



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

JANAINA DA COSTA NOGUEIRA NOBRE

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL
ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS
DE VARIEDADES DE *Capsicum chinense* JACQUIN.**

Manaus-AM
2021

JANAINA DA COSTA NOGUEIRA NOBRE

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL
ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS
DE VARIEDADES DE *Capsicum chinense* JACQUIN.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

ORIENTADOR: PROF DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

COORIENTADOR: PROF^a DR^a. CRISTINA SAYURI MAKI (*in memoriam*)

PROF^o DR. JOSÉ ODAIR PEREIRA

Manaus-AM
2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N778d Nobre, Janaina da Costa Nogueira
Diversidade e identificação do potencial antagonista de fungos
endofíticos cultiváveis de variedades de *Capsicum chinense* Jacquin./
Janaina da Costa Nogueira Nobre. 2021
69 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Lúcio de Azevedo
Coorientadora: Cristina Sayuri Maki
Coorientador: José Odair Pereira
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Microbiota. 2. Fungos endofíticos. 3. *Colletotrichum*. 4.
Antagonismo. 5. Compostos ativos. I. Azevedo, João Lúcio de. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

JANAINA DA COSTA NOGUEIRA NOBRE

**DIVERSIDADE E IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL
ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS
DE VARIEDADES DE *Capsicum chinense* JACQUIN.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. José Odair Pereira, membro (Presidente).
Universidade Federal do Amazonas**

**Prof. Dr. Pedro de Queiroz da Costa Neto, Membro.
Universidade Federal do Amazonas**

**Prof^a. Dr^a. Adriana Dantas Gonzaga de Freitas, Membro.
Universidade Federal do Amazonas**

**Prof^a. Dr^a. Kamila Tomoko Yuyama, Membro.
Universidade de São Paulo**

**Prof^a. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza, Membro.
Universidade Federal do Amazonas**

Á Deus, mãe, irmãos,
esposo e filha por
todo incentivo
para realização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por sua presença constante ao meu lado, por ser o meu refúgio, por sua incomparável bondade. E por sempre compreender meus anseios, me dando forças e coragem para atingir meus objetivos.

À minha mãe e irmãos por todo amor, vocês sempre estiveram presentes me incentivando e amparando em momentos difíceis. Pela dedicação depositada em mim para que eu pudesse caminhar em frente sem desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Lúcio Azevedo e co-orientador Prof. Dr. José Odair Pereira pela excelência profissional, pela contribuição, pelos ensinamentos, pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho, pelo apoio constante, estando sempre disponíveis para me auxiliar em momentos adversos.

À minha eterna orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Cristina Sayuri Maki (*in memoriam*), por todas as contribuições pertinentes, as conversas norteadoras, pelo incentivo constante, pela confiança, pelo carinho e por ter demonstrado a sua preocupação comigo e com o andamento do trabalho, sempre me orientando e auxiliando. Sua orientação foi e para sempre será muito importante para a construção da minha vida acadêmica.

Ao meu marido Marco Aurélio e a nossa pequena filha Ana Luísa, por todo apoio, paciência e amor comigo nos momentos de estresse e desespero, sem vocês tudo seria mais difícil.

À minha grande amiga Kamila Yuyama que mesmo longe, sempre esteve ao meu lado, é minha grande incentivadora! Obrigada por sempre ter uma palavra de carinho. Por sempre me ouvir e por sempre me dizer que eu conseguiria. Obrigada, de coração, por tudo! Sempre amarei você.

Ao meu amigo Kelven Wladie, pela ajuda incansável com os experimentos, pela paciência e disponibilidade sempre.

As amigas Karina, Lorena, Paulinha e Monique por estarem sempre me apoiando, incentivando e consolando nos momentos mais críticos dessa caminhada. Obrigada por tudo.

Aos amigos queridos do laboratório de Biossíntese e Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Ufam, Tallitinha, Verônica, Carol. Lívia, Rodrigo, Carlos, Ingrid.

Aos professores, Adriana Dantas, Pedro Queiroz e Gilvan Ferreira por contribuírem tanto com esta pesquisa, disponibilizando seus laboratórios, insumos, tudo que fosse necessário para a finalização dessa etapa.

As alunas Dalva, Bruna e Isabela pela ajuda incansável na reta final, vocês foram peças fundamentais em todo processo, minha gratidão eterna a vocês.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo apoio e suporte.

À FAPEAM, pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
3.1 As pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	16
3.2 Atividades biológicas das pimentas <i>Capsicum</i>	18
3.3 Microrganismos endofíticos.....	20
3.4 Produção de metabólitos secundarios por fungos endofíticos.....	21
3.5 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade inibitória a fitopatógenos.....	23
3.6 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade antibacteriana.....	24
4. CAPITULO 1: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE FUNGOS ENDOFITICOS DERIVADOS DOS FRUTOS DE <i>Capsicum chinense</i>	26
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1.1 Área de Coleta.....	26
4.1.2 Procedimentos de Isolamento, Purificação dos Fungos Endofíticos.....	26
4.1.3 Preservação dos Fungos	27
4.1.3.1 Frequência de Isolamento.....	28
4.1.3.2 Caracterização Morfológica dos Fungos Endofíticos.....	28
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.2.1 Taxa de colonização nos fragmentos vegetais.....	29
4.2.2 Caracterização morfológica e identificação dos isolados.....	31
5 Capítulo 2: IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Capsicum chinense</i>	36
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1.1 Avaliação do Potencial Antagonista dos Fungos Endofíticos.....	36
5.1.2 Obtenção dos Extratos Orgânicos.....	36

5.1.3 Microrganismos Testes.....	36
5.2 Ensaio Biológicos.....	37
5.2.1 Teste de Atividade Antimicrobiana.....	37
5.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	37
5.2.3 Ensaio de Cultura Pareada – <i>Colletotrichum</i> x Extrato Orgânico	38
5.2.4 Ensaio de Cultura Pareada – <i>Colletotrichum</i> x Fungos Endofíticos.....	38
5.2.5 Teste de Termoestabilidade de Compostos.....	40
5.3 Procedimentos para Identificação dos Isolados Promissores.....	40
5.3.1 Sequenciamento de Regiões ITS do rDNA.....	40
5.3.1.1 Crescimento micelial para extração de DNA.....	40
5.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	41
5.3.1.3 Análise das sequências.....	42
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.4.1 Atividade antimicrobiana dos metabólitos dos fungos endofíticos.....	42
5.4.2 Cultivo pareado dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos do gênero <i>Colletotrichum</i>	43
5.4.3 Metabólitos secundários com atividade antifúngica à fitopatógenos.....	47
5.4.4 Teste de termoestabilidade dos compostos fúngicos.....	49
5.4.5 Identificação molecular.....	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERENCIAS.....	59

RESUMO

Os microrganismos que habitam o interior das plantas, conhecidos como endófitos, têm sido explorados para diversas aplicações devido à sua produção de importantes compostos químicos como enzimas, alcalóides, antibióticos, anticancerígenos e outros metabólitos diferentes. *Capsicum chinense* é uma espécie de pimenteira encontrada em todas as regiões do Brasil e que apresenta uma expressiva variabilidade de frutos em diferentes formatos e cores, duas dessas variedades são bastante apreciadas para consumo na região Norte, território que se destaca também como centro de diversidade da espécie de pimentas *C. chinense*, as variedades típicas dessa região são as pimentas murupi e de cheiro, objetos de interesse deste estudo, pois são condimentos bastante utilizados na culinária local. O objetivo deste trabalho foi o isolamento, identificação e a avaliação do potencial antagonístico de fungos endofíticos obtidos de *Capsicum chinense*. Os frutos foram coletados em Presidente Figueiredo, município localizado na Região Metropolitana de Manaus. Os isolados foram obtidos pela técnica de fragmentação dos tecidos vegetais, que foram plaqueados em meio Batata Dextrose Agar (BDA), a 28 °C, e após obtenção de colônias purificadas os fungos foram avaliados quanto a sua ação antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* spp, causadores de antracnose em amostras do guaranazeiro. Para obtenção dos extratos os isolados foram cultivados em meio BDA, fragmentos miceliais foram triturados e transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de acetato de etila. Para avaliação da atividade antibacteriana foi realizado o ensaio de difusão em disco e as atividades antifúngicas analisadas em testes de confrontos diretos. Foram isolados 157 fungos endofíticos das duas variedades de pimentas, 15,6% dos fragmentos do endocarpo e 2% de sementes, devido número de fungos isolados, eles foram inicialmente agrupados em seis grupos com base em suas características morfológicas. Diferentes endófitos exibiram diferentes níveis de bioatividade contra os patógenos utilizados nesse estudo. No ensaio de atividade antibacteriana, quatro isolados, onde dois deles foram identificados como *Diaporthe* sp. e *Diaporthe phaseolorum*, mostraram-se ativos frente à *Staphylococcus aureus*. No confronto direto entre os fungos endofíticos e os patógenos, três endófitos pertencentes à espécie *Neoscytalidium dimidiatum* e uma linhagem de *Diaporthe phaseolorum* foram eficazes na supressão do fitopatógeno (GP131) da cultura do guaraná com taxa de antagonismo de 80%, sendo a mais alta taxa de antagonismo foi do endófito *Neoscytalidium dimidiatum* que inibiu os dois fitopatógenos (GP131 e ISO6/R4) analisados nesse estudo. Na avaliação dos extratos fúngicos contra os fitopatógenos foram observados isolados de *Diaporthe* sp. com compostos ativos que inibiram o desenvolvimento dos *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* e *Colletotrichum siamense*.

Palavras-chave: Microbiota, Fungos endofíticos, *Colletotrichum*, Antagonismo, Compostos ativos, Termoestabilidade.

ABSTRACT

The microorganisms that inhabit the interior of plants, known as endophytes, have been explored for several applications due to their production of important chemical compounds such as enzymes, alkaloids, antibiotics, anticancer and other different metabolites. *Capsicum chinense* is a species of pepper found in all regions of Brazil and which presents an expressive variability of fruits in different shapes and colors, two of these varieties are quite appreciated for consumption in the North region, a territory that also stands out as a center of diversity in pepper species *C. chinense*, the typical varieties of this region are murupi and scented peppers, objects of interest in this study, as they are condiments widely used in local cuisine. The objective of this work was the isolation, identification and evaluation of the antagonistic potential of endophytic fungi obtained from *Capsicum chinense*. The fruits were collected in Presidente Figueiredo, a municipality located in the Metropolitan Region of Manaus. The isolates were obtained by the technique of fragmentation of plant tissues, which were plated in Potato Dextrose Agar (PDA), at 28 °C, and after obtaining purified colonies the fungi were evaluated for their antibacterial action against *Staphylococcus aureus* strains, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* and against phytopathogens of the genus *Colletotrichum* spp, causing anthracnose in guaranazeiro samples. To obtain the extracts, the isolates were grown in PDA medium, mycelial fragments were crushed and transferred to Erlenmeyers of 500 mL containing 300 mL of ethyl acetate. The disk diffusion assay was performed to assess antibacterial activity and the antifungal activities were analyzed in direct confrontation tests. 157 endophytic fungi were isolated from the two varieties of peppers, 15.6% of the fragments of the endocarp and 2% of seeds, due to the number of isolated fungi, they were initially grouped into six groups based on their morphological characteristics. Different endophytes exhibited different levels of bioactivity against the pathogens used in this study. In the antibacterial activity test, four isolates, where two of them were identified as *Diaporthe* sp. and *Diaporthe phaseolorum*, showed to be active against *Staphylococcus aureus*. In the direct confrontation between endophytic fungi and pathogens, three endophytes belonging to the species *Neoscytalidium dimidiatum* and a strain of *Diaporthe phaseolorum* were effective in suppressing the phytopathogen (GP131) of the guaraná culture with an antagonism rate of 80%, being the highest rate of antagonism was the endophyte *Neoscytalidium dimidiatum* that inhibited the two phytopathogens (GP131 and ISO6 / R4) analyzed in this study. In the evaluation of fungal extracts against phytopathogens, isolates from *Diaporthe* sp. with active compounds that inhibited the development of *Colletotrichum* cf. *gloeosporioides* and *Colletotrichum siamense*.

Keywords: Microbiota, Endophytic fungi, *Colletotrichum*, Antagonism, Active compounds, Thermostability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Variedades da espécie <i>Capsicum chinense</i> . (A) pimenta de cheiro (B) pimenta de bode (C) murupi (D) cumari do Pará. Fonte: Embrapa, 2000.....	17
Figura 2 - Esquema com as etapas do isolamento dos microrganismos endofíticos...	27
Figura 3 - Fungos endofíticos isolados de frutos de <i>Capsicum chinense</i> . Na figura são mostrados alguns representantes dos isolados, agrupados de acordo com a cor das colônias e características morfológicas. Todos os fungos foram cultivados em meio de Batata Dextrose Agar (BDA) por 7 dias a 28 °C.....	32
Figura 4 – Morfologia da colônia e estrutura germinativa de <i>Penicillium</i> sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.....	33
Figura 5 – Morfologia da colônia e estrutura reprodutiva de <i>Trichoderma</i> sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.....	34
Figura 6 – Morfologia da colônia e estrutura reprodutiva de <i>Aspergillus</i> sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.....	34
Figura 7 – Morfologia da colônia e estrutura germinativa de <i>Scytalidium</i> sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.....	35
Figura 8 - Modelo esquemático de uma placa de Petri representando a técnica de pareamento direto in vitro para avaliação do potencial antagônico dos fungos endofíticos de <i>Capsicum chinense</i> . A) Inóculo de <i>Colletotrichum</i> spp. em uma placa controle; B) Inóculo de <i>Colletotrichum</i> spp. e a distância de crescimento radial (R2) medida em mm em direção ao fungo antagonista.....	38
Figura 9 – A - Triagem antimicrobiana dos extratos obtidos dos fungos endofíticos contra <i>S. aureus</i> . B - Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos orgânicos.....	43
Figura 10 - Cultivo pareado das linhagens de fungos endofíticos (na parte direita das placas) com o fitopatógeno do guaranazeiro – GP131 (na parte esquerda das placas).....	46
Figura 11 – A e B isolados 43 e 80 contra patógeno ISO6/R4 (lado direito da placa). C e D isolados 43 e 80 contra o patógeno GP131 (lado direito da placa).....	47
Figura 12 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos por ensaio de difusão em disco contra os fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum</i> spp. isolados do guaranazeiro.....	48
Figura 13 - Ensaio de difusão em disco dos extratos brutos frente os fungos fitopatogênicos Controle: fungo <i>Colletotrichum</i> sp. (GP131); <i>Colletotrichum</i> sp. (ISO6/R4).....	49
Figura 14 - Teste de compostos antifúngicos não voláteis dos endófitos isolados dos frutos de <i>Capsicum chinense</i>	51
Figura 15 - Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências dos isolados 37, 43 e 80 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI.....	55
Figura 16 - Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências dos isolados 6, 52 e 151 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI.....	56
Figura 17 - Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências dos patógenos GP131 e ISO6/R4 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total de fungos endofíticos isolados das variedades de <i>Capsicum chinense</i>	30
Tabela 2 - Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados do endocarpo e sementes de <i>Capsicum chinense</i> Jacquin. contra dois fitopatógenos de <i>Colletotrichum</i> sp., e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%).....	45
Tabela 3 - Similaridade máxima de identidade de nucleotídeos de oito isolados fúngicos com base em sequencias ITS e GAPDH usando análise BLASTn.....	54

1 INTRODUÇÃO

A versatilidade dos microrganismos permite que eles estejam presentes nos mais variados ambientes, incluindo aqueles considerados inóspitos e interagindo com diferentes formas de vida. Os microrganismos associados a plantas são estudados há tempos e em diferentes níveis, demonstrando que juntos, formam um micro ecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de microrganismos. Dentre esses, podemos destacar os endófitos, os quais colonizam os tecidos vegetais, sem causar prejuízos ou a manifestação de sintomas em seus hospedeiros (Azevedo et al., 2000). Acredita-se que cerca de 300.000 espécies de plantas do planeta sejam hospedeiras de uma ou mais espécies de endófitos (Bano et al 2016).

A análise da diversidade das comunidades fúngicas endofíticas é um desafio emergente, que leva à descoberta de novas espécies produzindo novos compostos e um melhor entendimento de seu papel nos ecossistemas (Uzma et al., 2016). Atualmente podem ser citadas as espécies vegetais que já possuem comunidades endofíticas isoladas e caracterizadas, tais como: *Hedychium coronarium* (Lutfia et al 2019), *Rhizophora mucronata* (Hamzah et al., 2018), *Moringa oleífera* (Arora et al., 2018), *Artemisia amygdalina* (Nisa et al., 2018), *Dysosma versipellis* (Tan et al., 2018), *Anthurium* sp (Santori, 2016), *Bauhinia forficata* (Bezerra et al., 2015). O estudo de bioprospecção de microrganismos endofíticos que produzam compostos de interesse abre perspectivas para várias frentes de investigação, incluindo a obtenção de compostos com finalidade tanto industrial como farmacológicas.

Do mesmo modo que os hospedeiros estudados até hoje, as pimentas do gênero *Capsicum* apresentam sua diversidade de microrganismos endofíticos associados, Ashokvardhan et al. (2016) isolaram de *C. annuum* cerca de 75 actinomicetos endofíticos e dentre os isolados, foi possível identificar três potentes cepas que inibiram o crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae* (Supriya et al., 2015) isolaram da espécie *Capsicum frutescens*, cinco fungos endofíticos que foram avaliados quanto a sua atividade antibiótica, observando suas respostas altamente específicas frente a bactérias Gram positiva e Gram negativa, um estudo realizado por Devari et al. (2013) demonstraram, através de ensaios biológicos, que um fungo endofítico *Alternaria alternata* isolado da pimenta *C. annuum* produz a substância capsaicina, responsável

pela ardência da pimenta e também pela inibição de microrganismos patogênicos, reforçando a possibilidade, de que os microrganismos endofíticos possam produzir o mesmo princípio ativo expresso pela planta hospedeira, como é o caso da substância taxol, uma importante substância utilizada no tratamento de câncer, que foi inicialmente isolada de plantas do gênero *Taxus* e posteriormente isolada de um fungo endofítico *Taxomyces andreanae*.

