

1 Obtenção de extratos brutos bioativos a partir do cultivo de fungos endofíticos
2 associados a espécies de Piperaceae

3
4 ¹Aglison Silva GONDIM, ²Camila Martins de OLIVEIRA
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24
25 ^{1,2}Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET, UFAM, CEP 69100-000,
26 Itacoatiara-AM.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 Email: ¹aglison_ufam.qj@hotmail.com; ²camilacm@ufam.edu.br

48 Obtenção de extratos brutos bioativos a partir do cultivo de fungos endofíticos
49 associados a espécies de Piperaceae

50

51

52 **RESUMO**

53

54 Este trabalho descreve a obtenção de sete filtrados de fungos endofíticos

55 associados à *Piper tuberculatum*. As cepas endofíticas foram cultivadas em 200mL de

56 meio de batata dextrose (MDB) e mantidos estáticos em temperatura ambiente por 25

57 dias, após este período, os caldos foram separados dos micélios por filtração a vácuo

58 obtendo-se os filtrados. Posteriormente, foram pipetados 1mL de cada filtrado para um

59 frasco de vidro e levados ao banho-maria e dessecador até a secagem total dos filtrados.

60 Após estarem secos, os filtrados foram submetidos aos bioensaios frente a larvas de

61 *Aedes aegypti* e *Mycobacterium tuberculosis*. Para o ensaio inseticida, o

62 acompanhamento foi feito durante 72h após aplicação dos filtrados, para o ensaio

63 antimicrobiano utilizou-se microplaca com Alamar Blue como indicador de proliferação

64 celular. Os sete filtrados mostraram-se inativos nos dois ensaios.

65 **Palavras-chave:** Bioensaios, filtrados, *Piper tuberculatum*.

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75 Obtaining of bioactive extracts from endophytic fungi's cultivation associated from
76 species of Piperaceae.
77

78 **ABSTRACT**

79 This work describes the obtaining of seven endophytic fungi filtrates associated to *Piper*
80 *tuberculatum*. The stumps were cultivated in 200mL of liquid medium cultivation
81 potato dextrose (PDB), and maintained static under temperature 30 °C for 25 days, after
82 this period, broths were separated of mycelium for vacuum filtration obtained the
83 filtrate. It was take out 1mL of each filtrate to flask and put in desiccators and warm
84 water until the total drying of filtrates. After they were dry, filtrates were submitted to
85 bioassays front to larvae of *Aedes aegypti* and *Mycobacterium tuberculosis*. For the
86 insecticide bioassay, the attendance was made during 72:00 after filtrates application,
87 for the antimicrobial assay, was used Microplate with Alamar Blue as an indicator of
88 cell proliferation. The seven filtrates were shown inactive in two bioassays.

89 **Key-words:** Bioassay, filtrates, *Piper tuberculatum*.

90

91

92 **1. INTRODUÇÃO**

93 A natureza de um modo geral é responsável pela produção da maioria das
94 substâncias orgânicas bioativas conhecidas. Os microorganismos nesse sentido vêm
95 recebendo atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores da área de
96 produtos naturais, por ser uma potencial fonte de substâncias bioativas com padrões
97 moleculares novos e originais, com aplicações que incluem antibióticos, tratamento
98 anticâncer, controle biológico e outros (Viegas et al. 2006; Abrahão et al. 2013).

99 Por milhares de anos, as plantas medicinais tiveram um papel significativo no
100 tratamento de uma gama extensiva de condições médicas, como por exemplo, as

101 doenças infecciosas. Os efeitos complexos dessas drogas de origem natural na saúde são
102 causados através de interações múltiplas entre enzima e o receptor do organismo além
103 da complexa mistura de metabólitos bioativos no produto natural extraído (Gonda et al.
104 2013).

105 Até recentemente, acreditava-se que a variabilidade de metabólitos encontrados
106 nas plantas medicinais vinha apenas do metabolismo vegetal, a contribuição
107 microbiológica era pouco investigada (Gutierrez et al. 2012). Porém, nas últimas
108 décadas vários estudos têm mostrado o potencial dos metabólitos secundários bioativos
109 obtidos de culturas microbiológicas endofíticas (Radic e Strukelj, 2012).

110 Os microrganismos endofíticos nesse âmbito se referem às bactérias e fungos
111 que podem ser detectados em um determinado momento vivendo dentro do tecido da
112 planta hospedeira (Sun et al. 2011; Gutierrez et al. 2012).

