UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À ESPÉCIES DE PIPERACEAE

Bolsista: Aglison Silva Gondim, FAPEAM

ITACOATIARA
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB–E/0021/2011

ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À ESPÉCIES DE PIPERACEAE

Bolsista: Aglison Silva Gondim, FAPEAM
Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Camila Martins de Oliveira

ITACOATIARA
2012

RESUMO

Este trabalho descreve pela primeira vez o isolamento de doze fungos endofíticos das folhas de *Piper tuberculatum* realizado entre Setembro de 2011 a Maio de 2012. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas em um dado momento sem causa aparente, mantendo uma relação que pode ser neutra, mutualística ou patogênica. Estudos realizados nos últimos anos apontam que estes microrganismos, em associação com espécies vegetais, são importantes fontes de novas substâncias biologicamente ativas. A espécie hospedeira selecionada para isolamento destes microrganismos pertence à família Piperaceae identificada como *Piper tuberculatum*, na medicina popular, é utilizada como sedativo e antídoto para mordidas de cobras. As culturas fúngicas associadas a esta espécie foram isoladas utilizando o procendimento citado por Mayer *et al*. (1997) que consistiu na imersão em álcool 70% (1 minuto), NaClO 1% (4 minutos) e novamente em álcool 70% (1 minuto), seguida de dupla lavagem em água estéril (3 minutos cada). Posteriormente o material vegetal foi inserido em meio de cultura sólido contendo batata, dextrose, ágar e antibiótico. O plaqueamento da última água de lavagem foi realizado para verificação da eficiência da esterilização superficial do material vegetal. Os inóculos foram mantidos em incubadora a 30,1 °C e periodicamente avaliados visualmente quanto ao desenvolvimento do micélio, repiques sucessivos foram realizados até a obtenção de linhagens puras. Os doze fungos endofíticos isolados apresentaram diferentes tonalidades de micélio como branco, verde escuro, verde claro e marrom claro. Estas linhagens fúngicas foram preservadas em água destilada estéril.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, Piperaceae, *Piper tuberculatum*.

ABSTRACT

This work describes for the first time the isolation of twelve endophytic fungi from *Piper tuberculatum*´s leaves in the period to September of 2011 to May of 2012. Endophytic are microorganisms that inhabit in internal plants at a given moment cause less apparent, maintaining a relationship that can be neutral, mutualistic or pathogenic. Studies accomplished in the last years appear that these microorganisms, in association with vegetable species, are important sources of new substances biologically active. The host specie selected for isolation of these microorganisms belongs to Piperaceae family, it was identified like *Piper tuberculatum*, in popular medicine, it is used as sedative and antidote for bitten of snakes. The fungi cultures associated in this specie was isolated using the methodology mentioned by Mayer et al. (1997) that consisted in the immersion in alcohol 70% (1 minute), NaClO 1% (4 minutes) and again in alcohol 70% (1 minute), it following by a couple wash in sterile water (3 minute each). After that, the vegetable material was inserted in solid middle of culture containing potato, dextrose, agar and antibiotic, this last wash water was inoculated for efficiency verification of the sterilization superficial vegetable material. The cultures were maintained in incubator to 30.1 °C and periodically evaluated visually for mycelium development, successive chimings were accomplished until obtaining of pure lineages. The twelve endophytics fungi isolated presented different mycelium shades with white coloration, dark green, clear and brown green clear. These fungi were preserved in water distilled sterile.

Key-words: Endophytic fungi, Piperaceae, *Piper tuberculatum.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Taxol, metabólito secundário isolado de fungo endofítico..... 08

Figura 02 - Folhas de *Piper tuberculatum*..... 14

Figura 03 - Fungos endofíticos preservados em água destilada estéril..... 16

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Fungos endofíticos isolados das folhas de *Piper tuberculatum*..... 15