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos desempenham um papel importante como moléculas de defesa e são importantes não só do ponto de vista ecológico, como também, bioquímico e molecular (Fortkamp, 2018). São compostos produzidos por linhagens específicas, estando, assim, intimamente ligados com a ecologia dos organismos produtores, revelando assim a necessidade de conhecermos a diversidade de microrganismos nos mais diversos hospedeiros.

Um estudo realizado por Dreyfuss et al. no ano de 1994, revelou a existência de fungos endofíticos, estes foram ensaiados pelo seu potencial biológico, ao analisar 135 metabólitos secundários, observou-se que metade dos compostos bioativos obtidos eram novos produtos naturais, concluindo que os fungos endofíticos são uma boa fonte de novos compostos e que a triagem não é uma etapa aleatória.

Os relatos na literatura científica que tratam das atividades biológicas dos endófitos isolados das pimentas avaliadas nesse estudo são ainda escassos, sendo observado que grande parte dos estudos envolvendo pimentas *Capsicum* normalmente avalia a atividade biológica dos extratos orgânicos dos frutos das pimentas. Diante dos relatos apresentados e considerando o histórico de *Capsicum* associado a atividades antimicrobianas, a proposta do presente trabalho foi estudar a microbiota endofítica associada à duas variedades de pimentas do gênero *Capsicum*, pimenta murupi e pimenta de cheiro, no que se refere ao seu potencial na produção de compostos bioativos e à sua diversidade biológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos principais

- Investigação das atividades biológicas de linhagens fúngicas endofíticas de *Capsicum chinense*.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar as variedades e coletar os frutos das plantas de *Capsicum chinense*;
- Isolar microrganismos endofíticos dos órgãos, como sementes e endocarpo das plantas de *Capsicum chinense*;
- Extrair metabólitos secundários dos isolados fúngicos;
- Verificar a presença de compostos com atividades biológicas (antibacteriana, antifitopatogena) nos extratos dos endofíticos isolados;
- Identificar taxonomicamente, por meio de técnicas moleculares, os fungos endofíticos produtores dos compostos de interesse.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 As pimentas do gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum*, é nativo das zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul, pertencem à família Solanaceae e inclui pimentas de importante valor econômico como: *Capsicum annum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pendulum* e *Capsicum pubescens* que são as espécies comumente conhecidas (Aguiar et al., 2016). As pimenteiras são plantas herbáceas com altura que varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo. Acredita-se que o cultivo de pimentas ocorra desde o início do povoamento humano nas Américas, supostamente há cerca de 12 mil anos (Barbosa et al., 2012).

Os frutos das pimentas *Capsicum* diferem quanto às formas, tamanhos, cores e pungência, dependendo do genótipo ou o período sazonal de reprodução (Nazzaro et al., 2009). Os frutos frescos são conhecidos por serem boas fontes de diferentes fitoquímicos como vitamina C e E como bem como de vitamina A, carotenóides e polifenóis. Além disso, as pimentas do gênero *Capsicum* são as únicas capazes de produzir alcalóides específicos conhecidos como capsaicinóides, responsáveis por sua pungência. Os capsaicinóides têm fortes efeitos farmacológicos, que são utilizados para o alívio de dores musculares, prevenção do câncer, redução de peso, além de fornecer benefícios gastrointestinais e cardiovasculares, por isso sendo considerados alimentos multifuncionais (Aguiar et al., 2016).

A cultura das pimentas é um mercado que movimenta milhões de dólares por ano, sendo considerada uma das mais importantes em todo o mundo, sobretudo nos países tropicais, embora a colheita ainda seja realizada de forma rústica, onde o cultivo

delas se ajusta perfeitamente aos modelos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria, visto que também permite a fixação de pequenos produtores rurais e suas famílias no campo, a contratação sazonal de mão-de-obra durante o período de colheita, o estabelecimento de indústrias processadoras e a geração de novos empregos (Ribeiro et al., 2008).

O Brasil está entre um dos maiores produtores mundiais de pimenta (Henz, 2011) além de consistir no centro de diversidade de pimentas *Capsicum* (Santos et al., 2016), as quais são cultivadas em praticamente todos os estados brasileiros, sendo principalmente de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul que se destacam também como maiores consumidoras de pimentas juntamente com o Norte e Nordeste, em função de ser um condimento fundamental para a culinária local (Ribeiro e Cruz, 2002). Não se tem uma estimativa exata da produção de pimentas no Brasil, por serem em grande parte cultivadas por pequenos agricultores de diversas regiões, mas acredita-se que a produção mundial de frutos atingiu até 34,5 milhões de toneladas colhidas nas safras entre 2006 e 2016, levando a um aumento de 25% na produção de pimenta (FAOSTAT, 2016).

Das espécies de pimentas classificadas, domesticadas e comercializadas a *C. chinense*, é considerada a mais brasileira de todas as espécies do gênero, pois foi domesticada pelos índios amazônicos, e embora possa ser encontrada nas Américas, é na é na Bacia Amazônica, que se encontra a área de maior diversidade dessa espécie (Reifschneider, 2000).

C. chinense destaca-se pela ampla adaptação às condições tropicais, como o clima quente e úmido, e ainda apresenta os melhores níveis de tolerância às principais doenças tropicais (Carvalho et al., 2006). Apresenta grande variabilidade, sendo a espécie cujos frutos exibem os mais variados tipos de forma, coloração, aroma e graus de pungência. No Brasil é representada pelas pimentas de cheiro, de bode, cumari-do-Pará e murupi (Figura 1).

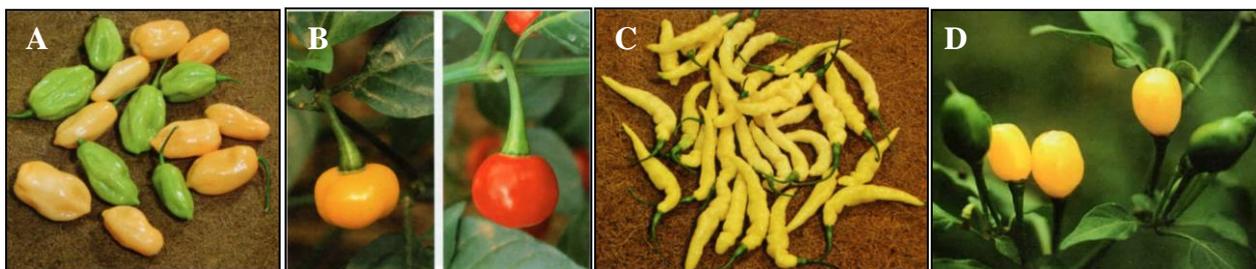


Figura 1- Variedades da espécie *Capsicum chinense*. (A) pimenta de cheiro (B) pimenta de bode (C) murupi (D) cumari do Pará. Fonte: Embrapa, 2000

A pimenta de cheiro é considerada de pungência baixa, pouco picante. É usada em saladas, condimentos para carnes, principalmente peixes. São cultivadas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste (Carvalho et al., 2006).

A pimenta de bode tem aroma marcante e pungência alta, sendo a pimenta mais popular da região Centro-oeste. É utilizada para o preparo de molhos, sendo que os frutos maduros são comercializados em conserva (Carvalho et al., 2006).

A cumari do Pará é de pungência e aroma fortes, frequentemente confundida com a pimenta cumari-verdadeira (*C. baccatum* var. *baccatum*). É utilizada principalmente em conservas (Carvalho et al., 2006).

A variedade murupi tem aroma forte e pungência média a alta. É muito utilizada no Norte do país, na forma de molho misturada ao caldo do tucupi e em conservas com vinagre, óleo ou soro de leite. Seus frutos são alongados e verdes quando imaturos, passando a amarelo-pálido, amarelo-vivo ou vermelho quando maduros, com superfície extremamente enrugada. Popularmente são conhecidas três variedades, que apresentam diferenças de formato, tamanho, cor e pungência: murupzinho, com 2 a 4 cm de comprimento e pelo aroma e pungência mais acentuado que as demais; murupi-comum, de tamanho intermediário, variando de 3,5 a 6 cm; e murupi-grande, que pode atingir 9 cm de comprimento (Carvalho et al., 2006).

3. 2 Atividade Biológica das Pimentas *Capsicum* sp.

Nas últimas duas décadas, tem havido um interesse crescente em descobrir propriedades químicas e funcionais de compostos bioativos provenientes de matrizes naturais, esse fato junto com a crescente consciência dos benefícios de alimentos saudáveis, promoveram o estudo de frutos de pimentas e seus subprodutos como fonte de compostos bioativos (Baenas et al., 2019).

As pimentas *Capsicum* estão entre as mais populares do mundo porque elas têm sido consumidas como alimento e usadas como ingredientes há anos, devido ao seus atributos sensoriais como cor, sabor e pungência e por prolongar a deterioração dos alimentos, conservando-os da contaminação por fungos e bactérias (Riquelme et al., 2016). As pimentas têm um papel significativo na medicina tradicional de países como

a Índia, México, China e entre os povos americanos nativos, as espécies de *Capsicum* são usadas para o tratamento de artrite, reumatismo, dores de estômago, erupções cutâneas e até em mordidas de animais (Farhat et al., 2019).

Vários trabalhos associam as aplicações terapêuticas das pimentas às concentrações de capsaicina, componente ativo de pimentas ardidas (Clark et al., 2015; Marine et al., 2015; Carvalho et al., 2015; Ciulu et al., 2015; Gannon et al., 2016). Takikawa et al. (2002) afirmaram que a capsaicina é produzida como metabólito secundário pelas pimentas do gênero *Capsicum* e que provavelmente atua como barreira contra herbívoros. Dessa forma, a classificação das pimentas pela ardência é baseada também nos teores de capsaicina apresentados pelas espécies e suas variedades, estudos realizados por Cruz (2003) relacionou a pungência à concentração de capsaicina e à atividade antibacteriana dos extratos destas plantas.

Diversos estudos sobre a atividade antimicrobiana dos extratos das pimentas *Capsicum* demonstram que esses podem atuar na inibição de microrganismos. Sen et al (2016) utilizaram os extratos aquoso e metanólico de três variedades de frutos do pimentão que apresentaram ampla atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, a partir desse resultado, concluíram que os frutos do *Capsicum* poderiam servir como bactericida natural.

Os extratos de *C. annuum* foram investigados por Ciulu et al (2015) analisando suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Os resultados revelaram que extratos alcoólicos de *C. annuum* exibem propriedades antioxidantes significativas, sendo a maior atividade antioxidante obtido para o extrato de pimenta verde obtendo valores superiores ao Trolox, um análogo de vitamina E amplamente comercializado, nesse estudo a atividade antibacteriana dos extratos também foi avaliada, onde demonstraram atividade significativamente maior em comparação com o padrão de capsaicina usado como controle positivo para as bactérias *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

Akbas et al (2018) em seus estudos com nanoemulsões contendo oleorresina de pimentas *Capsicum* demonstraram uma bioatividade melhorada como antioxidante e antimicrobiano para *Staphylococcus aureus*. O trabalho buscava determinar as condições de formulações apropriadas para OC (Oleorresina de *Capsicum*) para atuar como surfactantes de qualidade alimentar a serem usados em produtos farmacêuticos e indústria de alimentos.

Bacon et al. (2017) fracionaram o extrato da pimenta jalapeño (*Capsicum annuum* var. *annuum*). e testaram para atividade antibacteriana usando o método de difusão em disco, após o fracionamento inicial, duas frações (E e F) exibiram atividade antibacteriana contra todos os três patógenos.

Raybaudi-Massilia et al (2017) analisaram os extratos alcoólicos e aquosos de pimentão vermelho (*Capsicum annuum* L.) obtidos por diferentes metodologias para avaliar suas propriedades citotóxicas, antioxidantes e antimicrobianas. Dentre as atividades analisadas a que apresentou maior atividade foi a citotóxica, pois teve um efeito significativo em células do colo do útero e um impacto moderado sobre broblastos. No teste antimicrobiano foi observada uma leve atividade apenas para extratos alcoólicos. Os resultados mostraram o potencial do pimentão vermelho (*C. annuum* L.) como fonte de compostos antioxidantes e citotóxicos.

3.3 Microrganismos Endofíticos

Os endófitos são microrganismos que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos ao seu hospedeiro (Araújo et al., 2010). Estudos sobre a relação ecológica entre endófitos e espécies vegetais, sugere que esses microrganismos co-evoluíram com seus hospedeiros, interagindo de forma que possam trocar benefícios entre si (Kharwar et al., 2012), pois o hospedeiro acaba fornecendo nutrientes e proteção, e em contrapartida os endófitos tornam a planta mais resistente a condições adversas, pois são bons produtores de substâncias ativas que podem atuar no controle biológico contra microrganismos patogênicos, podem evitar que a planta sofra com ataque de insetos, favorecem um melhor desenvolvimento da planta entre outros benefícios (Venieraki et al. 2017).

Todas as espécies vegetais estudadas até hoje possuem endófitos (Strobel e Daisy, 2004), há espécies de plantas que chegam a hospedar mais de 100 endófitos, alguns generalistas, não se restringem a um único hospedeiro, enquanto outros apresentam especificidade por um determinado hospedeiro (Santos, 2012). As comunidades endofíticas podem alterar de acordo com a espécie, idade, distribuição geográfica, clima, fisiologia, ecologia e bioquímica das plantas.

Os organismos endofíticos podem ser isolados de diferentes tecidos e órgãos vegetais, o isolamento pode ser realizado a partir das folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais como pólen, ovário, anteras e estames (Araújo et al., 2002).

Os simbiontes vegetais mais comuns são as bactérias e fungos (Freire et al., 2015) entre esses grupos, os fungos, são vistos como uma excelente fonte de produtos com bioativos naturais, eles produzem metabólitos secundários que são amplamente estudados por apresentarem ações antimicrobianas, anticâncer, atividades neuroprotetoras, antioxidantes ou antiparasitárias. Os gêneros frequentemente isolados de fungos incluem: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis* (Farhat et al., 2019; Notarte et al., 2019; Pinheiro et al., 2017). Os fungos podem se instalar nos tecidos vegetais de modos diferentes, podem penetrar através dos estômatos, pelas raízes, sementes ou ainda por ferimentos ocasionados em alguma parte da planta.

Os fungos endofíticos podem sintetizar inúmeros compostos produzidos por vegetais, e esse fato impulsiona o estudo de plantas com propriedades medicinais que hospedam endófitos avaliando um possível sinergismo entre os compostos produzidos do resultado dessa relação (Nisa et al., 2015).

3. 4 Produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos

O metabolismo secundário de microrganismos pode ser visto como a produção de compostos não essenciais ao organismo que os produzem porém esses metabólitos passaram a ser explorados pela sua importância nas áreas da saúde e da indústria, visto que eles têm características de interesse (Xia et al., 2019). A maior fonte de metabólitos secundários bioativos são os fungos, que se destacam ecologicamente pelas suas interações químicas. Entre eles os mais estudados quimicamente são: *Penicillium expansum* (patulina, citrinina, chaetoglobosinas, roquefortine, expansolides, communesinas, geosmina, fumaril-D, L-alanina), *Fusarium poae* (trichothecenes, culmorinas, aurofusarina, fusarinas, beauvericina e enniatinas) e *Alternaria gaisen* (ácido tenuazônico, tentoxina, altertoxina A, alternarióis, toxina AK e altersetina) (Frisvad et al., 2008).

Uma grande quantidade de fungos endofíticos já foram investigados química e biologicamente e ainda assim eles demonstram potencial para descoberta de novas moléculas bioativas (Guo et al., 2020), tal fato está relacionado a capacidade dos endófitos de desenvolver mecanismos biológicos de proteção, tornando-os aptos a ocuparem os mais variados nichos.

Os metabólitos bioativos produzidos fungos endofíticos são usados diretamente como medicamentos ou funcionam como moléculas precursoras de outros produtos químicos. Os endófitos são vistos como um depósito de metabólitos bioativos, como alcalóides, fenóis, lactonas, isocumarinas, quinonas, citocalasinas, esteróides, saponinas, taninos e terpenóides, o que os torna candidatos promissores para o tratamento de várias enfermidades como o câncer, malária, tuberculose, doenças virais, diabetes, doenças inflamatórias, artrite e doenças imunossupressoras (Specian et al., 2014; Fadiji et al., 2020).

Alguns eventos importantes no estudo de metabólitos ativos produzidos por fungos demonstram a diversidade de compostos para fins medicinais. No estudo de Devari et al (2013) foi isolado o fungo *Alternaria alternata*, endófito da espécie *C. annuum*, e foi observado que esse fungo produzia uma substância antes presente somente em frutos de pimentas *Capsicum*, a capsaicina, substância responsável pela pungência e que apresenta várias ações biológicas de interesse.

Lai et al. (2020) isolaram cinco novos derivados do composto clamidosporol, que foram chamados de pleospyrones A-E (1–5) do fungo endofítico *Pleosporales* sp. presente na planta medicinal *Siraitia grosvenorii*. Guo et al. (2020) isolaram do fungo endofítico *Monosporascus eutypoides* dois novos compostos, monosporasols A e B, e dois compostos conhecidos a pestaloficina C e artrinona.

Mao et al. (2019) obteve dois novos metabólitos híbridos de decalina / ácido tetrâmico, hialodendrininas A e B que foram isolados de um fungo endofítico da planta *Hyalodendriella* sp. *ponipodef*. O estudo realizado por Ola et al., (2019) observou a produção de ácido kójico, substância utilizada em produtos para clareamento de pele, a partir do fungo endofítico *Aspergillus flavus*, isolado do caule de *Catharanthus roseus*, foi obtido cerca de 11 g do ácido kójico puro. Dwibedi et al., (2019) avaliou em endófitos cultiváveis recuperados de vinhedos a produção de resveratrol e através de uma análise em LC-MS confirmou a semelhança do resveratrol fúngico com o resveratrol padrão em um isolado de *Pinot noir*.

Baseado nas inúmeras aplicações de endófitos em diferentes áreas é de grande importância o desenvolvimento de novas estratégias para aperfeiçoar essa busca, tornando mais bem-sucedida a descoberta de microrganismos promissores com características únicas que estejam relacionados a finalidades específicas e aplicações de interesse.

3.5 Metabolitos secundarios producidos por fungos endofíticos com atividade inibitória a fitopatógenos

O uso de agroquímicos tem causado danos cada vez mais intensos ao meio ambiente, à saúde humana e a de outros organismos, e como consequência há a incidência crescente de fitopatógenos com resistência aos agroquímicos disponíveis no mercado (Zabka et al., 2013). A preocupação global sobre o uso de agroquímicos e o reconhecimento do potencial dos compostos biológicos tem estimulado a pesquisa em busca de alternativas menos nocivas e preferencialmente naturais.