113 Os fungos endofíticos são em sua grande maioria fungos filamentosos,
114 heterotróficos e sua relação ecológica com a respectiva planta hospedeira é complexa
115 (Souza, A. et al. 2004; Yong-Cheng Li e Wen-Yi Tao, 2009). Estudos que investigaram
116 tais interações utilizaram um número limitado de plantas e espécies de fungos, no
117 entanto os mecanismos desta relação ainda permanecem indefinidos (Mugerwa et al.
118 2013).

119 O que pode ser percebido nesta relação é que há um equilíbrio entre a planta e o
120 fungo, se esse equilíbrio é perturbado sob condições de estresses ambientais essa
121 relação pode ser alterada tornando o fungo um fitopatógeno para o seu hospedeiro
122 (Álvarez-Loayza et al. 2011).

123 Mais de 100 anos de pesquisas sugerem que em ecossistemas naturais a
124 interação com fungos endofíticos e/ ou fungos micorrízicos e a planta/hospedeiro na

125 maioria das vezes é simbiótica (Rodriguez et al. 2008). Este termo, simbiótico, foi
126 primeiramente descrita por Bary 1879, que significa: ‘o vivendo junto de organismos
127 dissimilares’.

128 Nesse sentido, há evidência crescente da importância simbiótica microbiana
129 entre planta e micróbio que pode influenciar as comunidades ecológicas daquele
130 ambiente, já que em um ecossistema é de vital importância as associações entre os seres
131 vivos e estas associações simbióticas conferem a ambos os organismos diversas
132 vantagens de adaptações e tolerâncias ao meio abiótico e biótico em que estão inseridos
133 (Gonda et al. 2013).

134 Uma das vantagens dessa associação que o consenso literário indica, é que a
135 planta hospedeira fornece abrigo e nutrientes para o fungo, enquanto que o fungo
136 endofítico beneficia e aumenta o desempenho da sua hospedeira através da excreção de
137 metabólitos secundários como, por exemplo, através da produção de várias classes de
138 estruturas químicas como alcalóides, que promovem a resistência a herbivoria,
139 esteróides, terpenóides, isocumarinas, quinonas, fenóis (Jiao et al. 2013) que podem
140 inibir ou matar patógenos invasores (Gilbert e Hazard, 2011; Mugerwa et al. 2013).

141 Os fungos endofíticos possuem dois modos de transmissão, podem ser
142 transmitidos de forma vertical, ou seja, de uma geração para outra através das sementes
143 infectadas ou de forma horizontal através de esporos (Davitt et al. 2011; Xiang Tan et
144 al. 2006).

145 Dos endofíticos associados a plantas recentemente informados já se obteve um
146 número significativo de extratos ativos em diversos ensaios biológicos com centenas de
147 classes de estruturas de produtos naturais (Guo et al. 2008; Jiao et al. 2013), que podem

148 ser usados direto ou indiretamente como agentes terapêuticos contra numerosas
149 doenças.

150 Estudos também apontam que os fungos endofíticos são capazes de mimetizar a
151 química de seus respectivo hospedeiros e produzir substâncias com maior bioatividade
152 (Kusari et al. 2012), como por exemplo, Pandi et al. (2011) informaram a obtenção de
153 taxol por cepas endofíticas *Lasiodiplodia theobromae* associadas a folhas da planta
154 medicinal *Morinda citrifolia*, os extratos desses endofíticos mostraram atividade
155 contra câncer de mama.

156 Shweta et al. (2012), em estudos para identificar fontes alternativas de drogas
157 inibidoras de câncer de cólon e de mama, isolaram de *Miquelia dentata* três espécies de
158 endofíticos, identificados como *Fomitopsis* sp., *Alternaria alternata* sp. e *Phomopsis*
159 sp. cujos extratos apresentaram atividades citotóxicas contra células cancerígenas.

160 Jiao et al. (2013) obtiveram do fungo endofítico *Penicillium* sp., isolado de
161 *Riccardia multifida* (L.) S. Gray, dois novos compostos bioativos que mostraram
162 inibição a germinação das sementes de *Arabidopsis thaliana*.

163 Zhang et al.(2013), em estudo sobre a doença infecciosa foliar destrutiva do
164 milho causado por *Setosphaeria turcica*, conseguiram isolar dois compostos dos
165 extratos do endofítico *Chaetomium globosum* com potencial antifúngico biocontrolador
166 para agricultura.