SUMÁRIO

RESUMO..... 02
ABSTRACT..... 03
LISTA DE FIGURAS..... 04
LISTA DE TABELAS..... 05
1. INTRODUÇÃO..... 07
2. REVISÃO DA LITERATURA..... 08
2.1 Fungos endofíticos 08
2.2 Associações entre seres vivos..... 09
2.3 Modos de transmissão..... 10
2.4 Fungos endofíticos isolados de algumas espécies vegetais..... 10
2.5 A família Piperaceae..... 12
2.6 A espécie *Piper tuberculatum*..... 13
2.7 Fungos endofíticos de Piperaceae..... 13
3. OBJETIVOS DO PROJETO..... 13
4. METODOLOGIA..... 13
4.1 Coleta e identificação do material vegetal..... 13
4.2 Procedimentos para isolamento de cepas fúngicas..... 14
5. RESULTADOS 15
6. CONCLUSÃO..... 17
7. REFERÊNCIAS..... 18

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas em um dado momento sendo encontrados em todos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes, podendo ser bactérias e fungos que não causam de imediato nenhum efeito negativo ao vegetal, tendo provado ser uma fonte rica de produtos naturais bioativos (GUO *et al*., 2008; SUN *et al*.,2011).

A busca por condições mais favoráveis de convivência em associação com outros seres vivos é bastante difundida na natureza (GILBERT e HAZARD, 2011). Na associação mutualística entre plantas e fungos; o fungo recebe abrigo e nutrição, em troca a planta pode ter sua capacidade competitiva aumentada, o que facilita a colonização e adaptação a ambientes severos com poucos recursos, ou seja, aumentam a sua resistência contra fatores bióticos e abióticos (HARTLEY e CANGE, 2008; AKELLO E SIKORA, 2012).

O mecanismo pelo qual o fungo beneficia e aumenta o desempenho do seu hospedeiro é através da excreção de metabólitos, como por exemplo, a resistência a herbivoria através da produção de alcalóides (GILBERT e HAZARD, 2011). Nas últimas décadas vários compostos foram isolados com propriedades anticânceres (STROBEL, *et al*., 1996), antibactericidas e antifúngicas (GUO, *et al*.,2008).

Na seleção das plantas hospedeiras, Strobel e Daisy (2003) afirmam que para uma melhor chance de isolamento de cepas endofíticas, as plantas devem ser selecionadas principalmente por apresentarem um histórico etnobotânico e crescer em regiões de alta biodiversidade.

A família Piperaceae é constituída dos gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia* e *Pothomorphe* (KOROISHI *et al*.,2010), das substâncias já isoladas e testadas destes gêneros, destacam-se as com propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antifúngicas, antiasmáticas, antimicrobianas, antipiréticas, diuréticas e alucinógenas (KOROISHI *et al*., 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos endofíticos

A palavra endofítico se refere a microrganismos que habitam o interior de plantas em algum momento do seu ciclo de vida desempenhando relevante função para a sanidade do seu hospedeiro (SCHULZ e BOYLE, 2005), neste aspecto os fungos mereceram destaque nos últimos anos por produzirem metabólitos secundários farmacologicamente ativos com grande potencial biológico e industrial (SALLEN *et al.* 2011; SANTIAGO *et al.* 2012).

Dados da literatura mostram que no estudo de fungos endofíticos associados a plantas já se obteve um número significante de novos compostos isolados que compreendem 51%, sendo 80% dos extratos ativos em diversos ensaios biológicos (YANG, *et al.* 2011). Destes extratos foram isolados alcalóides, terpenóides, flavonóides, triterpenos, lactonas, compostos fenólicos, esquiterpenos, esteróides, quinonas, furandianos, taxanos (Fig. 1 p.8), etc (GUO *et al.*, 2008; KHAN, *et al.* 2012).

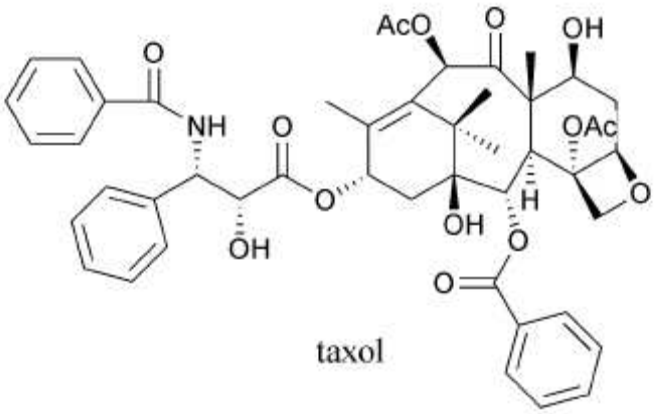


Figura 01 – Taxol, metabólito secundário isolado de fungo endofítico.