Existem vários estudos que utilizam compostos bioativos de fungos endofíticos contra o crescimento de fitopatógenos “in vitro” como o trabalho de Huang et al., (2018) isolou um novo composto uma benzopiranona que é produzido por um *Alternaria* sp., o composto apresenta atividade contra o fungo fitopatogênico *Alternaria brassicicola*. Outros exemplos são os compostos isolados de amostras de fungos marinhos, foi observado a produção de derivados de antraquinona o (11S) -1,3,6-trihidroxi-7-(1-hidroxietil) antraceno-9,10-diona (1) e 7-acetil-1,3,6-trihidroxiantraceno-9,10-diona (2), isolados a partir das culturas de P18 e duas perilenquinonas, stemfiperilenol (3), e alterperilenol (4), produzidos pelo fungo P8, com atividade contra *Pestalotzia theae* e *Alternaria brassicicola* (Zhao et al., 2018). Compostos da classe dos fenóis também têm sido isolados de fungos endofíticos. Um exemplo é o composto oosporeina, produzido por *Chaetomium cupreum*, que apresenta atividade contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Phytium ultimum* e *B. cinérea* (Mao et al., 2010). Um composto derivado da tetralona, que foi isolado do fungo endofítico *Phoma* sp. apresentou atividade antifúngica aos dois importantes fitopatógenos da agricultura *Fusarium oxysporum* e *R. solani* (Wang et al., 2012).

Na área agrônômica, diversos metabólitos secundários isolados de linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos isolados frequentemente como endófitos, também apresentam compostos contra fitopatógenos como avaliado no estudo de Sartori (2016) que isolou o composto citrinina do fungo endofítico *Penicillium citrinum*. Outro exemplo é o antifúngico 7-hidroximeleina, que inibiu o crescimento dos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, a 5 e 10 µg, respectivamente, através do ensaio de bioautografia (Oliveira et al., 2011).

O composto fumitremorgina B, isolado de *Aspergillus*, se mostrou ativo a *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium*

oxysporum, *Gibberella saubinettii* e *Colletotrichum gloeosporioides* usando o método de diluição seriada (Li et al., 2012).

No cenário atual, a procura por produtos orgânicos, indicando a preferência em reduzir do uso de produtos químicos, fica evidente a necessidade de buscar estratégias sustentáveis para a proteção das culturas e nesse contexto a diversidade de compostos produzidos por fungos capazes de suprimir o livre desenvolvimento de fitopatógenos indica sua importância nos estudos de bioprospecção, especialmente na área agrônômica.

Nesse âmbito, os endófitos são importantes candidatos ao controle de fitopatógenos, principalmente pelo fato de colonizarem muitas vezes o mesmo nicho ecológico (Araújo et al., 2010), isto porque eles podem empregar diferentes estratégias diretas ou indiretas contra os patógenos como produção de antibióticos, secreção de enzimas líticas, produção de fitohormônios, produção de sideróforo, competição por nutrientes, parasitar o patógeno ou induzir a planta a desenvolver resistência. Porém, pouco se sabe sobre a regulação da interação plantas-fungos endofíticos e como os fungos protegem as plantas contra os fitopatógenos (Fadiji et al., 2020).

3.6 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade antibacteriana

Antimicrobianos constituem um exemplo clássico e altamente desejável de compostos alvo para a bioprospecção. Sabe-se que os microrganismos apresentam potencial para a produção desses compostos ativos e atualmente, a busca por endófitos que produzam tais substâncias tem se intensificado. A atividade antimicrobiana de fungos endofíticos é resultante da produção de uma grande variedade de compostos de estrutura química bastante diversificada. Conforme reportado por Gunatilaka (2006), esses microrganismos apresentam uma reserva considerável de estruturas químicas únicas e de interesse para o desenvolvimento de processos biotecnológicos.

Segundo Abdulhadi et al. (2020), o extrato bruto de *Trichoderma harzia* endófito isolado de *Rosmarinus officinalis* mostrou atividade antimicrobiana significativa contra cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K.pneumoniae*, *B. subtilis* e *E. coli*. Raízes, cascas, frutos e folhas saudáveis de *Sonneratia apetala*, foram utilizados para o isolamento de 56 fungos endofíticos, cuja fração metanólica dos fungos identificados como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger* e *Fusarium*

equiseti foram mais ativos e seus extratos inibiram, ao menos, um dos patógenos testados (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Micrococcus luteus*) (Nurunnabi et al., 2020).

Memecylon umbellatum é uma planta medicinal da Índia conhecida pelas suas propriedades fungicidas, bactericidas, antioxidantes e hipoglicêmicas, dela foram isolados sessenta e três espécies de fungos pertencentes a 22 gêneros, onde dois de seus isolados fúngicos endofíticos *Cochlibolus affinis* e *P. guepinii* expressaram alta atividade antibacteriana contra cepas bacterianas, segundo Suryavamshi et al. (2020).

Fungos endofíticos foram isolados de *Casearia growiifolia* e avaliados quanto a atividade antimicrobiana. Foram observados sete táxons fúngicos diferentes, incluindo *Aspergillus candidus*, *Neosartorya fischeri*, *N. tatenoi*, *Paecilomyces herbarum*, *Phomopsis* sp., *Xylaria berteri* e *X. feejeensis* foram os endófitos dominantes recuperados no estudo. *Neosartorya* spp. mostrou atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos, produzindo um metabólito extracelular eficaz, que teve atividade de amplo espectro contra 10 diferentes espécies de patógenos testados, o composto claramente afetou a morfologia celular das bactérias quando observada por microscopia eletrônica de varredura (Yodsing et al., 2018).

Plantas e solos de manguezais também tiveram suas comunidades de fungos endofíticos isolados e caracterizados e sua produção antimicrobiana avaliada, doze fungos endofíticos foram isolados e identificados como pertencentes aos gêneros *Penicillium* sp, *Curvularia* sp, *Diaporthe* sp, *Aspergillus* sp, *Guignardia* sp, *Neosartorya* sp e *Eupenicillium* sp, a atividade antimicrobiana desses doze endófitos fúngicos foram testadas contra bactérias Gram negativas, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e Gram positivas, *Escherichia coli* e fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Dois isolados (*Guignardia* sp. e *Neosartorya* sp.) apresentaram forte atividade antimicrobiana. Os compostos foram isolados de ambos os isolados e analisados usando HPLC, os isolados exibiram cromatogramas com alta diversidade de estruturas químicas básicas e picos em uma ampla gama de polaridades, com estruturas semelhantes à catequina Trimérica e Helenalina (Ling et al., 2016).

4 CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE FUNGOS ENDOFITICOS ASSOCIADOS A FRUTOS DE *Capsicum chinense*

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Área de Coleta

Foram coletadas aleatoriamente 30 amostras de frutos saudáveis e maduros de pimenta murupi e 30 amostras de frutos saudáveis e maduros de pimenta de cheiro no sitio RP localizado no ramal do canastra no município de Presidente Figueiredo. O ponto foi escolhido por se tratar de uma área de cultivo para consumo doméstico e comercial, em área aberta e as coletas realizadas em novembro de 2019, um período caracterizado por alta pluviosidade na região.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em caixa térmica durante o transporte ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

4.1.2 Procedimentos de Isolamento e Purificação e dos Fungos Endofíticos

Os frutos foram lavados em água corrente e em seguida, com água destilada para a retirada de resíduos. Posteriormente, cada fruto foi submetido ao processo de desinfecção para eliminação dos microrganismos epifíticos, segundo Araújo *et al.* (2010), onde as amostras vegetais foram submetidas a submersão em álcool etílico 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2,6% por dois minutos, novamente em álcool etílico 70% por 30 segundos e duas vezes consecutivas em água destilada autoclavada por 30 segundos, sendo a última água de lavagem utilizada para controle (negativo) do processo de desinfecção através da semeadura em placa de Petri contendo meio de cultura sem adição de antibiótico.

Após as lavagens em série, as pimentas foram depositadas sobre placa de Petri autoclavada e com auxílio de bisturi, foi fragmentado o endocarpo em quadrados de aproximadamente 2 mm², os quais foram depositados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar caseiro (BDA) (pH 6,8) acrescido de tetraciclina (50 µg/mL). As sementes foram inoculadas inteiras nas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Foram colocados cinco fragmentos por placa, em três repetições.

As placas foram incubadas em estufa tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*) em temperaturas de 18 °C e acompanhadas diariamente, por um prazo máximo de quinze dias. As colônias recém desenvolvidas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio BDA pH 6,8, os quais foram cultivados em temperatura ambiente.

A purificação foi realizada por meio da obtenção de suspensão de conídios em solução *tween* 80 a 0,1% (v/v). Alíquotas da suspensão foram submetidas à estimativa do número de conídios em Câmara de Neubauer, seguindo-se à diluição seriada e plaqueamento em meio BDA pH 6,8 da diluição correspondente a 10^2 UFC/mL.

As colônias monospóricas foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA pH 6,8. As placas foram incubadas a 28 °C e uma vez que a colônia atingiu a borda da placa, foram obtidas imagens das culturas para início da análise do aspecto macromorfológico dos isolados (Figura 2).

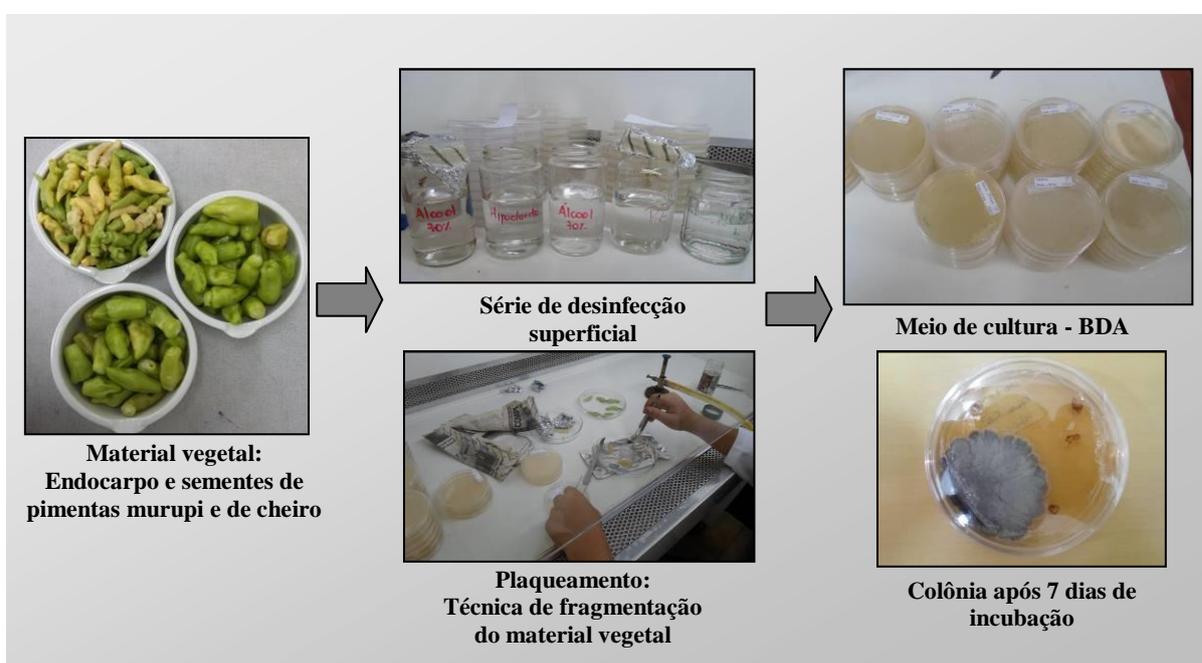


Figura 2 - Esquema com as etapas do isolamento dos microrganismos endofíticos

4.1.3 Preservação dos fungos

Para preservação dos isolados, discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro de todos os isolados foram submersos em 5 mL de água destilada em frascos do tipo penicilina lacrados, mantidos à temperatura ambiente e em triplicata conforme método descrito por Castellani (1939).

Os isolados estoques também foram mantidos em tubo inclinado contendo meio de cultura BDA e mantidos em refrigeração a 8° C. Para a reativação, fragmentos dos estoques eram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos em B.O.D. a 28 °C.

4.1.3.1 Frequência de Isolamento

A frequência de isolamento dos fungos endofíticos (em porcentagem) foi calculada pela fórmula:

$$\text{Taxa de Colonização (\%)} = \frac{\text{Número de Fragmentos com crescimento fúngico} \times 100}{\text{Número total de fragmentos observados}}$$

A frequência de colonização nos fragmentos vegetais das pimentas *C. chinense* pelos fungos foi definida como: o número total de fragmentos que apresentarem colonização por fungo endofítico em relação ao número total de fragmentos analisados.

Foi realizada análise total da taxa de colonização e parcial e comparando-se o local de colonização nos frutos (endocarpo e sementes).

4.1.3.2 Caracterização Morfológica dos Fungos Endofíticos

A identificação morfológica em nível de gênero foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Pedro Queiroz Costa Neto da Faculdade de Ciências Agrárias (Universidade Federal do Amazonas), no Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana - LPBOM. A identificação dos endófitos teve início com uma triagem morfológica, observação das características macroscópicas. Para isto, as linhagens foram crescidas durante sete dias em BDA caseiro (200 g de Batata inglesa, 20 g de Glicose Anidra, 15 g de Agar, 1000 mL de água destilada) em B.O.D. a 25° C, e, após o tempo de incubação, as características macroscópicas foram observadas em microscópio lupa estereoscópicas, onde foram observadas características como coloração, textura e borda da colônia, produção de pigmento ou exsudatos, velocidade de crescimento e aspecto do micélio.

Para visualização das estruturas microscópicas, foi realizada a técnica de microcultivo, que consistiu na transferência de dois a quatro pequenos fragmentos do micélio fúngico, para uma placa de Petri contendo blocos de gelose dos meios BDA a

10% e pH 6,8 e extrato de malte, conforme descrito por Shirling e Gottlieb (1966). Sobre esses pequenos inóculos, foram depositadas lamínulas para microscopia, autoclavadas, medindo 22x22 mm². Foi empregada leve pressão sobre a lamínula, de forma que a mesma permaneça aderida à superfície do meio de cultura.

As placas de Petri foram transferidas para incubadora BOD, sendo acompanhadas, dia a dia, até que o micélio do fungo em desenvolvimento atingisse a borda da lamínula e iniciasse o crescimento sobre a mesma. Nesse momento, a lamínula foi cuidadosamente retirada com auxílio de pinça e depositada sobre lâmina de microscopia com lactofenol azul algodão.

As características microscópicas foram analisadas e fotodocumentadas em microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagens, em aumentos iguais a 400X (Leica DM750), priorizando a observação de microestruturas como conídios, conidióforos, grampos de conexão, apressórios, septos, morfologia e coloração das hifas, entre outros, as quais foram comparadas com chaves taxonômicas específicas para cada gênero.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Taxa de colonização nos fragmentos vegetais

Foi obtido um total de 157 isolados fúngicos (Tabela 1) a partir de 450 fragmentos de endocarpo e 450 sementes de cada variedade de *C. chinense*, totalizando 1800 fragmentos. A taxa colonização geral do isolamento foi de 15,7%, comparado com outros estudos observados na literatura a taxa de colonização (TC%) dos endófitos foi menor do que as relatadas para outras espécies vegetais, ainda que a coleta tenha sido realizada em um período de alta pluviosidade na região, condição que segundo Halász et al (2016) estimula a infecção fúngica em tecidos vegetais. Vale destacar que as linhagens isoladas neste trabalho não representam a diversidade total de fungos endofíticos das variedades de pimenta murupi e de cheiro principalmente devido à seleção de linhagens fúngicas capazes de crescer no meio de cultivo utilizado.

A baixa quantidade de endófitos recuperados no isolamento pode ter sido influenciada segundo Hernawati et al. (2011) pela aplicação frequente de fungicidas nessas culturas, visto que se trata de um plantio para fins comerciais, o estudo de Gaitan

et al. (2005) observou que a aplicação de fungicidas reduziu a diversidade de fungos endofíticos foliares de uma árvore de região tropical a *Guarea guidonia* L.

Tabela 1 - Número total de fungos endofíticos isolados das variedades de *Capsicum chinense*

Variedade	N° fragmentos	Quantidade de isolados				Total de fungos
		Endocarpo	Colonização (%)	N° fragmentos	Sementes	
Pimenta Murupi	450	112	24,8	450	3	115
Pimenta de Cheiro	450	29	6,4	450	13	42

Nas placas de BDA, os fungos cresceram a partir dos fragmentos dos endocarpos e sementes dos frutos relativamente rápidos, a maioria dos isolados emergiu em menos de sete dias após o plaqueamento das amostras. Poucos isolados obtidos produziram esporos em meio BDA durante o período de 2 a 4 semanas após o isolamento. O restante dos isolados produziram micélios estéreis. Nenhum microrganismo foi observado no controle de desinfecção superficial, indicando que o método de isolamento foi eficiente.

Entre os tratamentos analisados, as amostras do endocarpo da pimenta murupi apresentaram a maior taxa de colonização 24,8%, enquanto a menor porcentagem foi observada nas sementes de murupi de 0,6%, considerando especificamente os hospedeiros *Capsicum*, ressalta-se a particularidade da retenção da capsaicina, na placenta do fruto, local em que ficam inseridas as sementes, onde a concentração pode variar entre as pimentas pertencentes ao gênero, o que leva à hipótese de que a própria placenta do fruto pode estar atuando como uma barreira física e química, reduzindo o livre desenvolvimento dos fungos endofíticos, fato que foi observado no estudo de Veloso et al. (2014) que avaliou a atividade antimicrobiana e antifúngica da capsaicina sugerindo um possível papel para esse composto na defesa das plantas contra patógenos.

Um fato que pode explicar a maior recuperação de endófitos a partir do endocarpo das duas variedades em comparação com as sementes seria que o endocarpo por apresentar uma área de superfície maior e mais exposta ao ambiente, pode acabar favorecendo a aderência e deposição de esporos que podem levar os endófitos a penetrar no tecido após um devido tempo.