167 Os estudos de Xing et al. (2011) supõem que os metabólitos de fungos
168 endofíticos associados a espécie *dendrobium* pode ser um bactericida em potencial,
169 assim como Ishii et al. (2013) na qual os extratos do endofítico *Trichoderma* sp.
170 exibiram atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-
171 negativas.

172 Mahapatra et al. (2013) avaliaram o potencial do endofítico *Fusarium solani*
173 sobre radicais livres e seus extratos mostraram significativa atividade antioxidante.

174 A família Piperaceae consiste nos gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia* e
175 *Pothomorphe* (Koroishi et al. 2010), membros desta família ocorrem ao longo do
176 trópicos de ambos os hemisférios com concentrações principais na América Latina e na
177 Malásia (Souza, L. et al. 2009).

178 A quantidade de metabólitos biologicamente ativos descritos na literatura, no
179 que se refere à família Piperaceae, são fenilpropanóides, lignanas/neolignanas, pironas,
180 amidas, alifáticas e aromáticas, alcalóides, policetídeos e cromenos, além de outros
181 metabólitos de biossíntese mista (Baldoqui et al. 2009; Alves et al. 2010; Koroishi et al.
182 2010).

183 Pesquisas de Junior-Araujo et al. (1997) sobre *Piper tuberculatum*,
184 popularmente como pimenta de d'arda, isolaram piperidinas, piperdardinas. Esta
185 espécie é bastante utilizada no estado Paraíba como um sedativo e antídoto para
186 mordida de cobra.

187 Esses estudos têm mostrado que a produção de metabólitos dos fungos
188 endofíticos provenientes dessas relações simbióticas podem resultar em diversas
189 moléculas (Wijeratne et al. 2008) com propriedades terapêuticas anticânceres,
190 bactericidas e antifúngicas (Sá et al. 2009) e tantas outras (Guo et al. 2008; Borges et al.
191 2009).

192 No que se refere aos agentes antimicrobianos, há uma necessidade na busca
193 desses novos compostos químicos, visto que as doenças infecciosas ainda são um
194 problema global em razão do desenvolvimento da resistência contínua dos
195 microrganismos patógenos aos métodos tradicionais de tratamento (Wiyakrutta et al.

196 2004).

197 Infecções bacterianas são comuns em partes tropicais do mundo, mais
198 especificamente as que têm o mais impacto médico nos trópicos são as doenças
199 bacterianas causadas por membros do gênero *Mycobacterium* (Lupi et al. 2006). A
200 Organização Mundial da Saúde considera a tuberculose (causado por *Mycobacterium*
201 *tuberculosis*) um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente quando
202 associada com doenças que promovem deficiência de imunidade, tais como AIDS, neste
203 contexto, a busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento da tuberculose tem
204 chamado bastante atenção dos pesquisadores (Gandolfi et al. 2010).

205 A tuberculose é causado principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* que
206 normalmente infecta os indivíduos pelo tecido da mucosa da área respiratória por
207 inalação de gotas infecciosas (Gandolfi et al. 2010).

208 Pelo menos um terço da população mundial está infectado com tuberculose de
209 *M. tuberculosis*, ou 10% destes contrairão a doença em algum ponto das suas vidas
210 (Rongbao et al. 2000). Junto com HIV/AIDS e malária, tuberculose permanece entre
211 três principais doenças fatais infecciosas globais (Hall et al. 2009).

212 Atualmente o a única vacina autorizada contra tuberculose é o Bacilo Calmette-
213 Guérin (BCG), por isso, pesquisas em todo mundo vem se empenhando no
214 desenvolvimento de estratégias que possibilitem o controle da tuberculose.

215 Estudos de Rukachaisirikul et al. (2008) com o fungo endofítico *Phomopsis* sp.
216 PSU-D15, por exemplo, isolaram metabólitos bioativos na qual seus exibiram moderada
217 atividade antibacteriana *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

218 Lima et al. (2011) investigaram a influência de filtrados da cultura de fungos
219 endofíticos isolados de *P. aduncum* L. no crescimento de *M. tuberculosis*. Estes

220 produtos metabólicos mostraram potencial para ser usado como antimicrobiano ou
221 como futuro agente no combate a tuberculose.

