeiro: Fundação Getulio Vargas, 1988
- COTA, B.B.; ROSA, L.H.; CALIGIORNE, R.B.; RABELLO, A.L.T.; ROSA, C.A.; ZANI, CARLOS, L. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiology Letters, 285: 177-182, 2008.
- 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 pseudotrachia*, an endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 113: 102-110, 2018.
- COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104: 31- 40, 2009.
- DA SILVA ALMEIDA, W.K.D. Antagonismo de *Trichoderma viride* Sobre Fungos Fitopatogênicos, *Colletotrichum* Spp. *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em Fruteiras Tropicais. Cadernos de Agroecologia, 4(1), 2009.
- DA SILVA, M.A.V. A busca por herbicidas de base natural. Biotecnologia e biossegurança, Brasília DF, EMBRAPA- SPI, 2014.
- DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on biology, epidemiology and public health significance of Leishmaniasis. J Bacteriol Parasitol, 4(2): 166, 2013.
- DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. Journal of Chemical Ecology, 26(9): 2079-2094, 2000.
- DE ABREU, L.M. Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron Perrottettii* (DC) Eichler e sua hospedeira *Tapirira Guianensis* Aubl. Universidade Federal de Lavras, 2005.

- DE AMARANTE, J. OZELITO, P et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quimica nova*, 589-593, 2002.
- DE OLIVEIRA, M. S.; VIEGAS, I. Sintomas de macronutrientes e de boro em plantas de ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* B. Rich). Belém, PA. Resumos. Belém, 1997.
- DESHMUKH, S.K; VEREKAR, S.A; BHAVE, S.V. Endophytic fungi. A reservoir of antibacterials. *Frontiers in Microbiology*, 5(1): 1- 43, 2015.
- DING, B et al. New dimeric members of the phomoxanthone family: phomolactonexanthonones A, B and deacetylphomoxanthone C isolated from the fungus *Phomopsis* sp. *Marine drugs*, 11(12): 4961-4972, 2013.
- DOS SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(2): 199-212, 2011.
- DREYFUSS, M.M.; CHAPELA, I.H. Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. 1994.
- ELLIOT, S.L.; SVELIS M.W.; JANSSEN, A.; VAN DER, G.L.P.S.; BEERLING, E.A.M.; FRANSEN, J. Can plants use entomopathogens as body guards. *Ecology Letters* 3: 228-235, 2000.
- ERBERT, C et al. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. *Botanica marina*, 55(4): 435-440, 2012
- ETHUR, L.Z. et al. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. *Ciencia rural*, 37(6): 1794-1797, 2007.
- FAETH, S.H.; FAGAN, W. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrated and Composition Biology*, (42): 360-368, 2002.
- FERNÁNDEZ, M.F. Estudo de alguns métodos de síntese de nafto [a] y nafto II[b] quinolizidinas e indolizidinas. 1991.
- FERRARA, M.A. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. *Revista Fitos*, 2:73-79, 2006.
- FERREIRA, M.C. et al. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal

- Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59:36-44, 2015.
- FIRAKOVA, S.; STURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, 62(3): 251-257, 2007.
- FLORINDO, R.H.S. Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais. 2019.
- FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D.; MASAPHY, S.; LEVANON, D.; HENIS, Y.; KELLY, S.L. *Plant Molecular Biology Reporter*, 13: 207-209, 1995
- GANJHU, R.K.; MUDGAL, P.P.; MAITY, H.; DOWARHA, D.; DEVADIGA, S.; NAG, S.; ARUNKUMAR, G. Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. *Virusdisease*, 26(4): 225-236, 2015.
- GARCIA, A.; RHODEN, S.A.; BERNARDI-WENZEL, J.; ORLANDELLI, R.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(10): 035-040, 2012.
- GARCÍA, A., RHODEN, S.A., FILHO, C.J.R., NAKAMURA, C.V., PAMPHILE, J.A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biological Research* 45: 139-148, 2012.
- GARCÍA-PAJÓN, C.M.; COLLADO, I.G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Natural Product Reports*, 20: 426-431, 2003.
- GIOVANELLI, B.F. Seletividade de herbicidas sobre milho. 2019.
- 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, 61(4): 1323–1330, 1995.
- GOMES, E. C. Q; GODINHO, VALÉRIA M. ; SILVA, D. A. S. ; DE PAULA, MARIA T. R. ; VITORELI, GISLAINE A. ; ZANI, CARLOS L. ; ALVES, TÂNIA M. A. ; JUNIOR, POLICARPO A. S. ; MURTA, SILVANE M. F. ; BARBOSA, EMERSON C. ; OLIVEIRA, JAQUELLINE G. ; OLIVEIRA, FABIO S. ; CARVALHO, CAMILA R. ; FERREIRA, MARIANA C. ; ROSA,