4.2.2 Caracterização morfológica e identificação dos isolados

Devido ao grande número de fungos isolados, estes foram inicialmente agrupados com base em suas características morfológicas: forma de colônia, cor do micélio e cor reversa da colônia, para permitir uma seleção ordenada dos isolados. Os isolados foram classificados em seis grupos (A-F) (Figura 3) de acordo com a cor da colônia: branca, verde, cinza/ preto, marrom e laranja, amarelo, outras características que foram levadas em consideração foram à forma da colônia, pigmentação e produção de exsudato. Ainda, foi observada a presença de isolados com características morfológicas únicas, indicando que determinados fungos podem apresentar especificidade por material vegetal.

A distribuição de fungos endofíticos apresentou um padrão considerado normal, com táxons comuns e alguns pouco frequentes como endófitos. Por meio da comparação entre as características morfológicas com a literatura taxonômica disponível (Barnett e Hunter 1972; Larone, 1995; Menezes e Oliveira, 1993), realizou-se a identificação dos fungos ao menor nível taxonômico possível, aqueles que apresentaram estrutura de reprodução foram identificados e agrupados em morfotipos segundo características microscópicas, que revelaram suas identidades como membros de quatro gêneros *Trichoderma* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp e *Scytalidium* sp., o dominador dos gêneros neste estudo foi *Trichoderma* sp, os três primeiros gêneros observados são cosmopolitas pois também foram observados como endófitos em outras espécies vegetais (Paul et al., 2012; Aruna et al., 2017; Ling et al., 2016; Venkatachalam et al., 2015; Wong et al., 2015). O gênero *Scytalidium* sp raramente foi relatado como endófito, mas neste trabalho foi observado como endófito do fruto de pimenta murupi.

O táxon *Penicillium* sp., foi específico apenas para o tecido do endocarpo da pimenta murupi e não foi encontrado em sementes de nenhuma das variedades analisadas, Ravindra et al (2011) relata que fungos podem apresentar especificidade por determinado substrato, em contrapartida o gênero *Aspergillus* sp. foi onipresente em todos tecidos amostrados.



Figura 3 - Fungos endofíticos isolados de frutos de *Capsicum chinense*. Na figura são mostrados alguns representantes dos isolados, agrupados de acordo com sua cor das colônias e características morfológicas. Todos os fungos foram cultivados em meio de Batata Dextrose Agar (BDA) por 7 dias a 28 °C.

O estudo de Santos (2012) indica que as espécies mais frequentemente isoladas pertencem ao filo Ascomycota, incluindo anamorfos (Hyphomycetes e Coelomycetes). Espécies de Basidiomycota e Zigomicota também são isoladas como endofíticas, mas representam um número menor. Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Ascochyta* sp, *Cladosporium* sp, *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Glomelera* sp, *Guignardia* sp, *Mucor* sp, *Nadulisporium* sp, *Pestalotiopsis* sp, *Phyllosticta* sp, *Phomopsis* sp, *Rhizopus* sp e *Xylaria* sp são os mais frequentes (Rodrigues et al., 2000; Zou et al., 2000; Peixoto-Neto et al., 2002), gêneros que não foram observados nas condições utilizadas nesse trabalho, esse fato pode estar relacionado as variações que ocorrem nas comunidades endofíticas havendo diferenças e especificidade da microbiota entre diversos tecidos vegetais: raízes, caules, folhas, flores e frutos (Nalini et al., 2005; Tejesvi et al., 2005; Gond et al., 2007), além de sofrerem influência do ambiente, sazonalidade (Unterseher et al., 2005) e da idade do tecido vegetal.

A porcentagem de 70% não foi identificada, pois produziram micélios estéreis, sem estruturas de reprodução. A presença de hifas estéreis em endófitos, também é comum em outras pesquisas em várias plantas hospedeiras (Fisher et al. 1994; Pimentel et al. 2006; Verma et al. 2007). Nas figuras 4 a 7 são demonstradas figuras com as principais características microscópicas dos fungos mais frequentes neste estudo.

❖ *Penicillium* sp.

Morfologia da Colônia – (Figura 4) Colônia com aspecto aveludado de cor verde escuro com bordas brancas fundo de cor amarela.

Características Microscópicas – Numerosas hifas apresentando conidióforos ramificados com conídios ovais dispersos

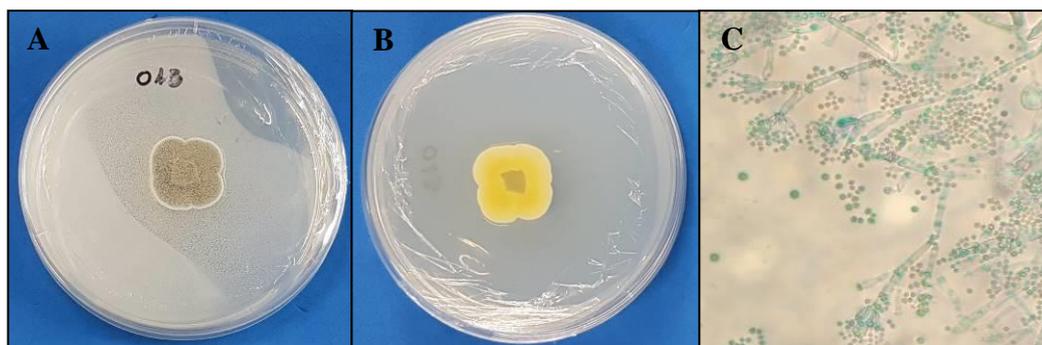


Figura 4 – Morfologia da colônia e estrutura germinativa de *Penicillium* sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.

❖ *Trichoderma* sp.

Morfologia da Colônia – (Figura 5) Colônia inicialmente branca com aspecto algodinoso presença de esporos de cor verde, fundo translúcido.

Características Microscópicas – Hifas apresentando conidióforos ramificados com conídios dispersos

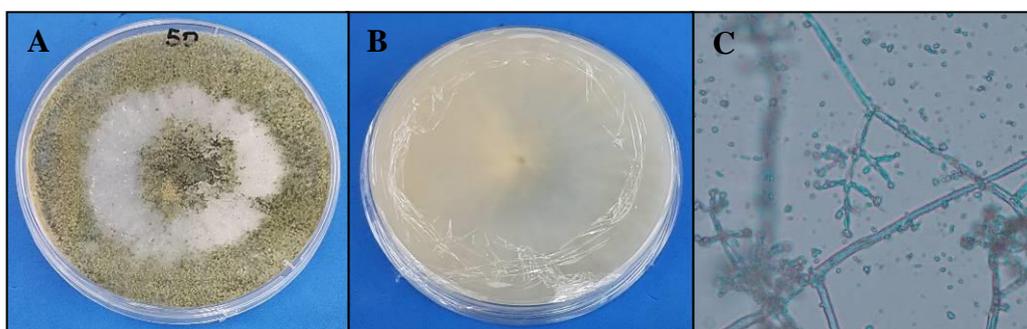


Figura 5 – Morfologia da colônia e estrutura reprodutiva de *Trichoderma* sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.

❖ *Aspergillus* sp.

Morfologia da Colônia – (Figura 6) Colônia verde escura com bordas brancas com aspecto algodinoso, fundo verde escuro a negro com bordas brancas.

Características Microscópicas – Hifas apresentando conidióforos ramificados com conídios dispersos

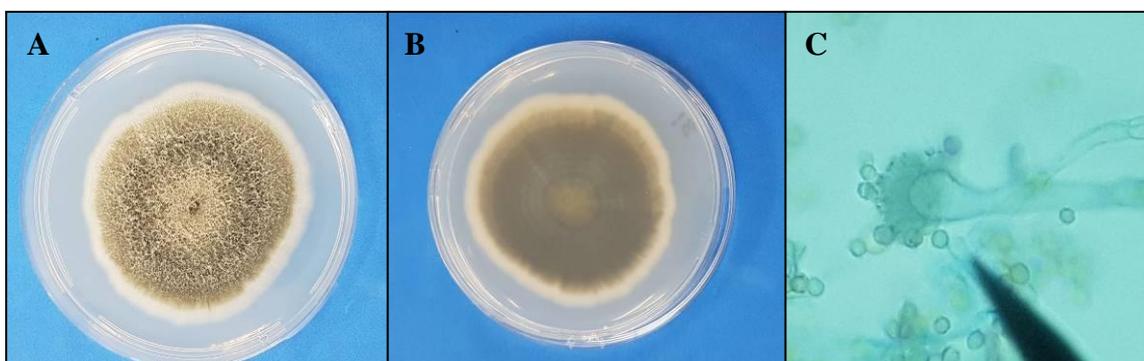


Figura 6 – Morfologia da colônia e estrutura reprodutiva de *Penicillium* sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.

❖ *Scytalidium* sp.

Morfologia da Colônia – (Figura 7) Colônia cinza a negra com aspecto algodinoso presença de estruturas aéreas.

Características Microscópicas – Hifas apresentando conidióforos ramificados com conídios dispersos

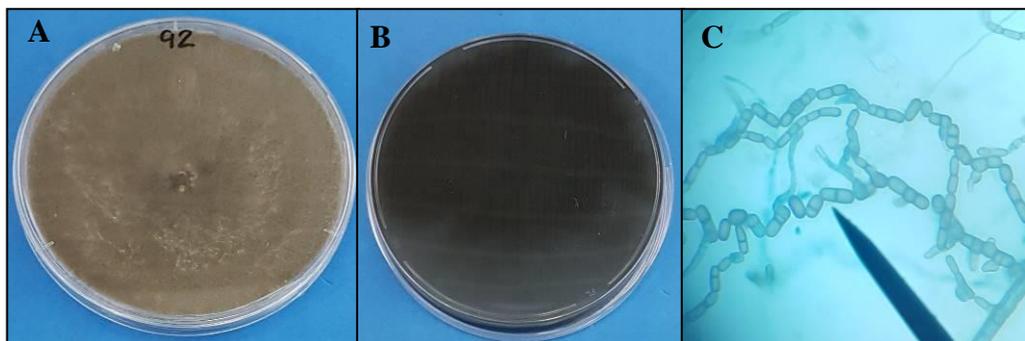


Figura 7 – Morfologia da colônia e estrutura germinativa de *Scytalidium* sp A e B – formas da cultura do fungo. C Microscopia da estrutura reprodutiva.

5 CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGONISTA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Capsicum chinense*.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Avaliação do Potencial Antagonista dos Fungos Endofíticos

Como ponto inicial para avaliação do potencial biológico dos fungos endofíticos isolados foram obtidos extratos brutos em pequena quantidade que foram testados quanto a atividade antibacteriana contra microrganismos teste. Os isolados também tiveram sua atividade antifitopatogênica avaliada em teste de culturas pareadas contra dois fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* sp, isolados de amostras com antracnose do guaranazeiro. Os isolados que apresentaram melhores resultados foram submetidos à fermentação líquida para avaliação da termoestabilidade de suas biomoléculas sobre o crescimento dos fitopatógenos do guaranazeiro, conforme descrito nos itens a seguir.

5.1.2 Obtenção dos extratos orgânicos

Os fungos obtidos foram cultivados em meio de cultivo Ágar Batata Dextrose (BDA), durante sete dias, a 25 °C, após o crescimento das colônias blocos de gelose com os micélios foram transferidos para Erlenmeyers onde ficaram submersos em 300 mL de acetato de etila, por 48h. Através da filtração a vácuo os sobrenadantes foram recuperados e concentrados em evaporador rotativo, restando os extratos brutos das principais substâncias produzidas, que foram utilizados no microensaio de atividade antibacteriana e teste de pareamento contra fitopatógenos.

5.1.3 Microrganismos testes

Os microrganismos teste utilizados nos ensaios foram cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 susceptível a oxacilina e penicilina), *Escherichia coli* (ATCC 25922 Beta lactamase negativa), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e duas linhagens de *Colletotrichum* sp. isolados de amostras de guaraná afetadas por antracnose. As cepas bacterianas foram inicialmente reativadas em meio de cultura Ágar Triptona de Soja (ATS) e novamente purificadas por meio de estrias de esgotamento. Após o crescimento, as colônias foram inoculadas em Caldo Triptona de Soja e incubadas durante 24 h a 37 °C. Após este

período, as culturas foram transferidas para solução salina (NaCl 0,9%; p/v) até obter-se uma turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, que foram utilizadas como inóculos nos testes de inibição. Os isolados de *Colletotrichum* sp. foram reativados em meio caseiro BDA e utilizados para os ensaios as colônias com 7 dias de crescimento.

5.2 Ensaio Biológicos

5.2.1 Teste de atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana com os extratos orgânicos dos microrganismos endofíticos, foi empregado o método de difusão em ágar, baseado na técnica descrita por Huang et al. (2001).

Discos de papel Whatman nº 3 (6mm de diâmetro) foram impregnados com 10 µL das amostras de cada microrganismo endofítico. Para o controle negativo, os discos de papel foram impregnados apenas com DMSO e para o controle positivo, foi utilizado tetraciclina (50µg/mL). Os testes foram realizados em duplicata.

Os discos de papel foram posicionados nas placas semeadas com os microrganismos teste (item 5.1.3), mantendo-se uma distância de 40 mm entre os discos para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição.

Em seguida, as placas foram transferidas para geladeira (4 °C) e mantidas durante 4 horas sob refrigeração. Após esse período, as placas foram incubadas a 35 °C por 24-48 horas, para visualização dos halos de inibição formados, em resposta à difusão dos possíveis compostos antimicrobianos contidos nos extratos, para o meio de cultura.

5.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este ensaio foi realizado para determinar a CIM dos extratos obtidos dos fungos endofíticos contra a cepa de *Staphylococcus aureus*. O método empregado foi da microdiluição em placas de 96 poços de acordo com as diretrizes do Comitê Nacional de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2008) com modificações. Nos poços foram adicionados 100 µL da suspensão da bactéria e 100 µL das amostras a serem avaliadas, todas diluídas em meio de cultura Muller Hinton. Como controles foram utilizados 100 µL de DMSO diluído em meio de cultura Mueller Hinton (controle negativo) + 100 µL Tetraciclina na concentração de 50µL/mL (controle positivo) que também foi diluído

em meio de cultura Mueller Hinton, todos adicionados aos poços com a cultura da bactéria testada. Posteriormente a placa foi incubada a 37 °C e após 24 h foram adicionados 20 µL de Alamar Blue as amostras. A permanência da cor azul indicou ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento da cor rósea indicou a presença de crescimento bacteriano.

5.2.4 Ensaio de cultura pareada – *Colletotrichum* spp x extratos AcoEt

A atividade antifúngica “in vitro” foi avaliada através de ensaio por difusão em disco de papel filtro (Cavalieri et al., 2005) com modificações. O ensaio consistiu em colocar 10 µL do extrato (1 mg do extrato em AcoEt diluído em 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido)) em discos de papel filtro esterilizados (6 mm de diâmetro) sobre meio de cultura BDA e, do lado oposto ao papel filtro, foi inoculado um plug do fitopatógeno (7 mm de diâmetro) retirado de uma placa recém-ropicada. Os extratos de acetato de etila foram analisados em bioensaios contra dois fitopatógenos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* que receberam os códigos GP131 e ISO6/R4.

Após o pareamento, as placas foram vedadas e mantidas durante três horas em geladeira para permitir a difusão dos compostos dos fungos para o meio de cultura. Logo após, as placas foram transferidas para a estufa BOD a 28 °C no escuro e observadas diariamente, até que fosse possível a análise dos resultados. O controle negativo recebeu apenas os discos de micélio dos fitopatógenos. A avaliação foi realizada mediante a comparação do diâmetro da colônia comparando com o controle negativo. Após este período foi observado se houve ou não a formação de halos de inibição.

5.2.5 Ensaio de cultura pareada – *Colletotrichum* spp. x Fungo endofítico

Os fungos endofíticos isolados dos frutos de *C. chinense* foram instigados a crescer na presença dos fungos fitopatogênicos utilizando-se a técnica de cultivo pareado em placas de Petri (Dennis e Webster, 1971). Para isso, plugs de 7 mm de diâmetro das colônias dos fitopatógenos, foram transferidos para uma das extremidades de placas de Petri (a 1 cm da borda) contendo meio BDA. Após dois dias, foram retirados plugs das colônias dos fungos endofíticos e depositados na extremidade oposta das placas (a 1 cm da borda). Todos os tratamentos foram realizados em duplicata e as

placas foram mantidas em B.O.D. a 28 °C até o crescimento total dos fitopatógenos nas placas controle.