Fonte: YANG, *et al.* 2011.

A diversidade de novas estruturas e moléculas bioativas de fungos endofíticos é evidente (Ming *et al.* 2012). Estudos mostraram a produção de tanshinona I e tanshinona IIA pelo fungo de endofítico *Trichoderma atroviride* isolado pela primeira vez das raízes da

planta medicinal *Salvia miltiorrhiza*, indicando o potencial biológico e industrial significante deste microrganismo endofítico.

2.2 Associações entre seres vivos

Os fungos não produzem clorofila (são heterotróficos), então, em alguns casos sua sobrevivência depende do sucesso da associação com outros seres vivos, especialmente as plantas ou de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente (HARTLEY e CANGE, 2008).

Neste aspecto, as interações endófitico-planta, ainda não são muito bem compreendidas e têm sido investigadas. No entanto, podem ser caracterizadas por um equilíbrio entre a virulência fúngica e defesa da planta (CHAGAS, 2010).

Quando esta relação pode benéfica, tanto para o microrganismo como para a planta, é chamada de simbiose. Termo empregado por Bary (1879) para distinguir dos microrganismos patogênicos (RODRIGUÊS *et. al* ,2009; WANG, *et al*., 2012).

Estudos de Hartley e Cange (2008) sobre os impactos da interação simbiôntica de plantas e fungos em herbívoros, insetos e outros micróbios patogênicos, mostram que tais interações podem ser neutras, positivas, ou negativas (HARTLEY e CANGE, 2008; OLIVEIRA, *et. al.* 2011).

A interação pode ser positiva atribuindo uma vantagem competitiva em cima de outras plantas, pois tais fungos produzem substâncias tóxicas aos herbívoros da planta hospedeira podendo produzir as mais diversas moléculas naturais biologicamente ativas (WIJERATNE *et al.*, 2008).

No entanto, se o equilíbrio planta/microrganismo é perturbado sob condições de estresses bióticos ou abióticos, essa relação pode ser alterada tornando – se um fitopatógeno para o hospedeiro (CHAGAS, 2010; SCHULZ *et al*., 2005). Álvarez-loayza *et al*. (2011) investigaram o efeito abiótico entre o fungo endofítico *Diplodia mutila* e espécie vegetal

Iriartea deltóide, o estudo mostrou a patogenicidade, na qual a variação de luz induzia a produção de H_2O_2 pelo fungo que ativava hipersensibilidade e morte das células do tecido vegetal.

Um exemplo onde à relação simbiôntica é de vital importância para o hospedeiro, são as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que formam nódulos em raízes e os fungos micorrízicos cujas hifas aumentam a absorção e solubilização de fosfatos insolúveis e de enxofre presentes na terra aumentando a nutrição dos seus hospedeiros (KUMAR *et al*., 2012).

2.3 Modos de transmissão

A diversidade de fungos endofíticos em uma planta pode ser muito alta podendo habitar em todas as partes da sua hospedeira, mas, usualmente habitam suas partes aéreas como caules e folhas e podem ter mais de 100 espécies de fungos associados em apenas uma parte do tecido vegetal (ANGELINI *et al.* 2012).

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de forma horizontal: a infecção do hospedeiro é através dos esporos que estão envolvidos na dispersão e sobrevivência deste podendo ter reprodução sexuada ou assexuada; vertical: no qual a passagem dos fungos endofíticos de certo hospedeiro dar-se através de geração em geração através das sementes da planta (DAVITT *et al.*, 2011; HARTLEY e CANGE, 2008).

2.4 Fungos endofíticos isolados de algumas espécies vegetais

A investigação e busca por metabólitos secundários potencialmente bioativos é continua em endofíticos de planta (CHENG *et al.* 2012). Recentemente foi isolado da planta medicinal *Cinnamomum sp.* o fungo endofítico *Annulohypoxylon squamulosum* BCRC 34022, das folhas de *Garcinia hombroniana,* o fungo endofíticos *Guignardia bidwellii*.