- CARLOS A. ; ROSA, LUIZ H. . Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*, 22: 381-393, 2018.
- GOMES, E.M.C.; FIRMINO, A.V.; PENA, R.D.C.M.; ALMEIDA, S.S.M.D.S. Inhibitory effect in vitro of extracts *Cinnamomum zeylanicum* blume in control of *Cylindrocladium candelabrum*. *Ciência Florestal*, 28(4): 1559-1567, 2018.
- GONTIJO, E.D.; SANTOS, S.E. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Ministério da Saúde, Fiocruz, 2008.
- GUERRA, F.L. et al. Análise das condições favoráveis à formação de bolor em edificação histórica de Pelotas, RS, Brasil. *Ambiente Construído*, 12(4): 7-23, 2012.
- GUIMARÃES D.O. Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans*. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.
- GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52: 134-144, 2008.
- GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69: 509-526, 2006.
- GUNDEL, P.E.; MARTÍNEZ-GHERSAL, M.A.; BATISTA, W.B.; GHERSA, C.M. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed. *Annals of Applied Biology*, Wellesbourne, 156(2): 199-209, 2010.
- GUU, J.R.; JU, Y.M.; HSIEH, H. J. Nectriaceous fungi collected from forest in Taiwan. *Botanical Studies, China*, 48: 187-203, 2007.
- HALLMANN J.; QUADT-HALLMANN A.; MAHAFFEE W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914, 1997.

- HATFIELD, G.M.; ARTEAGA, L.; DWYER, J.D.; ARIAS, T.D.; GUPTA, M.P. An investigation of panamanian ipecac: botanical source and alkaloid analysis. *Journal of Natural Products*, 44(4): 452-456, 1981.
- HAWKSWORTH, D.L.; LÜECKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, Washington, 5(4): 1-17, 2017.
- HEFNAWY, A.; BERG, M.; DUJARDIN, J.C.; MUYLDER, G. Exploiting knowledge on *Leishmania* drug resistance to support the quest for new drugs. *Trends Parasitol* 33(3):162–174, 2017.
- HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1): 4-10, 2003.
- HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46: 205-229, 2003.
- HUSSAIN H.; KOCK I.; AL-HASSASI A.; AL-RAWAKI A.; ABBAS G.; GREEN I.R.; SHAH A.; BADSHAH A.; SALEEM M.; DRAEGER S.; SCHULZ B.; KROHN K. Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp.. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 699-702, 2014b.
- HYDE, K.D.; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39: 1-17, 2009.
- INÁCIO, M.L.; SILVA, G.H.; TALES, H.L.; TREVISAN, H.C.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.D.S.; ARAÚJO, Â.R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 11(34): 822-824, 2006.
- INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS. Parque Estadual do Rio Doce. Disponível em: < <http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view> >. Acesso em 30 de Agosto de 2019.
- ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of Natural Products*, 64(8): 1015-1018, 2001.
- ITOH, A.; IKUTA, Y.; BABA, Y.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*. *Phytochemistry*, 52: 1169-1176, 1999.

- ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N. Six tetrahydroisoquinolinemonoterpene glucosides from *Cephaelis ipecacuanha*. *Phytochemistry*, 30(9): 3117-3123, 1991.
- ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAGAKURA, N.; NAYESHIRO, H. tetrahydroisoquinoline-monoterpene glucosides from *Alangium lamarckii* and *Cephaelis ipecacuanha*. *Phytochemistry*, 36(2): 383-387, 1994.
- JALGAONWALA, R.B. et al. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2): 21-32, 2011.
- JAVOID, A.; ALI, S. Herbicidal activity of culture filtrates of *Trichoderma* spp. against two problematic weeds of wheat. *Natural product research*, 25(7): 730-740, 2011.
- JAYAWARDENA, R. S. et al. Mycosphere essay 16: *Colletotrichum*: biological control, biocatalyst, secondary metabolites and toxins. *Mycosphere*, 7(8): 1164-1176, 2016.
- JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H.; ZHENG, C.; RAHMAN, K.. HANT, T.; QUIN, L. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 7:1-14, 2016.
- JOHANN, S.; ROSA, L.H.; ROSA, C.A.; PEREZ, P.; CISALPINO, P.S.; ZANI, C.L.; COTA, B.B. Antifungal activity of altenusin isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp. against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 2012.
- KARAM, D. Situação atual da resistência de plantas daninhas a herbicidas nos sistemas agrícolas. *Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)*, 2018.
- KUBICEK, C. P.; ZELAZOWSKA, M. K.; DRUZHININA, I. S. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University Science*, 9: 753-763, 2008.
- KUMARESAN, V.; SURYANARYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycology Research*, 105(11): 1388-1391, 2001.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry & Biology*, 19, 2012.

- MALAFAIA, G. Análise de informações sobre a doença de Chagas disponíveis em websites brasileiros na rede mundial de computadores (internet). Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde 34(3), 2009.
- MALVICK, D. K.; GRUNDEN, E. Isolation of fungal DNA from plant tissues and removal of DNA amplification inhibitors. Molecular Ecology Notes, Estados Unidos, 5(4): 958–960, 2005.
- MARTINEZ V.; QUILEZ J.; SANCHEZ A.; ROURA X.; FRANCINO O.; ALTET L. *Canine leishmaniasis*: the key points for qPCR result interpretation. Parasit Vectors, 4:57, 2011.
- MELO, I. S. Trichoderma e Gliocladium como bioprotetores de plantas. Revisão anual de patologia de plantas, 4: 261-296, 1996.
- 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, 11(2): 195, 2017.
- MOREIRA, C.C. et al. Bioprospecção de estratos brutos obtidos de fungos endofíticos de manguezais com atividade leishmanicida. 2016.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. Phytopathology, 98: 380–386, 2008.
- MORSY, E.M.; ABDEL-KAWI, K.A; KHALIL, M.N.A. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents gainst *Fusarium solani* on tomato plants. Egyptian Journal of Phytopathology, 37(1): 47-57, 2009.
- MOURA, L. T. S.; MARUO, V. M. Aspectos farmacológicos e toxicológicos de *Psychotria colorata* – Revisão. Revista Científica de Medicina Veterinária, (23):1-16, 2014.
- NAGAKURA, N.; ITOH, A.; TANAHASHI, T. Four tetrahydroisoquinolinemonoterpene glucosides from *Cephaelis ipecacuanha*. Phytochemistry, 32(3): 761-765, 1993.
- NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans, 2014.
- NASHWA, M.A., SALLAM; K.A.M.; ABO-ELYOUSR AND HASSAN, M.A.E. Evaluation of *Trichoderma* species as biocontrol agents for damping-off and wilt

- diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. Egyptian Journal of Phytopathology, 36(1-2): 81-93, 2008.
- NETO P.A.S.P.; AZEVEDO J.L.; ARAÚJO W.L. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Ciência Desenvolvimento, 29: 62-76, 2002.
- OKI, Y.; FERNANDES, G.W.; CORREA J.A. Fungos: amigos ou inimigos. Ciencia Hoje, 42(252): 64-66, 2008.
- OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M.S.; JUNIOR, A.C.; FERNANDES, G.W. The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). Neotropical Biology and Conservation, 4(2): 83-88, 2009.
- OLIVEIRA, F.C. Estudo químico de fungos endofíticos associados a plantas do bioma caatinga. Dissertação (Doutorado em química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2017.
- OLIVEIRA, L.O.D.; VENTURINI, B.A.; ROSSI, A.A.B.; HASTENREITER, S.S. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). Genetics and molecular biology, 33(1):86-93, 2010.
- OLIVEIRA, R.C.; FRASSON, A.P.Z.; SANTOS, T.C.B.; SOARES, M.A.; SANTOS, M.V.; SANTOS, F.R. Extratos de fungos endofíticos isolados de *Paullinia cupana* demonstram promissora atividade tripanocida. In: 57º Congresso brasileiro de química, Gramado, 2017.
- OLIVEIRA, R.G. Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. Ciência & Saúde Coletiva, 23: 2291-2302, 2018.
- PAES, L. S.; LUCELENA, J. M. V. M.; BENTES, J. L. S.; MARQUES, J. D. O CASAS; L. L.; MENDONÇA, M. S. Endophytic mycobiota of three amazoni medicinal herbs: *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae), *Ayapana triplinerv* (Asteraceae) and *Costus spicatus* (Costaceae). International Journal of Botany, 10(1): 24–29, 2014.
- PEIXOTO, N.P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 29: 62-77, 2002.
- PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. van DEN (Eds.) Microbiology of the phyllosphere. Cambridge: Cambridge University Press, 175-187. 1986.
- PETSKO G.A. For medicinal purposes. Nature, 384:7-9, 1996.

- PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, D. Endophyte fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycology Research*, 105(12): 1508-1513, 2001.
- PIMENTEL, I.C.; KUCZKOWSKI, F.R.; CHIME, M.A.; AUER, C.G.; JUNIOR, A.G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta*, 36(1), 2006.
- RADIC, N.; STRUKELJC, B. Endophytic fungi - The treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 2012.
- RAMOS, H.Pereira. Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrimum state of Apiospora montagnei* Sacc. Diss. Universidade de São Paulo, 2013.
- RODRIGUEZ. R. J.; WHITE JR. J. F.; ARNOLD. A. E.; REDMAN R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182: 314–330, 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.; 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, 105(2): 233–238, 2010.
- ROMOFF, P. Análise de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos associados à *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae). 2018.
- ROSA, L. H.; TABANCA N FAU - TECHEN, N.; TECHEN N FAU - PAN, Z.; PAN Z FAU - WEDGE, D. E.; WEDGE DE FAU - MORAES, R. M.; MORAES, R. M. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smilax* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. 2012.
- RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, Bethesda, 1: 24-33, 2005.

- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 29: 319-343, 1998.
- 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. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Extremophiles*, Tokyo, 16(1): 95–103, 2012.
- SANTIAGO, V. S.; RICCARDO, D.D.; MARROT, A.; LIMA, C. G. F. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World journal biological chemistry*, 26; 8(1): 57-80, 2017.
- SANTOS, C.S. Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos *Microascus* sp. e *Nodulisporium* sp. associados à alga vermelha *Asparagopsis Taxiformis*. 2016.
- SANTOS, L.S.; OLIVEIRA, M.N.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, A.S.; FERREIRA, I.C.S.; LOPES-JÚNIO, M.L.; OLIVEIRA, M.C.F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guelpinii*. Embrapa Amazônia Oriental. 2008.
- SANTOS, L.S.; RHODEN, S.A.; DE BARROS, I.T.; TONINI, R.C.G.; MARQUES, R.M.; DE SOUZA, V.H.E.; PAMPHILE, J.A. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. *SaBios- Revista Saúde e Biologia*, 8(1):92-101, 2013.
- SANTOS, S.N.; FERRARIS, F.; KAVAMURA, V. Atividade antitumoral de biomoléculas obtidas de *Fusarium oxysporum*, um endofítico de *Combretum leprosum*, planta nativa do semiárido brasileiro. In: Embrapa Meio Ambiente- Resumo em anais de congresso. 2011.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109:661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, Reino Unido, 106(9): 996–1004, 2002.