Para avaliar o potencial de antagonismo dos isolados foram feitas as análises das interações endofítico-fitopatógeno baseadas na escala de Badalyan et al. (2002), com três tipos de interação: A, B e C, aonde C é subdividida em CA1, CA2, CB1 e CB2, onde A representa o bloqueio de crescimento com contato micelial; B, o bloqueio de crescimento a distancia; C mostra o crescimento do endofítico sobre o fitopatógeno sem bloqueio de crescimento inicial; CA1 Crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (deadlock) com contato micelial, CA2 Crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (deadlock) com contato micelial, CB1 Crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (deadlock) sem contato micelial, CB2 Crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (deadlock) sem contato micelial. Simultaneamente foi realizada a medição do diâmetro das colônias dos fitopatógenos, visando calcular o índice de antagonismo (IA) de cada endófito, segundo a fórmula proposta por Hajjeharari et al., 2008, onde **R1** é o raio da colônia do patógeno teste em uma placa controle e **R2** é o raio da colônia do patógeno em direção ao fungo antagonista conforme modelo esquemático na figura 8, as observações foram realizadas durante 7 dias.

$$IA\% = \frac{[R1 - R2]}{R1} \times 100$$

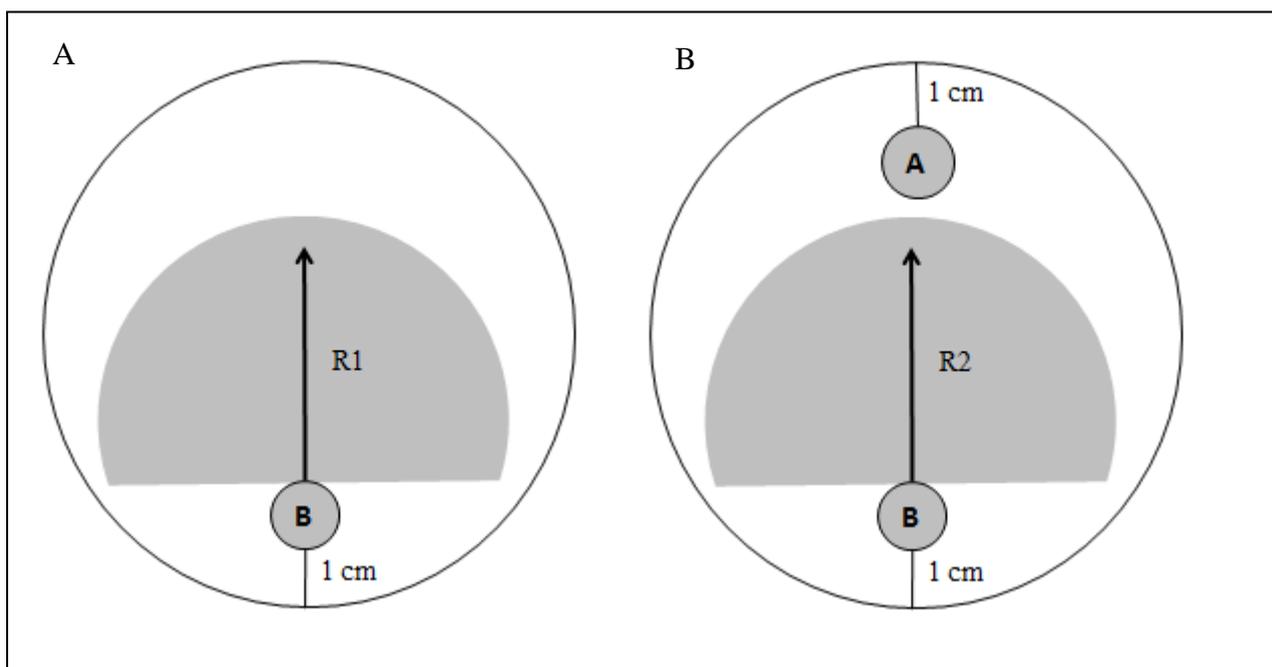


Figura 8 - Modelo esquemático de uma placa de Petri representando a técnica de pareamento direto *in vitro* para avaliação do potencial antagonístico dos fungos endofíticos de *Capsicum chinense*. A) Inóculo de *Colletotrichum* spp. em uma placa controle; B) Inóculo de *Colletotrichum* spp. e a distância de crescimento radial (R2) medida em mm em direção ao fungo antagonista.

5.2.6 Teste de Termoestabilidade de Compostos

Os efeitos dos metabólitos não voláteis produzidos pelos oito fungos endofíticos, que se mostraram ativos nos testes antibacteriano e antifitopatogênico, foram determinados usando o método descrito por Hajieghrari et al. (2008). O disco fúngico de 5mm foi inoculado em um frasco cônico de 250mL contendo 100 mL de BDA e incubado a 27 °C por 10 dias, e então filtrado com papel filtro Whatman. O filtrado foi misturado ao meio BDA até uma concentração final de 20% (v/v) e vertido em placas de Petri. Uma vez solidificado, um disco de 5 mm do patógeno teste foi colocado no centro da placa de BDA. A placa foi incubada a 27 °C. As placas controle foram preparadas sem alterar o BDA com o filtrado da cultura. Após 7 dias, o crescimento radial do teste patógeno no meio de cultura contendo o filtrado e das placas controle foram medidas, e a porcentagem de inibição no micélio o crescimento foi calculado conforme explicado no ensaio de cultura dupla (item 5.2.5).

5.3 Procedimentos para Identificação dos Isolados Promissores

5.3.1 Sequenciamento de Regiões ITS do rDNA

5.3.1.1 Crescimento micelial para extração de DNA

Devido ao numero elevado de isolados e também a semelhança morfológica entre eles priorizamos a extração do DNA apenas dos fungos endofíticos que apresentaram atividade biológica seguindo a técnica descrita por Raeder e Broda (1985).

O micélio obtido no ensaio do item 5.3.4 foi filtrado em filtro de Büchner acoplado a um sistema a vácuo, lavado com água destilada autoclavada e em um gral de porcelana foi macerado com nitrogênio líquido onde posteriormente foi adicionado 5 mL de tampão de extração CTAB 2X (Brometo de cetiltrimetilamônio) a mistura foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL.

A suspensão foi incubada a 65 °C durante 60 minutos e em seguida, foi centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 5 mL de solvente orgânico CIA (clorofórmio-álcool isoamilico 24:1) intervalados com centrifugações e resgate do sobrenadante.

Em seguida, foi realizada a precipitação do DNA com a adição de isopropanol (20°). Os tubos foram homogeneizados manualmente. O precipitado foi resgatado por centrifugação e houve descarte do sobrenadante. O *pellet* foi submetido a duas lavagens sucessivas com etanol 70% gelado e em seguida, seco por inversão dos tubos sobre papel toalha durante 30 minutos. A ressuspensão do *pellet* foi feita com tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

O DNA foi quantificado em gel de agarose-TAE (1%) corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) utilizando como padrão o DNA íntegro de fago λ, em diferentes concentrações. O gel foi submetido a uma corrente de 50 V e após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador de luz UV, sendo o gel fotodocumentado.

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 20 ng/µL e utilizadas nas reações de PCR para a amplificação dos fragmentos de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA.

5.3.1.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA dos fungos foram submetidos à amplificação das regiões ITS do rDNA (ITS1-5.8S-ITS4), utilizando-se os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') para os fungos endofíticos isolados das pimentas descritos por White *et al.* (1990) e o primer C-GAPDH-R (TACTTGAGCATGTAGGCCTG) para identificação dos fitopatógenos. A reação de PCR foi realizada em volume final de 50 µL, tendo como condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos seguida por 25 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 55 °C e 30 segundos de extensão a 72 °C, e uma extensão final de sete minutos a 72 °C.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (v/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE: 40 mM de Tris; 20 mM de ácido acético glacial; 1 mM EDTA), o qual foi corado com brometo de etídeo (5 µg/mL) e fotodocumentado.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados utilizando o *kit GFX PCR Purification* (Qiagen), conforme recomendações do fabricante. O produto de purificação foi quantificado em NanoDrop 2000C e enviado para sequenciamento.

Todas as etapas do processo de identificação molecular dos isolados foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, coordenado pelo Dr. Gilvan Ferreira.

5.3.1.3 Análise das sequências

As sequências de DNA obtidas foram comparadas com as sequências de isolados depositados no GenBank, utilizando o programa BLAST_n (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no portal do *National Center for Biotechnological Information* – NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Após o alinhamento, foram desenvolvidos dendrogramas utilizando o programa MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Atividade antimicrobiana dos metabólitos dos fungos endofíticos

Na triagem qualitativa antibacteriana de 132 isolados de fungos endofíticos, os extratos orgânicos dos isolados 5, 6, 12 e 52 mostraram moderada inibição, na

concentração inicial de 1mg/mL, contra *Staphylococcus aureus*, essa cepa é um patógeno oportunista, e embora seja um colonizador comum da pele humana, uma vez que supera a barreira da pele, pode causar uma variedade de infecções sistêmicas, infecções agudas e crônicas, e recentemente foi reconhecida como patógeno intracelular, característica que contribui potencialmente para a resistência bacteriana (Becker et al., 2014).

Estudos anteriores mostraram que vários extratos de fungos endofíticos exibiram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Abdulhadi, et al., 2020; Nurunnabi et al., 2020; Lai et al. 2020; Metwaly et al., 2019; Cosoveanu et al., 2018) indicando que compostos como alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos frequentemente observados em extratos fúngicos podem ser o responsáveis pelas atividades antimicrobianas.

A avaliação das concentrações inibitórias mínimas dos extratos brutos dos isolados fúngicos variou entre 31,25-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A atividade mais forte foi observada no CIM de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O estudo de Nurunnabi et al., (2020) relata que embora o solvente acetato de etila, utilizado para obtenção dos extratos brutos nesse estudo, seja amplamente utilizado na extração de compostos das culturas de fungos endofíticos (Bhardwaj et al. 2015; Minarni et al. 2017) por possui polaridade média, de modo que tem a capacidade para dissolver os compostos ativos polares e não polares, o uso de solventes com diferentes polaridades como o metanol que pode dissolver quase todos os compostos orgânicos, mesmo polares, semipolares e não polares (Rahmawati et al. 2018), poderia favorecer a observação de uma gama maior de compostos ativos.

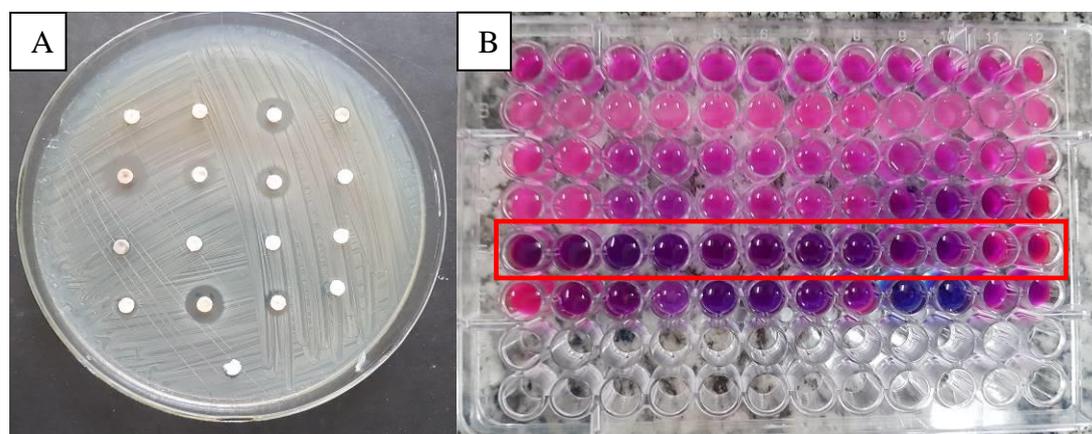


Figura 9 – **A** - Triagem antimicrobiana dos extratos obtidos dos fungos endofíticos contra *S. aureus*. **B** - Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos orgânicos.

5.4.2 Cultivo pareado dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* sp.

A técnica de cultivo pareado em placas de Petri foi utilizada para avaliar a interação dos fungos endofíticos isolados dos frutos de variedades de *Capsicum chinense* frente ao crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum*. Primeiramente, foram avaliados 132 fungos endofíticos contra o crescimento micelial de duas linhagens de fitopatógenos isolados do guaranazeiro

Observando os resultados obtidos por esta técnica, foi possível verificar que 19 endófitos apresentaram taxa de antagonismo acima de 70% sendo a maior parte contra o patógeno GP131 (Figura 10), entre os isolados os de número 43 e 80, identificados pela microscopia como pertencentes ao gênero *Scytalidium* sp., bloquearam em mais de 80% o desenvolvimento dos dois fitopatógenos analisados (Figura 11), e os isolados 37 e 151 bloquearam em 80 e 81,57% o desenvolvimento do fitopatógeno ISO6/R4 respectivamente, na maioria desses casos observou-se que o endófito cresceu mais do que o fitopatógeno, com a ocorrência de contato micelial. Já em outros casos o endófito cresceu sobre o micélio do fitopatógeno e outros os endófitos apresentaram rápido crescimento, mas não houve contato micelial com o fitopatógeno. O tipo de interação endófito-fitopatógeno que prevaleceu nesse experimento foi o por competição, segundo Fatiji et al. (2020) a competição é um forte mecanismo usado por endófitos que impedem patógenos de colonizar o tecido do hospedeiro, porém o método de controle empregado por endófitos é frequentemente local, necessitando de outros mecanismos para ocupar sistematicamente outras partes do hospedeiro onde patógenos podem atacar. O estudo de Lahlali et al., (2014) avaliou a colonização da raiz de colza com endófito *Heteroconium chaetospira* e não conseguiu prevenir os sintomas da raiz torta no vegetal, o que indica as limitações que podem ser encontradas com a competição como método de biocontrole, pois pode ser pouco eficaz quando há uma alta presença de microrganismos causadores de doenças.

Os índices de antagonismo foram calculados, e os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 2, a seguir.

Tabela - 2. Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados do endocarpo e sementes de *Capsicum chinense* Jacquin. contra dois fitopatógenos de *Colletotrichum* sp., e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%).

Isolado	<i>Colletotrichum</i> 1 (GP131)		<i>Colletotrichum</i> 2 (ISO6/R4)	
	TIPO DE INTERAÇÃO	IA%	TIPO DE INTERAÇÃO	IA%
P003	A	75,00	-	-
P025	B	70,00	-	-
P035	B	71,67	-	-
P036	A	70,00	-	-
P037	A	80,00	-	-
P039	A	75,00	-	-
P042	A	75,00	-	-
P043	A	80,00	A	81,54
P050	-	-	A	72,31
P051	A	78,33	-	-
P068	A	73,33	-	-
P070	A	76,67	-	-
P080	A	80,00	A	83,85
P092	A	78,33	-	-
P094	B	71,67	-	-
P107	A	70,00	-	-
P139	B	70,00	-	-
P148	B	70,00	-	-
P151	A	81,67	A	76,92

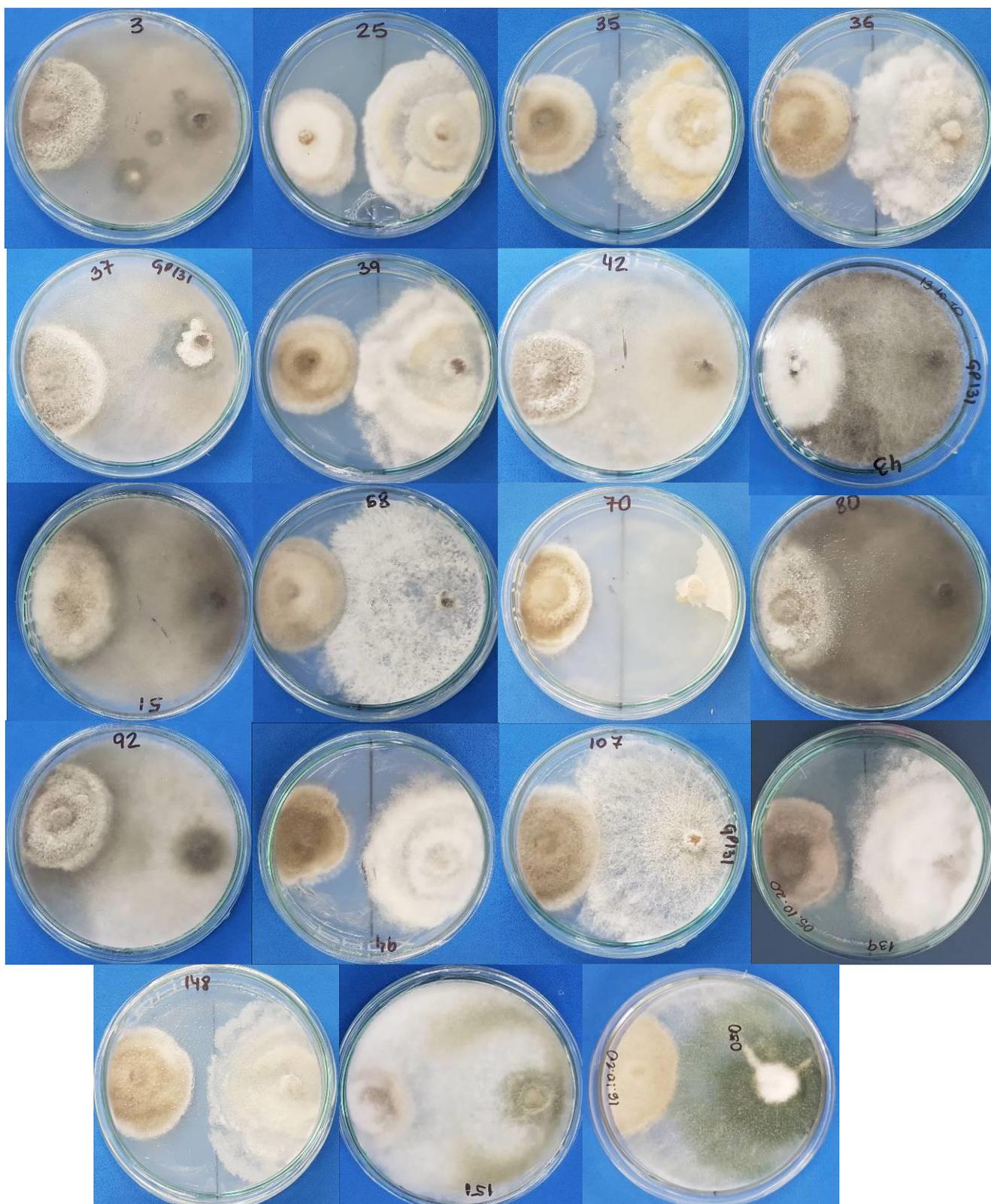


Figura 10 - Cultivo pareado das linhagens de fungos endofíticos (na parte direita das placas) com o fitopatógeno do guaranzeiro – GP131 e ISO6/R4 (na parte esquerda das placas).

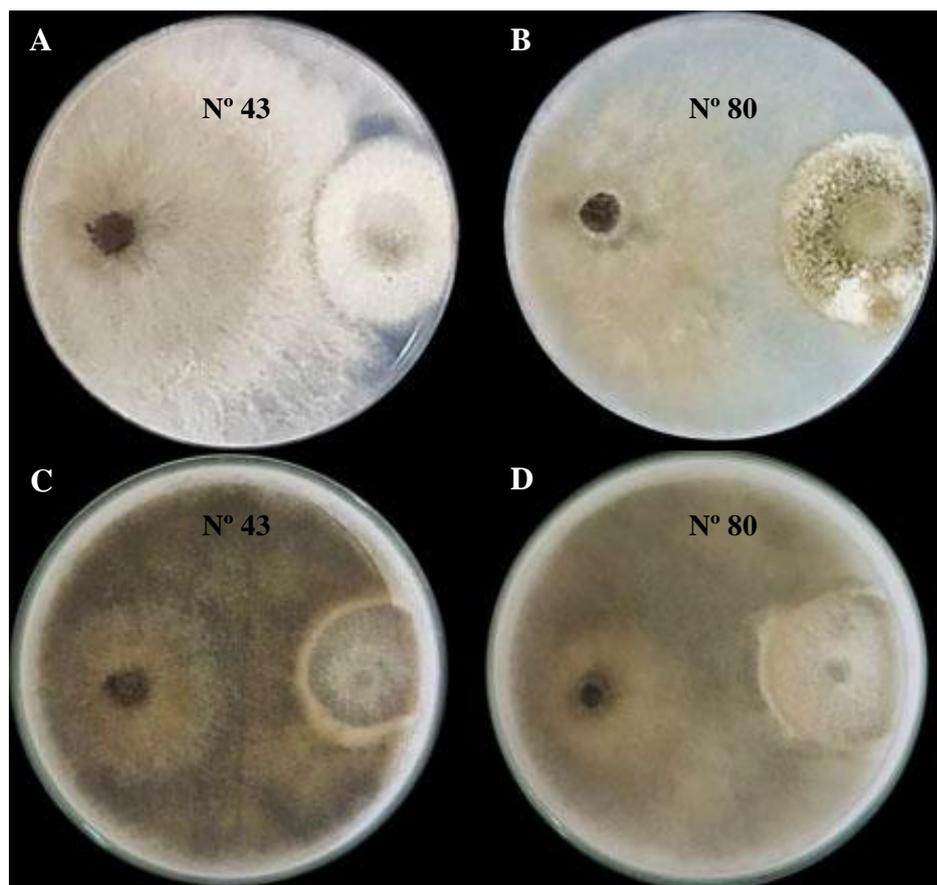


Figura 11 – A e B isolados 43 e 80 contra patógeno ISO6/R4 (lado direito da placa). C e D isolados 43 e 80 contra o patógeno GP131 (lado direito da placa).