Krohn *et al.* (2011) isolaram do arbusto *Viburnum tinus* o fungo endofítico *Cryptosporiopsis sp*; Meng *et al.* (2011) isolaram da *Fagonia cretica,* planta do semi – árido e regiões litorais de Gomera na Espanha, o fungo endofítico *Penicillium chrysogenum.*

Xing *et al*. (2011) isolaram 53 fungos endofíticos de uma das grandes famílias de plantas Orchidaceae, extensamente utilizada na medicina tradicional chinesa para curar cataratas, inflamação de garganta, e desordens de sistema digestivas.

Estudos de Pandi *et al*. (2011) informaram também a obtenção cepas endofíticas *Lasiodiplodia theobromae* associadas a folhas da planta medicinal *Morinda citrifolia*.

Pesquisas de Cui *et al.* (2012) sobre metabólitos biologicamente-ativo, informaram o isolamento de 27 fungos endofíticos de 6 gêneros diferentes, sendo o de maior relevância o *Fusarium oxysporum* associados a planta medicinal *Ginkgo biloba*.

Outros fungos endofíticos com grande potencial biológico são isolados e descritos continuamente na literatura (LIN *et al*. 2011; SULTAN *et al*., 2011; SILVA *et al*. 2010; WANG, 2012; WANG *et al*, 2012; SUN *et al*., 2012), como por exemplo, SUN *et al*. (2011) obtive cepas endofiticas *Trichoderma atroviride* associados a *Cephalotaxus fortunei*, e os fungos endofíticos *Xylarialean sp*. associados a *Annona squamosa L*. descritas em Liu *et al.* (2011).

Em estudos sobre a habilidade de microrganismos em biotrasnformação Fu *et al.* (2011) isolaram o endofítico *Umbelopsis isabellina* associado a planta medicinal *Huperzia serrata* utilizada no tratamento de Alzheimer.

H.-Y. Li *et al.* (2012) estudando espécies de plantas, *Arabis hirsuta, Acacia decurrens, Symplocos paniculata, Rabbosia eriocalyx, Arenaria serpyllifolia* e *Rosa longicuspis,* em regiões com concentrações alta de metais, isolaram destas 495 endofíticos nos quais *Phoma*, *Alternaria* e *Peyronellaea* foram os gêneros dominantes.

Estes estudos nos mostram a grande diversidade de fungos endofíticos encontrados em diversas espécies vegetais.

2.5 A família Piperaceae

A família Piperaceae consiste de gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia* e *Pothomorphe* (KOROISHI, *et al.*, 2010), membros desta família ocorrem ao longo do trópicos de ambos os hemisférios concentradas principalmente na América Latina e na Malásia (SOUZA *et al.*, 2009).

Segundo Awaad, *et. al.* (2012) um número grande de plantas medicinais com potencial terapêutico tem sido investigadas cientificamente com resultados promissores, nesse sentido, a família Piperaceae é bastante conhecida (SOUZA *et al.* 2009) tanto por suas propriedades terapêuticas, quanto por seu produto comercial mais familiar, a pimenta, sendo feita a partir da pulverização dos frutos de *Piper nigrum* L., um dos temperos mais populares no mundo (ARAVIND, *et al.*2010). Outras espécies de *Piper* como *P. betle* L., *P. methysticum* G. Forst., e *P. cubeba* L. F., também são muito utilizadas na culinária.

Na medicina popular, as espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) são bastante utilizadas para o tratamento de muitas doenças, sendo relatados na literatura alcalóides isolados com propriedades analgésicas, antiinflamatórias, antitumorais, antioxidantes, antidepressivas, inibidoras de acetiltransferase, do colesterol, além de atividade antimicrobiana (CARRARA, *et al.* 2012).

Recentemente Sauter *et al.* (2012) investigaram o óleo essencial de *Piper hispidinervum* que mostrou atividade antiprotozoária contra *A. polyphaga*.