- SCHULZ, B.; HAAS, S.; JUNKER, C.; ANDRÉE, N.; SCHOBERT, M. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, Bangalore, 109(1):39–45, 2015.
- SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolites production in filamentous ascomycetes. *Mycological research*, 112: 225-230, 2016.
- SIEBER, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal biology reviews*, 21: 75–89, 2007.
- SILVA-HUGHES, A. F.; WEDGE, D. E.; CANTRELL, C. L.; CARVALHO, C. R.; PANB, Z.; MORAES, R. M.; MADOXE, V. L.; ROSA, L. H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, 175: 67–77, 2015.
- SOUSA, K.A.F.D.; BASTOS, T.M.; PAREDES, B.D.; MOREIRA, D.R.D.M.; BERALDO, H.; OLIVEIRA, A.P.A. SOARES, M.B.P. Avaliação farmacológica antiparasitária in vitro e estudos do mecanismo de ação de complexos metálicos de antimônio e bismuto frente ao *Trypanosoma cruzi*. 2018.
- SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazônica*, 34(2):185-195, 2004.
- SOUZA, A.Q.L. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta amazônica*, 34(2): 185-195, 2004.
- SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. *Revista Cubana de Plantas Mediciniais*, 18(1):140-156, 2013.
- SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R.C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A.. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Journal of Health Sciences*, 16.4, 2015.
- STIERLE, A. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. *Science*, 260:214-216, 1993.
- STROBEL G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*. 9:240–244, 2006.

- STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5: 535-544, 2003.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 6: 491-502, 2003.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67:257-268, 2004.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE B.R.; MATHESON, B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology* 44: 162-167, 1998.
- USE, A.; KOTAMRAJU, S.; KARUNAKARAN, C. Cytotoxic and antibacterial activities of secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* VN2. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(1): 107–115, 2014.
- VAZQUEZ, B. P.; VAZQUEZ, T. P.; MIGUEL, C. B.. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. *Parasit Vectors*, 8: 206, 2015.
- VIEIRA, M. L. A.; JOHANN, S.; HUGHES, F. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Canadian Journal of Microbiology*, 60: 847-856, 2014.
- VIEIRA, M. L.A.; HUGHES, A. F.S.; GIL, V. B.; VAZ, A. B.M.; ALVES, T. M.A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA L. H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 58:54–66, 2012.
- VILLELA, M.M.; PIMENTA, D.N.; LAMOUNIER, P.A.; DIAS, J.C.P. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de Chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 25: 1701-1710, 2009.
- VIRGINIO, G.L. Influência do uso de Herbicidas sob as Características de Crescimento e Produção do Sorgo (*Sorghum Bicolor* L. Moench). 2014.

- WAGNER, B.L.; LEWIS, LESLIE C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3468-3473, 2000.
- WAQAS, M.; KHAN, A. L.; ALI, L.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; ANDLEE, I. J.; Seed germination-influencing bioactive secondary metabolites secreted by the endophyte *Cladosporium cladosporioides* LWL5. *Molecules*, 18:15519–15530, 2013.
- WEI G.; KLOPPER J.W, TUZUN S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, 86: 221-224, 1996.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: SELIGER, H. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Elsevier, San Diego, 1990, Capítulo, 38: 315–322
- WICKLOW, D.T., ROTH, S., DEYRUP, S.T., GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109: 610–618, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) World malaria report. Geneva, In: Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 196, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease American trypanosomiasis. 2014b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010. Geneva: World Health Organization, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Program for the surveillance and control of leishmaniasis. Geneva, World Health Organization, 2005.
- YAN, L.; Zhu, J.; Zhao, X.; Shi, J.; Jiang, C.; Shao, D. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(8), 3327-3340, 2019.
- YANG, X.; GUO, S.; ZHANG, L.; SHAO, H. Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. *Natural Product Research and Development.*; 15: 419-422, 2003.

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

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. Journal Natural Product, 63(11):1529- 1530, 2000.