5.4.3 Metabólitos secundários com atividade antifúngica à fitopatógenos

Os oito fungos endofíticos que apresentaram atividades biológicas nesse estudo foram selecionados e obtidos seus extratos brutos, que foram submetidos ao ensaio “in vitro” de difusão em disco, para avaliação dos metabólitos secundários quanto à atividade antifúngica as duas espécies de *Colletotrichum*. Os extratos brutos foram aplicados em discos de papel filtro, utilizando-se uma concentração de 1 mg/mL^{-1} e o resultado deste ensaio pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 12).

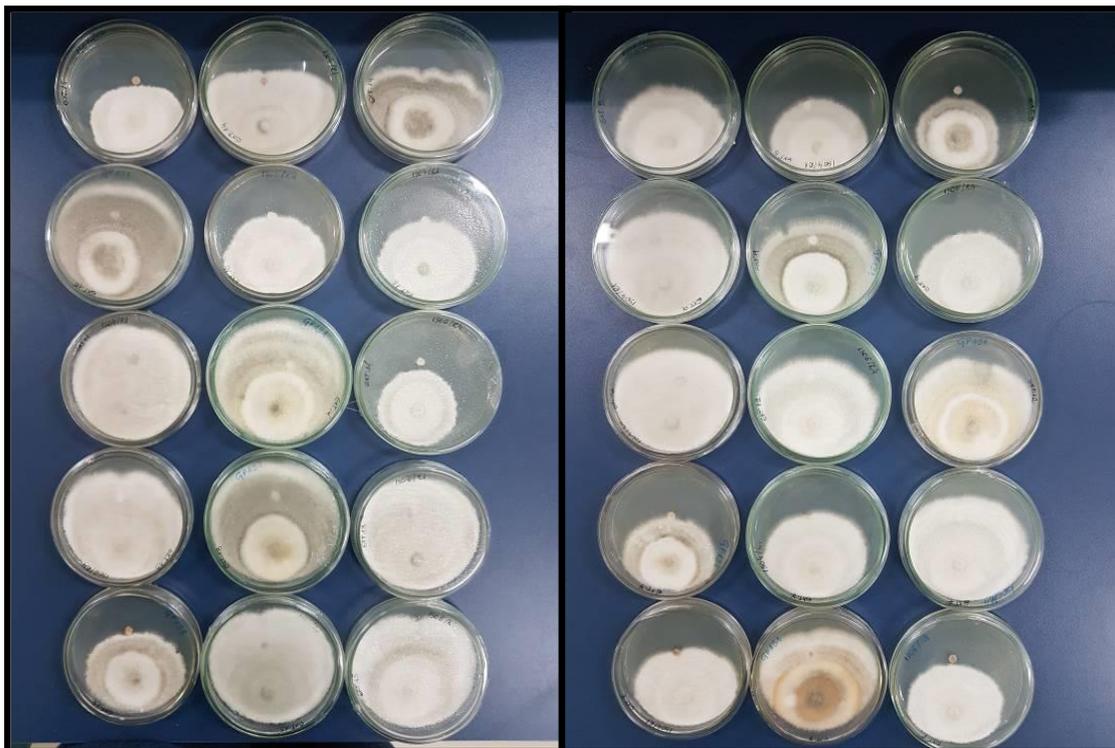


Figura 12 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos por ensaio de difusão em disco contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* spp. isolados do guaranazeiro.

Após observação de atividade antifúngica, as porcentagens de inibição foram calculadas e o resultado obtido mostra que os melhores resultados de inibição foram apresentados pelos extratos brutos dos endófitos 5, 6 e 52 contra o patógeno ISO6/R4 enquanto o extrato do endófito 15 apresentou inibição contra o patógeno GP131 (Figura 13), esses isolados apresentaram porcentagens de inibição ao crescimento micelial dos fitopatógenos maiores que 50%. Os demais isolados apresentaram porcentagens menores de inibição, menores que 50%.

Na figura 13 pode-se observar que alguns compostos presentes nos extratos inibiram o fitopatógeno sem que ocorresse crescimento micelial sobre o papel filtro.

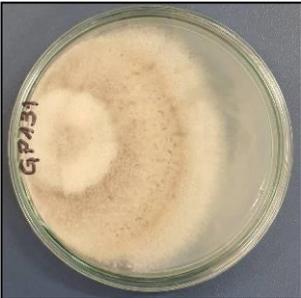
PATOGENO ISO6/R4	EXTRATO 5	EXTRATO 6	EXTRATO 52
			
	56,23%	61,12%	52,45%
PATOGENO GP131	EXTRATO 15		
			
	58,33%		

Figura 13 - Ensaio de difusão em disco dos extratos brutos frente os fungos fitopatogênicos Controle: fungo *Colletotrichum* sp. (GP131); *Colletotrichum* sp. (ISO6/R4).

5.4.4 Teste de termoestabilidade dos compostos fúngicos

Os isolados analisados no item anterior foram submetidos ao teste de termoestabilidade dos seus compostos. As substâncias antagonicas produzidas pelos isolados 6, 12 e 52 demonstraram significativa redução no tamanho da colônia de *Colletotrichum* sp. (GP131), esses microrganismos destacaram-se, pois conseguiram inibir o crescimento da cepa *Staphylococcus aureus* (item 5.4.1) e também dos fitopatogênicos (item 5.4.3), revelando um grande espectro de ação, e, mostrando que os metabólitos produzidos demonstraram-se ativos, mantendo suas atividades mesmo após a esterilização (Figura 14).

O maior número de estudos que analisam a termoestabilidade de compostos produzidos por fungos endofíticos, o fazem a partir de moléculas como as enzimas, assim como é referenciado no estudo de Yadav (2013) que ao isolar enzimas, para fins industriais, a partir do fungo endofítico *Bartalinia* sp. observou a termoestabilidade da enzima celulase que manteve quase 50% da sua atividade inicial mesmo após ser

mantida por duas horas a 100 °C, demonstrando uma natureza termotolerante. Atividade ótima de celulase obtida na temperatura de 100 °C foi surpreendente e o resultado indicou que a atividade da celulase foi afetada pela mudança na temperatura.

Streptosporangium sp. um actinomiceto endofítico isolado de folhas de milho (*Zea mays* L.) apresentou a produção de glucoamilase. A enzima isolada exibiu propriedades termoestáveis (Stamford et al. 2002). Silvia e colaboradores (2018) analisaram uma endoglucanase halotolerante que foi obtida a partir da fermentação sólida do bagaço de cana-de-açúcar pelo fungo *Botrytis ricini*, a enzima foi estável a temperatura de 39–60 °C por 60 min, demonstrando ao final do estudo que essa propriedade torna esta enzima isolada uma candidata potencial para aplicações industriais. Varias enzimas termoestáveis estão sendo investigadas atualmente para melhorar os processos industriais.

A capacidade dos endófitos em produzir várias enzimas in vivo e in vitro significa que o hospedeiro fornece nutrientes e condições favoráveis para colonização de endófitos, e que eles podem ser usados para várias aplicações biotecnológicas (Tomita, 2003).

Os resultados obtidos sugerem que a defesa química se manifesta em diferentes níveis e que determinados metabólitos bioativos apresentam padrões de indução semelhantes. Essas descobertas podem indicar que os fungos elaboram estratégias de defesa que produzem antifúngicos concomitantemente e que tais compostos podem atuar aditivamente ou sinergicamente. Mais estudos são necessários para decifrar os vários eventos que desencadeiam essas respostas bioquímicas, auxiliando no conhecimento dos vários aspectos dessas interações (Liang, 2016).

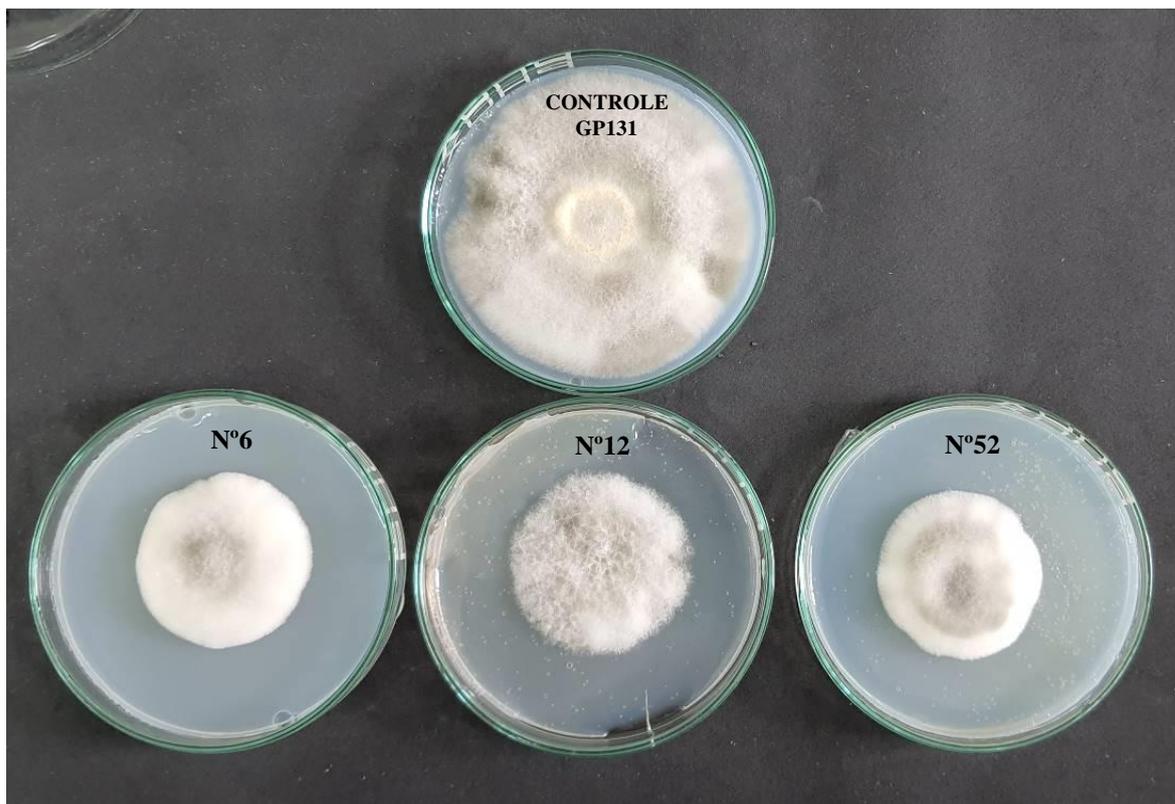


Figura 14 - Teste de compostos antifúngicos não voláteis dos endófitos isolados dos frutos de *Capsicum chinense*

5.4.5 Identificação molecular

Baseado nos resultados obtidos nesse estudo, nove isolados de fungos endofíticos e dois fitopatógenos utilizados nos testes de cultura dupla foram indicados para identificação molecular, de onze amostras apenas oito foram amplificadas com sucesso usando primers ITS1 e ITS4 para os fungos endofíticos isolados das pimentas *Capsicum* e o primer GAPDH para os fitopatógenos, pois através de análises micromorfológicas prévias, estes foram sugeridos como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. As seqüências obtidas em formato “fasta” foram comparadas com o banco genômico do NCBI por meio da *Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide (Blastn)*, onde os resultados obtidos revelaram suas identidades como membros de três gêneros diferentes como ilustrados na Tabela 3, todos pertencentes ao filo Ascomycota, que inclui duas classes, Sordariomycetes e Dothideomycetes.

Um total de 38 seqüências de parentes próximos foram baixados do NCBI GenBank e combinado com seqüências dos 8 endófitos para construção das árvores filogenéticas (Figuras 15, 16 e 17).

Os patógenos GP131 e ISO6/R4 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*. Foi observada alta similaridade do patógeno GP131 (99,28%) com as espécies *Colletotrichum cf geosporioides* e *Colletotrichum siamense* enquanto ISO6/R4 apresentou 100% de similaridade com a espécie *Colletotrichum siamense*, no entanto vários artigos discutem sobre as semelhanças genéticas entre muitos dos *Colletotrichum* spp, o que levou esse gênero a ser reconhecido como um gênero complexo sendo necessário uma aplicação combinada de primers moleculares para uma identificação mais exata, fato que pode ser observado nesse estudo, pois a utilização de um único primer, o GAPDH, não foi suficiente para determinar a espécie dos patógenos utilizados, sobretudo do patógeno GP131. De acordo com Cannon et al. (2012) as relações biológicas e genéticas dentro do amplo clado de *C. gloeosporioides* são confusos e as sequências ITS por si só são insuficientes para esclarecê-las.

Uma serie de estudos publicados demonstraram a similaridade genética entre espécies de *Colletotrichum*, Weir et al (2012) relata que várias espécies são consideradas sinônimos de *C. gloeosporioides* que são membros do complexo *C. acutatum* (por exemplo, *C. godetiae*, *Gloeosporium limeticola*, *G. lycopersici* e *G. phormii*) e do complexo *C. boninense* (*C. dracaenae*) e ainda que embora os estudos moleculares resultem em uma compreensão muito melhor das relações filogenéticas, a espécie *C. gloeosporioides* necessita de uma taxonomia mais atualizada.

Os isolados 6, 52 e 151 demonstraram similaridade com o gênero *Diaporthe* (fase anamórfica do *Phomopsis*) esse gênero é frequentemente relatado na literatura como endófito, patógeno e saprófito e colonizam uma ampla gama de plantas de clima tropical. Eles são conhecidos pela produção de compostos bioativos que incluem antimaláricos, antifúngicos, herbicidas, antiinflamatórios, antimicrobianos e regulador de crescimento de plantas (Yenn et al., 2017). Os isolados 6 e 151 demonstraram 99,47 e 99,82 % de analogia, respectivamente, com a espécie *D. phaseolorum*, enquanto o isolado 52 que demonstrou maior inibição no teste antibacteriano contra *S. aureus* foi identificado somente como pertencente ao gênero *Diaporthe* sp., esse resultado sugere que esse isolado possa compreender uma nova espécie ou talvez tal resultado tenha necessidade de ser investigado com o uso de outros primers moleculares pois o estudo de Santos et al. (2010) observou uma variação intraespecífica em sequências ITS em várias espécies de *Diaporthe* o que pode causar confusão no reconhecimento de espécies quando utilizado sozinho.

O estudo de Udayanga et al., (2014) relata que há uma diversificação críptica, e que as extensas associações com hospedeiros complicam há muito tempo as identificações a nível de espécie neste gênero, informação o que foi confirmada ao tentar a delimitação filogenética da espécie *Diaporthe eres* onde na análise molecular foram utilizados oito genes, incluindo o ribossomal nuclear espaçador transcrito interno (ITS), sequências parciais de actina (ACT), DNA-liase (Apn2), fator de alongamento da tradução 1- α (EF1- α), beta-tubulina (TUB), calmodulina (CAL), proteína ribossomal L37 60s (FG1093) e histona-3 (HIS) e foi observado a ocorrência de heterogeneidade na sequência de ITS dentro de *D. eres*, o que complica a análise e pode levar a superestimação da diversidade de espécies.

As sequências nucleotídicas dos isolados que demonstraram altas taxas de antagonismo no teste de cultura dupla foram análogas com *Neoscytalidium dimidiatum* que é um fungo demáceo que causa doenças em vários hospedeiros vegetais. Uma revisão taxonômica realizada por Crous et al. (2006) sobre a família Botryosphaeriaceae, concluiu que *Scytalidium* é um grupo polifilético e propôs um novo gênero o *Neoscytalidium* para acomodar a espécie *Scytalidium dimidiatum* (Penz.) passando a ser reconhecida como *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.). Shokoohi et al., 2020 relata que o novo gênero *Neoscytalidium* agrupa fungos que apresentam uma simbiose complexa com diferentes plantas.

O alinhamento da região ITS dos isolados 37, 43 e 80 foi realizado com 8 sequências, entre *N. dimidiatum*, *N. novahollandiae* e *N. orchidacearum* e um de *S. lignicola* como grupo externo (Figura 15). Todos os isolados deste estudo foram agrupados junto com a sequência de *N. dimidiatum* no mesmo ramo.

Tabela 3 – Similaridade máxima de identidade de nucleotídeos de oito isolados fúngicos com base em sequências ITS usando análise BLASTn.