Carrara, *et al.* (2012) isolou de *Piper amalago* L. alcalóides com atividade de antileishmania; Zacaroni, *et al.*(2009) avaliou atividades fungitóxicas *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Piper hispidinervum* sobre os fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum.*

Devido a grande diversidade de fungos endofíticos (KOROISHI *et al.*, 2010), vários estudos fitoquímicos são continuamente descritos na literatura, o que permitiram o isolamento de fenilpropanóides, lignanas/neolignanas, pironas, amidas, alífáticas e aromáticas, alcalóides, policetídeos e cromenos, além de outros metabólitos de biossíntese mista (ALVES *et al.*, 2010,2011; BALDOQUI *et al.*,2009; KOROISHI *et al.*, 2010; SANTOS *et al*., 2010).

2.6 A espécie *Piper tuberculatum*

Pesquisas de Junior- Araujo, *et al*. (1997) sobre *Piper tuberculatum*, espécie bastante conhecida popularmente como pimenta de d'arda e utilizada no estado da Paraíba como um sedativo e antídoto para mordida de cobra isolaram piperidinas, piperdardinas. Das folhas e sementes Silva, *et al*. (2002) isolaram amidas com propriedades antifúgincas.

2.7 Fungos endofíticos de Piperaceae

Os trabalhos publicados envolvendo fungos endofíticos de Piperaceae limitam-se a espécie *Piper aduncum*. Da cultura de *Xylaria* sp foram isolados citocalasinas que apresentaram atividade antifúngica e citotóxica (SILVA *et al*. 2010), não foram encontrados na literatura endofíticos isolados de *Piper tuberculatum*.

3. OBJETIVOS DO PROJETO

- Isolamento dos fungos endofíticos de espécie da família Piperaceae;
- Identificação destes microrganismos;

4. METODOLOGIA

4.1Coleta e identificação do material vegetal

As folhas saudáveis da espécie *Piper tuberculatum* (Fig. 2, p.14) foram coletadas nos meses de Agosto, Novembro de 2011, Janeiro e Março de 2012 nos arredores da cidade de Itacoatiara e identificada pela botânica MSc. Welma Sousa Silva do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia.

Figura 02 – Folhas de *Piper tuberculatum*

Fonte: O autor

4.2 Procedimentos para isolamento de cepas fúngicas

O Material vegetal coletado foi lavado com sabão em água corrente. O meio utilizado para cultivo foi batata, dextrose e ágar (BDA) preparado três dias antes da inoculação, utilizando-se 9,75g de meio e 250ml de água destilada, autoclavados a 120°C durante 20 min. Posteriormente foi adicionado antibiótico (Gentamicina) na concentração 155ug/mL para evitar o crescimento bacteriano.

De acordo com metodologia descrita por Maier *et al*. (1997) para isolamento dos fungos endofíticos, as folhas foram imersas em etanol 70% (1 minuto), NaClO 1% (4 minutos) e novamente em etanol 70% (1 minuto), seguida de dupla lavagem em água estéril (3 minutos cada). A água da segunda lavagem foi plaqueada para verificação da presença de fungos remanescentes que não fossem endofíticos. A folha foi então cortada assepticamente com o auxílio de pinça e bisturi em fragmentos pequenos próximos a chama e inseridos em placas de petri contendo o meio de cultura.

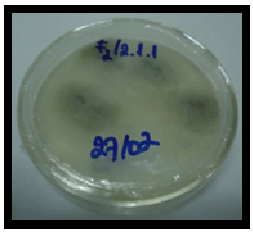
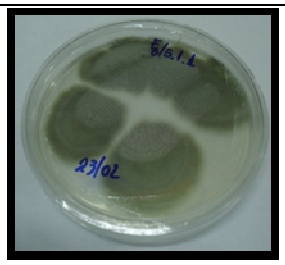
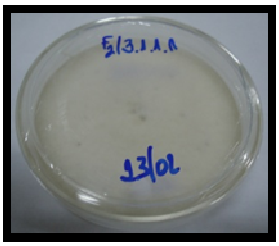
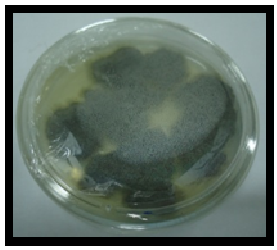
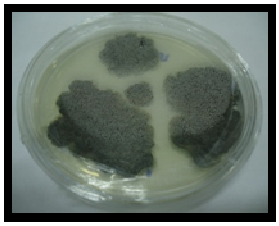
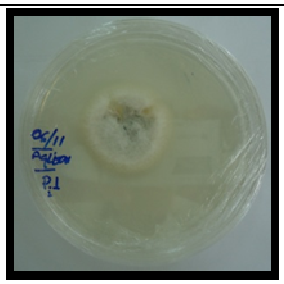
Os meios com os inóculos foram mantidos em incubadora a 30,1 °C e periodicamente avaliados visualmente quanto ao desenvolvimento do micélio, sendo seu crescimento

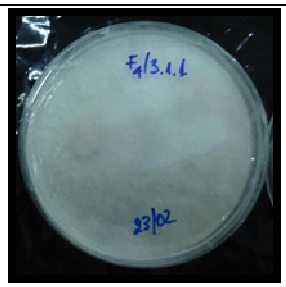
monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção de linhagens puras, que foram preservadas em água destilada estéril (*Castelani*).

5. RESULTADOS

Utilizando –se o procendimento citado por Mayer *et al*. (1997), obteve-se pela primeira vez o isolamento de doze fungos endofíticos associados a *Piper tuberculatum* codificados conforme tabela 01, onde PT = *Piper tuberculatum.*

Tabela 01 - Fungos endofíticos isolados das folhas de *Piper tuberculatum.*

Fungo	**Foto**	**Fungo**	**Foto**
PT-01		PT-06	
PT-02		PT-07	
PT-03		PT-08	
PT-04		PT-09	

PT-05		PT-10	
PT-11		PT -12	

Os fungos endofíticos obtidos são filamentosos e apresentaram grande diversidade morfológica, incluindo coloração do micélio. Os fungos isolados foram preservados em água destilada (Fig. 03, p. 16).

Figura 03 – Fungos endofíticos preservados em água destilada estéril.

Fonte: O autor

As linhagens isoladas encontram-se em processo de identificação sob a responsabilidade do Prof. Dr. André Rodrigues da Universidade Estadual Paulista – UNESP. A demora na identificação foi devido a problemas ocorridos no próprio laboratório do Prof. André, problemas estes, ainda não solucionados por completo, o que atrasou a identificação, apesar das linhagens já se encontrarem em seu poder.

6. CONCLUSÃO

O trabalho de isolamento dos fungos endofíticos de folhas de *Piper tuberculatum* conduziu ao isolamento de doze linhagens fúngicas. A avaliação prévia das características macroscópicas de cada fungo endofítico, no qual estão em processo de identificação, possibilitou detectar a grande diversidade colonial encontrada nas folhas da planta hospedeira.

7. REFERÊNCIAS

ANGELINI, P. P.; RUBINI, A.; GIGANTE, D.; REALE, L. P. R.; VENANZONI, R. The endophytic fungal communities associated with the leaves and roots of the common reed (Phragmites australis) in Lake Trasimeno (Perugia, Italy) in declining and healthy stands. **Fungal Ecology**, doi:10.1016/j.funeco.2012.03.001, 2012.

ALVES, H. S.; OLIVEIRA, G. E. Z.; MARIA, G.; CHAVES, M. C. O. Flavonóides de *Piper carniconnectivum* C.D.C. Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v. 20, n.2, p. 160-164, 2010.

Á LVAREZ-LOAYZA, P.; JÚNIOR, J. F. W.; TORRES, M. S.; BALSLEV, H.; KRISTIANSEN, T.; SVENNING, J-C.; GIL, N. Light Converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and niche-space filling of a common tropical tree, *Iriartea deltoidea*. **PLoS ONE**, v.6, n.1, 2011.

AKELLO, JULIET; SIKORA, RICHARD. Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on acyrthosiphonpisum and aphis fabae offspring development and reproductive fitness. **Biological Control**, v. 61, p. 215–221, 2012.

ALVES, H. S.; SOUZA, M. F. V.; CHAVES, M. C. O. Three New Compounds from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.22, n.8, p.1610-1615, 2011.

ARAVIND, R.; EAPEN, S. J.; KUMAR, A.; DINU, A.; RAMANA, K.V. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis Thorne*) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Crop Protection**, v. 29, p. 318–324, 2010.

BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.