ID Isolado	Similaridade (%)	E-value	Espécie	Acesso Genbank
151	99,82	0.0	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JF896458.1
37	99,13	0.0	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	MF580799.1
43	99,30	0.0	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	MF580799.1
80	98,98	0.0	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	MT565490.1
52	99,13	0.0	<i>Diaporthe</i> sp.	KU523580.1
6	99,47	0.0	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JF896458.1
P1(GP131)	99,28	9e-138	<i>Colletotrichum</i> cf. <i>gloeosporioides</i>	HQ022566.1
P2 (ISO6/R4)	100	4e-141	<i>Colletotrichum siamense</i>	MN525882.1

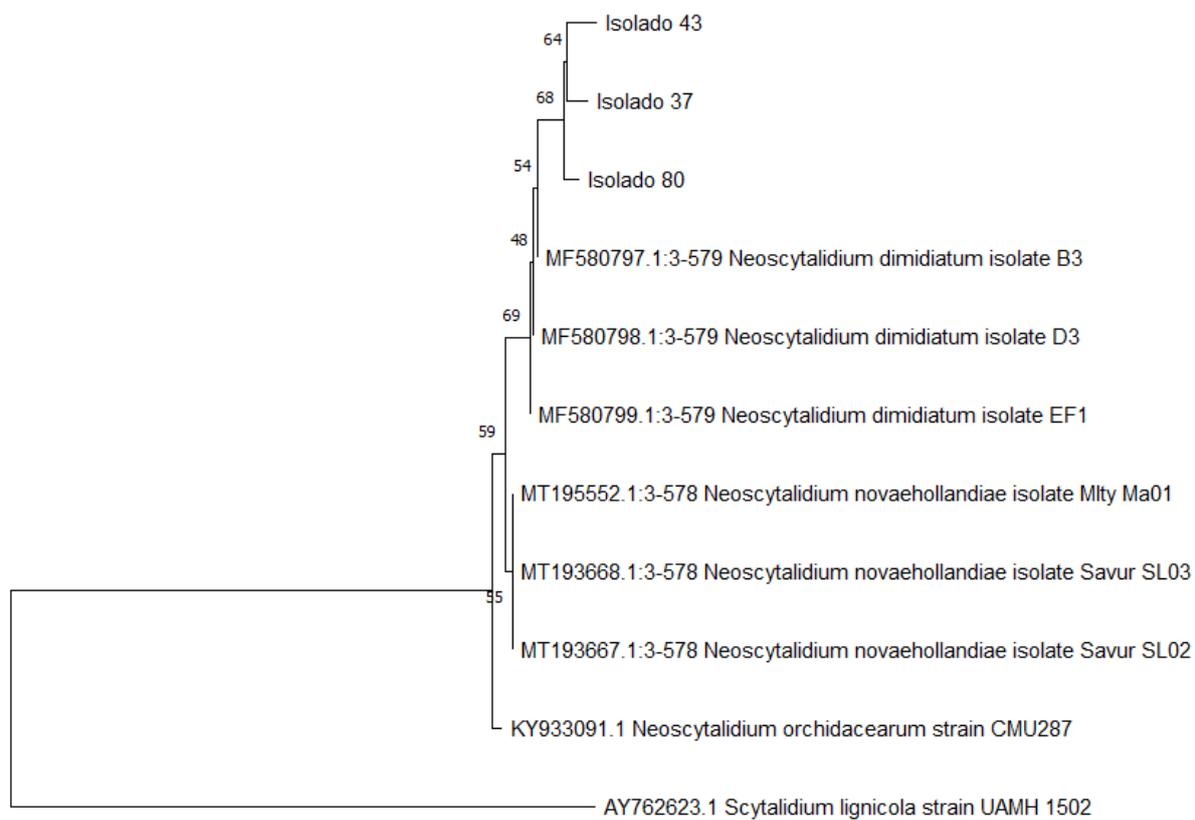


Figura 15 - Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de seqüências dos isolados 37, 43 e 80 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI

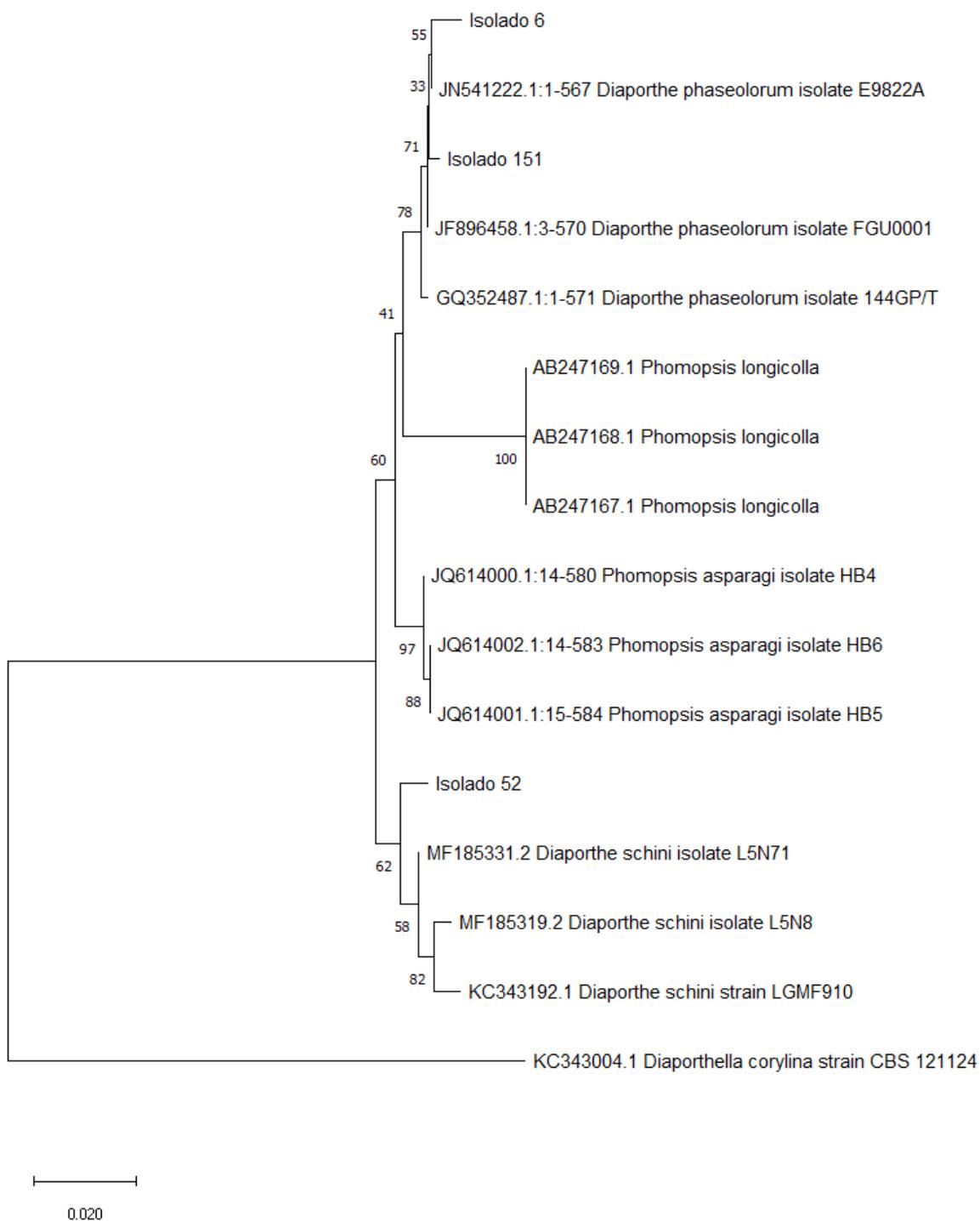


Figura 16 - Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências dos isolados 6, 52 e 151 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI

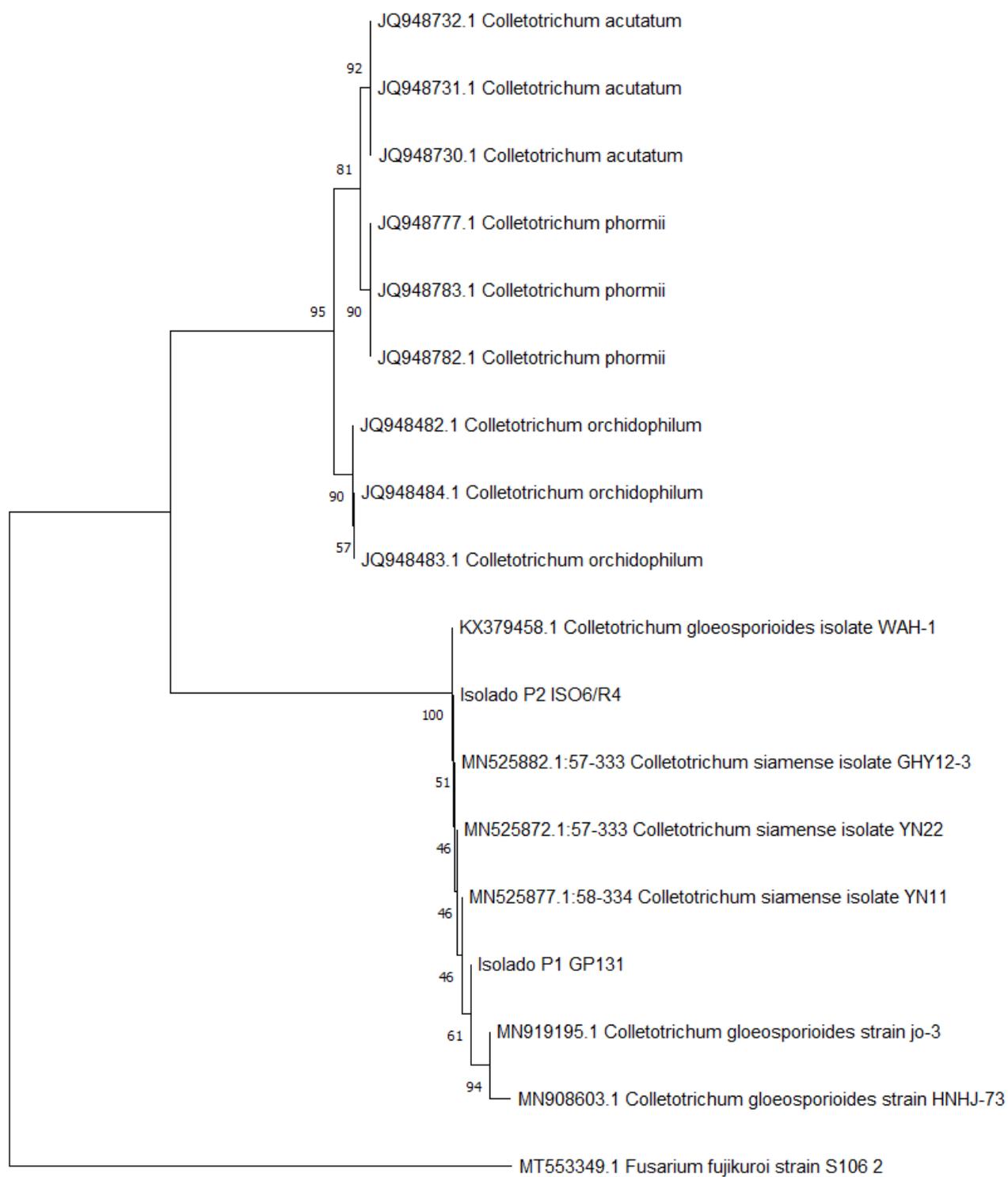


Figura 17 - Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências dos patógenos GP131 e ISO6/R4 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo reafirmou o potencial dos fungos endofíticos como fontes promissoras na produção de compostos bioativos com atividade antifúngica e antibacteriana.

No estudo dos metabólitos secundários a fração acetato de etila dos endófitos 5, 6, 12 e 52 inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e micelial de *Colletotricum* spp.

O presente trabalho apresenta significativa contribuição científica por ter relacionado atividades biológicas a microrganismos endofíticos isolados de pimentas típicas da região amazônica, pouco conhecidas na literatura.

Foi observada a presença de compostos de novas fontes biológicas, além disso, há a possibilidade de serem compostos inéditos. Para essa confirmação, análises complementares precisam ser realizadas, a fim de finalizar a elucidação estrutural dos compostos em questão.

O antagonismo químico pôde demonstrar a presença de compostos que mesmo sendo submetidos à alta temperatura permaneceram apresentando atividade biológica.

Dentro das perspectivas para trabalhos futuros, a continuidade da investigação dos mecanismos que estão envolvidos no processo que desencadeiam as atividades biológicas observadas;

Considerando os resultados aqui apresentados e os encontrados na literatura, a busca de compostos em endofíticos é promissora e potencial para produção de protótipos de importância biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ABDULHADI, S. Y.; HASAN, G. Q.; GERGEES, R. N. Molecular detection and antimicrobial activity of Endophytic fungi isolated from a medical plant *Rosmarinus officinalis*. **Annals of Tropical Medicine & Public Health**. Vol. 23. September 2020.
- AGUIAR, A. C.; COUTINHO, A. P.; BARBERO, G. F.; GODOY, H. T.; MARTÍNEZ, J. Comparative Study of Capsaicinoid Composition in *Capsicum* Peppers Grown in Brazil. **International Journal of Food Properties**, 19:1292–1302, 2016.
- AHARWAL, R. P.; KUMAR, S.; SANDHU, S. S. Isolation and Antibacterial Property of Endophytic Fungi Isolated from Indian Medicinal Plant *Calotropis procera* (Linn.) r.br. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** Volume 3, Issue 5, 678-691. 2014.
- AKBAS, ELIF.; SOYLER, U. B.; OZTOP, M. H. Physicochemical and Antimicrobial Properties of Oleoresin *Capsicum* Nanoemulsions Formulated with Lecithin and Sucrose Monopalmitate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Outubro, 2018.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T.; PIZZARANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia Prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Editora CALQ. p. 167. 2010.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 4906-4916. 2002.
- ARUNA, A.; ABHINESH, M.; RAMESH, J.; REDDY, V.K. Distribution and Diversity of Fungal Endophytes from *Calotropis gigantea* (L.) R. BR. from Telangana, India. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**. Volume 7: 4. 46-55. 2017.
- BACON, K.; BOYER, RENEE.; DENBOW, CYNTHIA.; O'KEEFE, SEAN.; NEILSON, A.; WILLIAMS. ROBERT. Evaluation of different solvents to extract antibacterial compounds from jalapeño peppers. **Food Science & Nutrition**. ;5:497–503. 2017.
- BADALYAN S.M., INNOCENTI G., GARIBYAN N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna (41) 200-225. 2002.
- BAENAS. N.; BELOVIĆ, M.; ILIC.; MORENO, N. D.A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. **Food Chemistry** 274: 872–885. 2019.

BARBOSA, F. H. F.; BAMBIRRA, F.H. S.; BARBOSA, L. P. J. L.; FAUSTINO, S. M. M.; NICOLI, J. R. Propriedade antimicrobiana de extrato de pimenta (*Capsicum frutescens* L.) contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Cândida albicans*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 12 - n° 2 - 2º Semestre 2012.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3º.Ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 241p. 1972.

BECKER, S.; FRANKEL, M. B.; SCHNEEWIND, O. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 111, 1574–1579. 2014.

BHARDWAJ A, SHARMA D, JADON N, AGRAWAL P. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. **Arch Clin Microbiol** 6:1–9. 2015.

BOZDOGAN, A.M. Assessment of total risk on non-target organisms in fungicide application for agricultural sustainability. **Sustainability**, Basel, v.6, p.1046-1058, 2014.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology** 73: 181–213. 2012.

CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A.; RIOS, A. O.; MACIEL, R. A.; MORESCO, K. S.; OLIVEIRA, T. C. S. Bioactive compounds and antioxidant activity of pepper (*Capsicum* sp.) genotypes. **Journal Food Scienci Technologyc** 52(11):7457–7464. November 2015.

CARVALHO, J.M.; PAIXÃO, L.K.O.; DOLABELA, M.F.; MARINHO, P.S.B.; MARINHO, A.M.R. Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). **Acta Amazonica**. 46(1), 69-72. 2016.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. Pimentas do Gênero *Capsicum* no Brasil, EMBRAPA-HORTALIÇAS. 27p. 2006.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal Tropical Medicine**. Hyg. 42: 225-226. 1939.

CAVALIERI, S.J.; HARBECK, R.J.; McCARTER, Y.S.; ORTEZ, J.H.; RANKIN, I.D.; SAUTTER, R.L.; SHARP, S.E.; SPIEGEL, C.A. **Manual of antimicrobial susceptibility testing**. Seattle: American Society for Microbiology, 236p. 2005.

CIULU – COSTINESCU, F.; CHIFIRIUC, M. C.; POPA, M.; BLEOTU, C.; NEAMTU, J.; AVERIS, L. M. E.; BUBULICA, M. V.; SIMIONESCU, A.; ALDEA, I. M. BELU, I. Screening of Polyphenol Content and *In vitro* Studies of Antioxidant,

Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Capsicum Annuum* Extract. **REV. CHIM.** (Bucharest). 66:9. 2015.

CLARK. R.; LEE, J.; LEE, SEONG-HO. Synergistic Anticancer Activity of Capsaicin and 3,3'-Diindolylmethane in Human Colorectal Cancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 63, 4297–4304. 2015.

CLSI. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard – second edition. M38-A2**, Clinical and Laboratory Standards Institutes, Wayne, PA, USA 28, 16. 2008.

COSOVEANU, A.; CABRERA, R. Review: Endophytic Fungi in Species of *Artemisia*. **Journal Fungi**, 4, 53. 2018.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.; PHILIPS, A. J.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Stud Mycol**, 55:235-53. 2006.

CRUZ, F. T. **Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* e sua relação com o teor de capsaicinóides.** In: Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre: Editora da Universidade, p. 205-206. 2003.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, 11. Production of volatile antibiotics. **Transactions of British Mycology Society**, Surrey, v. 57, p. 41-48, 1971.

DEVARI, S.; JAGLAN, S.; KUMAR, M.; DESHIDI, R.; GURU, S.; BHUSHAN, S.; KUSHWAHA, M.; GUPTA, A. P.; GANDHI, S. G.; SHARMA, J. P.; TANEJA, S.C.; VISHWAKARMA, R.A.; ALI SHAH, B. Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC–ESI–MS/MS analysis. **Phytochemistry**. 2013.

DWIBEDI, V.; SAXENA, S. Diversity and phylogeny of resveratrol-producing culturable endophytic fungi from *Vitis* species in India. **Biotech**. 9:182.2019.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**. 8. May 2020.

FAOSTAT (2016). Food and agriculture organization of the United Nations. FAOSTAT Statistics Database Acesso 14.10.20

FARHAT, H.; UROOJA, F.; TARIQB, A.; SULTANAC, V.; ANSARID, M.; AHMADD, V. U.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Evaluation of antimicrobial potential of endophytic fungi associated with healthy plants and characterization of compounds

produced by endophytic *Cephalosporium* and *Fusarium solani*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 18. 2019.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Botanica Helvetica**, Basel, v. 94, p. 249-253, 1994.