CUI, Y.; YI, D.; BAI, X.; SUN, B.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from *Ginkgo biloba*. **Fitoterapia**, doi:10.1016/j.fitote.2012.04.009, 2012.

CARRARA, V. S.; SERRA, L. Z.; LÚCIO, C-F.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; CORTEZ, D. A. G. HPLC analysis of supercritical carbon dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalago* L. with antileishmanial activity. **Molecules**, v.17, p.15-33, 2012.

CHENG, M.-J.; WU, M.-D.; YUAN, G.-F.; CHEN, Y.-L.; SU, Y.-S.; HSIEH, M.-T.; CHEN, I.-S. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the endophytic fungus *Annulohypoxylon squamulosum*. **Phytochemistry Letters,** v. 5, p. 219–223, 2012.

CHAGAS, F.O. **Utilização de culturas mistas como estratégias para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos**. 2010. 140f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

DAVITT, A. J.; CHEN, C.; RUDGERS, J. A.Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.137–145, 2011.

FU, S.-B.; YANG, J.-S.; CUI, J.-L.; FENG, X.; SUN, D.-A. Biotransformation of ursolic acid by an endophytic fungus from medicinal plant *Huperzia serrata.* **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 9, p. 1180 -1182,2011.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.44, n.2, p.136–142, 2008.

GUNDEL, P.E.; GARIBALDIL A.; MARTÍNEZ-GHERSA, M.A.; GHERSA, C.M.. Trade-off between seed number and weight: Influence of a grass–endophyte symbiosis. **Basic and Applied Ecology**, v. 13, p.32–39, 2012.

GILBERT, A.; HAZARD, L. Endophyte infection of Festuca eskia enhances seedling survival to drought and cutting at the expense of clonal expansion. **Journal of Plant Ecology**. v. 4, n. 4, p. 201–208, 2011.

H.-Y, L.; LI , D.-W.; HE, C.-M.; ZHOU, Z.-P.; MEI, T.; XU, H.-M. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb e Zn mine wasteland in China. **Fungal Ecology**, v. 5, p. 3 0 9 -3 1 5, 2012.

HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context**. Annual Review of Entomology,** v. 54, p. 323–42, 2009.

JUNIOR- ARAUJO, J. X.; DA-CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C.; GRAY, A. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum.* **Phytochemistry**.v. 44, n. 3, p. 559-561, 1997.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S.. Production of amylase and chlamydospores by Piriformospora indica, a root endophytic fungus . **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 124 - 128, 2012.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; HUSSAIN, J.; KANG, S.-M.; LEE, I.-J. The newly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin. **Molecules**, v. 17, p. 1103-1112, 2012.

KOROISHI, A. M.; SEHN, E.; BAESSO, M. L.; NAKAMURA,T. U.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ , D. A. G. ; BENEDITO, P. D. F .Antifungal activity and nail permeation of nail lacquer containing *Piper regnellii* (Miq.) C. CD. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae) leave extracts and derivatives. **Molecules**, v.15, p. 3920-3931, 2010.

KROHN, K.; SALEEM, M.; HUSSAIN, H.; AHMED, I.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; MEIER, K.; STEINERT, M.; PESCITELLI, G.; KURTÁN, T.; FLÖRKE, U. Viburspiran, an antifungal member of the octadride class of maleic anhydride natural products. **European Journal Organic Chemistry**, p. 808 – 812, 2011.

LIU, L.; BRUHN, T.; GUO, L.; GÇTZ, D. C. G.; BRUN, R.; STICH, A.; CHE, Y.; BRINGMANN, G. Chloropupukeanolides C–E: Cytotoxic pupukeanane chlorides with a spiroketal skeleton from *Pestalotiopsis fici.* **Chemistry a European Journal**, v.17, p.2604 – 2613, 2011.

LIN, T.; LIN , X.; LU, C.-H.; SHEN, Y.-M. Three New triterpenes from *Xylarialean* sp. A45, an endophytic fungus from *Annona squamosa* L. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, p.301–305, 2011.

MAIER, W.; HAMMER, K.; DAMMANN , U.; SCHULZ, B. ; DIETER, S. Acumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the *Poaceae.* **Planta**, v.202, p.36-42, 1997.

MING, Q.; HAN, T.; LI, W.; ZHANG, Q.; ZHANG, H.; ZHENG, C.; HUANG, F.; RAHMAN, K.; LUPING, Q. Tanshinone II A and tanshinone I production by *Trichoderma atroviride* D16, an endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 330 – 333, 2012.

MENG, L.; SUN, P.; TANG, H.; LI, L.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; ZHANG, W.; YI, Y. Endophytic fungus *penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.39, p.163–165, 2011.

OLIVEIRA, C. M.; REGASINI, L. O.; GERALDO, H. S.; 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**, v. 4, p. 93 – 96, 2011.

PANDI, M.; KUMARAN, R. S.; CHOI, Y.-K.; KIM, H. J. ; MUTHUMARY, J. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia.* **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.8, p.1428-1435, 2011.

SALLEN, M.; HUSSAIN, H.; AHMED, I.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; MEIER, K.; STEINERT, M.; PESCITELLI, G.; KURTÁN, T.; FLÖRKE, U.; KROHN , K. Viburspiran, an antifungal member of the octadride class of maleic anhydride natural products. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 808–812, 2011.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; ALBIERO, A. L. M.; IWAZAKI, M. C.; OLIVEIRA, J. H. G.; ROSA, S. M. Vegetative propagation in Piperaceae species. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 52, n.6, p.1357-1361, 2009.

SILVA, R. V.; NAVICKIENEA, H. M. D.; KATOB, M. J.;BOLZANIA, V. S.; ME´DAC, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from Piper arboreum and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry** , v. 59, p. 521–527,2002.

SOMMART, U.; RUKACHAISIRIKUL, V.; TRISUWAN, K.; TADPETCH, K.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S. ; SAKAYAROJ, J. Tricycloalternarene derivatives from the endophytic fungus *Guignardia bidwellii* PSU-G11. **Phytochemistry Letters.,** v. 5, p.139–143, 2012.

SANTIAGO, C.; FITCHETT, C.; MUNRO, M. H. G.; JALIL, J.; SANTHANAM, J. Cytotoxic and antifungal activities of 5-hydroxyramulosin, a compound produced by an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollisimum.* **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,** 2012.

SANTOS, M. R. A.; SILVA, A. G.; LIMA, R. A.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; POLLI, A. R.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) . **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2, p.319-324, 2010.

SAUTER, I. P.; ROSSA, G. E.; LUCAS, A. M.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; SILVA, L. A. A.; ROTT, M. B.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; POSER, G. L. V. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 292– 295 2012.

SUN, P.-X.; ZHENG, C.-J.; LI, W.-C.; JIN, G.-L.; HUANG, F.; QIN, L.-P. Trichodermanin A, a novel diterpenoid from endophytic fungus culture. **Journal Natural Medicine**, v.65, p.381–384, 2011.

SUN, H.-F.; LI, X.-M.; MENG, L.; CUI, C.-M.; GAO, S.-S.; LI, C.-S.; HUANG, C.-G.; WANG, B.-G. Asperolides A−C, tetranorlabdane diterpenoids from the marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus wentii* EN-48**. Journal Nature Products**, v. 75, p. 148−152, 2012.

SULTAN, S.; SHAH , S. A. A.; SUN, L.; RAMASAMI, K.; COLE, A.; BLUNT, J.; MUNRO, H.G M.; WEBER, J. F. Bioactive fungal metabolites of 9PR2 Isolated from roots of *Callophyllum ferrugineum***. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.1, p.7-9, 2011.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biology Review**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v.109, n.6, p.661-686, 2005.

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

XING, Y.-M.; CHEN, J.; CUI, JI.-L.; CHEN, X.-M.; GUO, S.-X. Atimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Currente Microbiol**, v.62, p.1218–1224, 2011.

WANG, Y.; XU, L.; REN, W.; ZHAO, D.; ZHU, Y.; WU, X. Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 364– 368, 2012.

WANG, F-W. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp, an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. **Chinese Journal of Natural Medicines,** v. 10, p. 0072- 0076, 2012.

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 Microbial and Cell Physiology**, n. 93, p. 1231–1239, 2012.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides.* **Acta Amazonica**, v. 39, n.1, p. 193 – 198, 2009.