FREIRE, K. T.L.S.; ARAÚJO, G. R.; BEZERRA, J. D.P.; BARBOSA, R. N.; SILVA D. C.V.; SVEDESE, V. M.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M.. Fungos Endofíticos de Opuntia Ficus-Indica (L.) Mill. (Cactaceae) Sadia e Infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia** Edição Especial Cactaceae. Volume 9(2): 104-110. 2015.

FRISVALD, J.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolites profiling in the chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research** 231-240, 2008.

GAITÁN, M.A.G.; WEN, S, F. N.; BAYMAN, P. Effects of fungicides on endophytic fungi and photosynthesis in seedlings of a tropical tree, *Guarea guidonia* (Meliaceae). **Acta Biol Colombiana** 10: 41-47. 2005.

GANNON, N. P.; LAMBALOT, E. L.; VAUGHAN, R. A. Review: The effects of capsaicin and capsaicinoid analogs on metabolic molecular targets in highly energetic tissues and cell types. **BioFactors**. 2016.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A. Study of endophytic fungal community from different parts of Argle marmelos Corrae (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 23, p. 1371–1375, 2007.

GUNATILAKA, L. A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, 69: 509-526. 2006.

GUO, Z.; ZOU, ZHONG-MEI. Discovery of New Secondary Metabolites by Epigenetic Regulation and NMR Comparison from the Plant Endophytic Fungus *Monosporascus eutypoides*. **Molecules**, 25, 4192. 2020.

HAJIEGHRARI, B.; TORABI-GIGLOU, M.; MOHAMMADI, M. R.; DAVARI, M. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. **African Journal Biotechnology**. 7, 967–972. 2008.

HALÁSZ, K.; BORBÉLY, C.; PÓS, V.; GÁSPÁR, L.; HADDADDERAFSHI, N.; WINTER, Z.; LUKÁCS, N. Effect of crop management and cultivar on colonization of *Capsicum annuum* L. by Endophytic Fungi. **ACTA UNIVERSITATIS SAPIENTIAE. AGRICULTURE AND ENVIRONMENT**, 8:5-15. 2016.

HENZ, G. P. Perspectivas e potencialidade do mercado para pimentas. Embrapa Hortaliças. I Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta (*Capsicum* spp.) 2011.

HERNAWATI, H.; WIYONO, S.; SANTOSO, S. Leaf endophytic fungi of chili (*Capsicum annuum*) and their role in the protection against *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). **Bio Diversitas**.12:4. 187-191. 2011.

HUANG, RUI-HUAN.; GOU, JIAN-YU.; ZHAO, DONG-LIN.; WANG, D.; LIU, J.; MA, GUO-YONG.; LIA, YI-QIANG.; ZHANG, CHENG-SHENG. Phytotoxicity and anti-phytopathogenic activities of marine-derived fungi and their secondary metabolites. **RSC Adv**8, 37573–37580, 2018.

HUANG, W.Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Divers** 33:61–75. 2008.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 31, 163-167. 2001.

JOSHI, D.; MISRA, S.C. Characterization of *Trichoderma* Isolates from Sugarcane Agro-Ecosystem and their Efficacy Against *Colletotrichum falcatum* Causing Red Rot of Sugarcane. *Sugar Tech* volume 15, 192–196pg. 2013.

KHARWAR, R. N.; MAURYA, A. L.; VERMA, V. C.; KUMAR, A.; GOND, S. K.; MISHRA, A. Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungal Community Isolated from Medicinal Plant *Cinnamomum camphora*. **Proc. Natl. Acad. Sci, India, Sect. B Biol. Sci.** 82(4):557–565. 2012.

LAHLALI, R.; MCGREGOR, L.; SONG, T.; GOSSEN, B. D.; NARISAWA, K.; PENG, G. *Heteroconium chaetospora* induces resistance to clubroot via upregulation of host genes involved in jasmonic acid, ethylene, and auxin biosynthesis. **PLoS ONE** 9: 2014.

LAI, D.; MAO, Z.; ZHOU, Z.; ZHAO, S.; XUE, M.; DAI, J.; ZHOU, L.; LI, D. New chlamydosporol derivatives from the endophytic fungus *Pleosporeles* sp. Sigrf05 and their cytotoxic and antimicrobial activities. **Scientific Reports**, 10:8193. 2020.

LARONE, D.H. **Medically Important Fungi - A Guide to Identification**. 3.ed. Washington: ASM Press, 1995. 156 p.

LI, J.; ZHAO, G. Z.; HUANG, H. Y.; QIN, S.; ZHU, W. Y.; ZHAO, L. X.; XU, L. H, ZHANG, S.; LI, W. J, STROBEL, G. Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua*L. **A Van Leeuw J Microb.**101:515-527. 2012.

LI, JIA-LONG.; SUN, X.; ZHENG, Y.; LÜ, PENG-PENG.; WANG, YONG-LONG.; GUO, LIANG-DONG. Diversity and community of culturable endophytic fungi from stems and roots of desert halophytes in northwest China. **MycoKeys** 62: 75–95. 2020.

LIANG, X.R. **Secondary Metabolites from Three Marine-Derived *Trichoderma* Fungi and Their Bioactivities**. Ph.D. Thesis, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, China, 2016.

LING, O. M.; TEEN, L. P.; MUJAHID, A.; PROKSCH, P.; MÜLLER, M. Initial Screening of Mangrove Endophytic Fungi for Antimicrobial Compounds and Heavy Metal Biosorption Potential. **Sains Malaysiana** 45(7): 1063–1071. 2016.

MAO, B.Z.; HUANG, C.; YANG, G.M.; CHEN, Y.Z.; CHEN, S.Y. Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, p.5955-5961, 2010.

MAO, Z.; WANG, W.; SU, R.; GU, G.; LIU, Z. L.; LAI, D.; ZHOU, L. Hyalodendrins A and B, New Decalin-Type Tetramic Acid Larvicides from the Endophytic Fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12. **Molecules**, 25, 114; 2019.

MARINI, E.; MAGI, G.; MINGOIA, M.; PUGNALONI, A.; FACINELLI, B. Antimicrobial and Anti-Virulence Activity of Capsaicin Against Erythromycin-Resistant, Cell-Invasive Group A Streptococci. **Frontiers in Microbiology**. v. 15, n. 1281. 2015.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: UFRPE (imprensa Universitária), 277 p. 1993.

METWALY, A. M.; ASHOUR, M. A.; KHAN, S.; MA, G.; KADRY, H. A.; EL-HELA, A. A.; MOHAMMAD, ABD-ELSALAM, I.; CUTLER, S. J.; ROSS, SAMIR. A. Comparative Biological Evaluation of Four Endophytic Fungi Isolated from *Nigella sativa* Seeds. **Az. J. Pharm Sci**. Vol. 59, March, 2019.

MINARNI, I.; MADE ARTIKA.; JULISTIONO, H.; BERMAWIE, N.; RIYANTI, E. I.; HASIM, A. E. Z. H. Anticancer activity test of ethyl acetate extract of endophytic fungi isolated from soursop leaf (*Annona muricata* L.). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 10(6): 566–57. 2017.

MURI, S.D.; VAN DER VOET, H.; BOON, P.E.; VAN KLAVEREN, J.D.; BRUSCHWEILER, B.J. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v.47, p.2963-2974, 2009.

NALINI, M.S.; MAHESH, B.; TEJESVI, M.V.; PRAKASH, H.S.; SUBBAIAH, V.; KINI, K.R.; SHETTY, H.S. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) DC. (Capparidaceae). **Mycopathologia**, Boston, v. 159, p. 245-249, 2005.

- NALINI, M.S.; SUNAYANA, N.; PRAKASH, H. S. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. **International Journal Biodiversity**; 2014:1–9. 2014.
- NAZZARO, F.; CALIENDO, G.; ARNESI, G.; VERONESI, A.; SARZI, P.; FRATIANNI, F. Comparative Content of Some Bioactive Compounds in Two Varieties of *Capsicum annuum* L. Sweet Pepper and Evaluation of Their Antimicrobial and Mutagenic Activities. **Journal of Food Biochemistry** **33**: 852–868. 2009.
- NISA, H.; KAMILI, A.N.; NAWCHOO, I.A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S.A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, London, v.82, p.50-59, 2015.
- NOTARTE, K. I. R.; DEVANADERA, M. K. P.; MAYOR, A. B. R.; CADA, M. C. A.; PECUNDO, M. H.; MACABEO, A. P. G.. Toxicity, Antibacterial, and Antioxidant Activities of Fungal Endophytes *Colletotrichum* and *Nigrospora* spp. Isolated from *Uvaria grandiflora*. **Philippine Journal of Science** 148 (3): 505-512, September 2019.
- NURUNNABI, T. R.; SABRIN, F.; SHARIF, D. I.; NAHAR, L.; SOHRAB, M. H.; SARKER, S. D.; MAHBUBUR RAHMAN, S. M.; BILLAH, M. M. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* (Buch.-Ham) from the Sundarbans mangrove forest. **Advances in Traditional Medicine**, 20:419–425. 2020.
- OLA, A. R. B.; METBOKI, G.; LAY, C. S.; SUGI, Y.; ROZARI, P. D.; DARMAKUSUMA, D.; HAKIM, E. H. Single Production of Kojic Acid by *Aspergillus flavus* and the Revision of Flufuran. **Molecules**, 24, 4200. 2019.
- OLIVEIRA, C. D.; BRAZ, L. T; SANTOS, J. M.; BANZATTO, D. A.; OLIVEIRA, P. R. Resistência de pimentas a nematóides de galha e compatibilidade enxerto/porta-enxerto entre híbridos de pimentão e pimentas. **Horticultura Brasileira** 27: 520-526. 2009.
- OLIVEIRA, C.M.; REGASINI, L.O.; SILVA, G.H.; PFENNING, L.H.; YOUNG, M.C.M.; BERLINCK, R.G.S.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A.R. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.4, n.2, p.93-96, 2011.
- PAUL, N. C.; DENG, J. X.; SHIN, K. S.; YU, S. H. Molecular and Morphological Characterization of Endophytic *Heterobasidion araucariae* from Roots of *Capsicum annuum* L. in Korea. **Mycobiology** 40(2) : 85-90. 2012.
- PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v.3, n.4, p.69-72, 2004.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 29, p. 32-37, 2002.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under Different Environmental Conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.49, n. 5 : pp. 705-711, September 2006.

PINHEIRO, E.A.A.; PINA, J. R.S.; FEITOSA, A. O.; CARVALHO, J. M.; BORGES, F. C.; MARINHO, P. S.B.; MARINHO, A. M.R. Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. **Rev Argent Microbiol.**;49(1):3-6. 2017.

QIN, S.; LI, J.; CHEN, H.H.; ZHAO, G.Z.; ZHU, W.Y.; JIANG, C.L. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, p.6176-6186, 2009.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.

RAHMAWATI, N.I.; SUNARVA, S.; RUMIDATUL, S. Exploration of potential bioactive compounds of endophytic microbial culture isolated from gall rust sengon (*Falcataria moluccana*). **Journal Pharm Res Sci** 10(11):156–169. 2018.

RAVINDRA, N. K.; SATISH, K. V.; ASHISH, M.; SURENDRA, K. G.; VIJAY, K. S.; TALAT, A.; ANUJ, K. Assessment of diversity, distribution and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from a medicinal plant *Adenocalymma alliaceum* Miers. **Symbiosis** 55:39–46. 2011.

RAYBAUDI-MASSILIA, R.; SUÁREZ, A. I.; ARVELO, F.; ALEXANDRA, Z.; SOJO, F.; CALDERÓN-GABALDÓN, M. I.; MOSQUEDA-MELGAR, J. Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Red Sweet Pepper (*Capsicum Annuum* L. var. Llaner_on) Extracts: In Vitro Study. **International Journal of Food Studies**. Vol 6, 222-231. October 2017.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Org.) *Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Editora da Embrapa. p. 113. 2000.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C. HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Editora da Embrapa. p. 200. 2008.

RIBEIRO, C.S.C.; CRUZ, D.M.R. Tendências de mercado. **Cultivar** HF, RS, p.16-19, jun./jul., 2002.

RIQUELME, N.; MATIACEVICH, SILVIA. Characterization and evaluation of some properties of oleoresin from *Capsicum annuum* var. cacho de cabra. **Journal of Food**, 2016.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlim, v. 40, p. 261-267, 2000.

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

SANTOS, S. N. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga**. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 183 p. 2012.

SANTOS, V. A. Q.; NUNES, K. M.; CRUZ, C. H. G. Extraction and Antimicrobial Evaluation of Capsaicinóides Obtained of Pepper *Capsicum* sp. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 34, n. 2, jul./dez. 2016.

SARTORI, S. B. **Potencial Metabólico de Fungos Endofíticos de Plantas do Gênero *Anthurium* da Ilha de Altrazes**. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 219 p. 2016.

SEN, NABARUN.; PAUL, D.; SINHA, S. N. *In vitro* antibacterial potential and phytochemical analysis of three species of chilli plant. **Journal Chemistry Pharmacology**. Res., 8(2):443-447. 2016.

SHIRLING, E. B., GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 16(3): 313-340, 1966.

SHOKOOHI, G.R.; ANSARI, S.; ABOLGHAZI, A.; GRAMISHOAR, M.; NOURIPOUR-SISAKHT, S.; MIRHENDI, H.; MAKIMURA, K. The first case of fingernail onychomycosis due to *Neoscytalidium novaehollandiae*, molecular identification and antifungal susceptibility. **Journal de Mycologie Médicale** 30. 2020.

SILVIA, P. T.; ALBUQUERQUE, S.; SANTOS, C. W. V.; FRANCO, M.; CAETANO, L. C.; PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 562. **Bioresource Technology**, 270: 263-269, 2018.

SPECIAN, V.; ORLANDELLIA, R. C.; FELBERA, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILEA, J. A. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzido por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**. 16(4):345-51. 2014.

STAMFORD, T. L.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology** 83,105–109. 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, 67, 257-268. 2004.

SUNGTHONG, R.; NAKAEW, N. The genus *Nonomuraea*: A review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.55, n.5, p.554-565, 2014.

SURYAVAMSHI, G. L.; SHIVANNA, M.B. Diversity and Antibacterial Activity of Endophytic Fungi in *Memecylon umbellatum* burm. f.- a Medicinal Plant in the Western Ghats of Karnataka, India. **Indian Journal of Ecology** 47(1): 171-180. 2020.

TAKIKAWA, A.; ABE, K.; YAMAMOTO, M.; ISHIMARU, S.; YASUI, M.; OKUBO, Y.; YOKOIGAWA, K. Antimicrobial activity of Nutmeg against *Escherichia coli* 0157. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 4: 3315-20. 2002.

TEJESVI, M.V.; MAHESH, B.; NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S.; KINI, K.R.; SUBBIAH, V., SHETTY, H.S. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1535-1540, 2005.

TOMITA, F. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. **Fungal Diversity** 14, 187–204. 2003.

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. **Fungal Diversity**, 67: 203–229. 2014.

UNTERSEHER, M.; REIHER, A.; FINSTERMEIER, K.; OTTO, P.; MORAWETZ, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. **Mycological Progress**, Munchen, v. 6, p. 201-212, 2005.

VELOSO, J.; PREGO, C.; VARELA, M. M.; CARBALLEIRA, R.; BERNAL, A.; MERINO, F.; DIAZ, J. Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. **Plant Biology** 16. 177–185. 2014.

VENIERAKI, A., DIMOU, M., KATINAKIS, P. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts Bioactive secondary. **Hell. Plant Prot. J.** 10, 51–66. 2017.

VENKATACHALAM, A.; THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T. S. Distribution and diversity of endophytes in seagrasses. **Fungal Ecology** 13, 60-65. 2015.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Endophytic mycoflora of bark, leaf and stem tissues of *Azadirachta indica* A Juss. from Varanasi, India. **Microbial Ecology**, 54, 119-125. 2007.

WANG, L.; REN, L.; LI, C.; GAO, C.; LIU, X.; WANG, M.; LUO, Y. Effects of endophytic fungi diversity in different coniferous species on the colonization of *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). **Scientific Reports** . 9:5077. 2019.

WANG, L.W.; XU, B.G.; WANG, J.Y.; SU, Z.Z.; LIN, F.C.; ZHANG, C.L.; KUBICEK, C.P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.93, p.1231-1239, 2012.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology** 73: 115–180. 2012.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, p. 315–322. 1990.

WONG, C.; PROKSCH, P.; TAN, L. T.; LIHAN, S.; MUJAHID, A.; MULLER, M. Isolation, Identification and Screening of Antimicrobial Properties of the Marine-Derived Endophytic Fungi from Marine Brown Seeweed. **Microbiology Indonesia**. 2015.

XIA, Y.; SAHIB, M. R.; AMNA, A.; OPIYO, S. O.; ZHAO, Z.; GAO, Y. G. Culturable endophytic fungal communities associated with plants in organic and conventional farming systems and their effects on plant growth. **Scientific Reports**. 9:1669. 2019.

YENN, T. W.; RING, L. C.; NEE, T. W.; KHAIRUDDEAN, M.; ZAKARIA, L.; IBRAHIM, D. Endophytic *Diaporthe* sp. ED2 Produces a Novel Anti-Candidal Ketone Derivative. **Journal Microbiology Biotechnology**. 27(6), 1065–1070. 2017.

YODSING, N. ; KANOKMEDHAKUL, S. ; MONGKOLTHANARUK, W.; AIMI T.; SRISAPOOMI, T.; BOONLUE, S. Diversity of Endophytic Fungi Isolated from Thai Medicinal Plants (*Casearia grewiifolia*) in Khon Kaen, Thailand, and Their Bioactive Compounds. **Chiang Mai J. Sci.**; 45(1) : 45-59. 2018.

YADAV, RAJNISH. Characterization of thermostable and alkalitolerant cellulase from endophytic fungus *Bartalinia* sp. Masters dissertation, 63pg. Thapar University. 2013.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, Oxford, v.93, n.6, p.1051-1056, 2013.

ZHAO, DONG-LIN.; WANG, D.; TIAN, XUE-YING.; CAO, F.; LI, YI-QIANG.; ZHANG, CHENG-SHENG. Anti-Phytopathogenic and Cytotoxic Activities of Crude Extracts and Secondary Metabolites of Marine-Derived Fungi. **Mar. Drugs**, 16, 36; 2018.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, p. 1529–1530, 2000.