222 Flores et al. (2013) em estudos sobre o isolamento de metabólitos secundários de
223 microrganismos endofíticos informaram também a extração de um potente agente
224 inibidor de *Mycobacterium tuberculosis* do fungo endofítico *Phomopsis longicolla*.

225 Todos esses exemplos de resultados evidenciam a importância dos produtos do
226 metabolismo secundário oriundos de microrganismos na descoberta e desenvolvimento
227 de medicamentos para o tratamento da tuberculose (Gandolfi et al. 2010).

228 As doenças transmitidas por vetores também constituem, ainda hoje, importante
229 causa de morbidade no Brasil e no Mundo. A dengue nesse âmbito é considerada a
230 principal doença reemergente nos países tropicais e subtropicais (Tauil, 2002) em
231 virtude de sua circulação nos cinco continentes e do grande potencial para assumir
232 formas graves e letais (Simas et al. 2004).

233 Dengue é uma arbovirose causada por um vírus da família Flaviviridae
234 transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* (Culicidae) que ocorre na Ásia, África,
235 América Central e América do Sul (Sen-Sung et al. 2003). Quatro sorotipos de vírus da
236 dengue reconhecidos em regiões mundiais diferentes conhecidos como: DENV-1,
237 DENV-2, DENV-3 e DENV-4. É responsável por 50 a 100 milhões de infecções e um
238 milhão de hospitalizações e 22,000 mortes cada ano (Knowlton et al. 2009). Estima-se
239 que 2,5 a 3,0 bilhões de pessoas residam em áreas onde existe transmissão dos vírus da
240 dengue e que, a cada ano, ocorram 50 milhões de infecções com 500.000 casos de
241 dengue hemorrágica e 12.000 mortes em todo o mundo.

242 Vários produtos sintéticos foram projetados e dispositivos para combater
243 resistência desenvolvida por várias espécies de mosquito, a maioria dos programas de

244 controle destes mosquitos foca na fase larval nos locais de procriação podendo reduzir
245 só a população dos adultos temporariamente (Ali et al. 2012).

246 Além disso, com o surgimento de formas resistentes do mosquito aos inseticidas
247 convencionais utilizados, tem crescido a procura por extratos vegetais e substâncias
248 naturais que sejam efetivas no combate ao mosquito adulto e/ou à larva de *Aedes*
249 *aegypti* e que sejam isentas de toxicidade para o meio ambiente (Simas et al. 2004).

250 Dando continuidade ao estudo com fungos endofíticos, cepas associadas à
251 espécie *Piper tuberculatum* foram cultivadas em meio líquido e submetidos à filtração a
252 vácuo, obtendo-se filtrados que foram avaliados nos bioensaios frente à dengue e
253 tuberculose.

254 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

255 **2.1 Condições de cultura e obtenção dos filtrados**

256 Os sete fungos endofíticos (Figura 1) foram repicados dos preservados em tubo
257 inclinado para duas placas de Petri (duas placas para cada fungo) contendo BDA (batata
258 dextrose ágar) e incubados a 30 °C por oito e dez dias respectivamente de acordo com o
259 período de crescimento de cada fungo.

260 Após este período cada fungo foi inoculado em Erlenmeyers de 500 mL com
261 200mL de meio de cultivo líquido batata dextrose (MDB) e mantidos estáticos sob
262 temperatura de 30°C por 25 dias.

263 Em seguida, os caldos dos fungos foram separados do micélio por filtração a
264 vácuo, fornecendo os filtrados (Figuras 2 e 3).

265 Pipetou-se 1mL de cada filtrado para frascos de vidro previamente pesados e
266 tampados com um pequeno pedaço de papel alumínio com furos, para auxiliar na
267 secagem, posteriormente os frascos de vidro foram colocados em banho-maria e

268 dessecador, alternadamente até que os filtrados estivessem secos, isto foi feito por um
269 período de 7 a 9 dias (Figura 4).

270 Ao fim desse processo os vidros com as amostras secas foram pesados
271 novamente para se obter a biomassa produzida pelos endofíticos.

272 **2.2 Ensaios para determinação da atividade larvívora frente à *Aedes aegypti***

273 A atividade larvívora foi avaliada por Seletividade. Os testes foram realizados
274 em laboratórios especiais chamados “insetários” (Figura 5), no Laboratório de Malária e
275 Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), empregando-se larvas
276 de *A. aegypti* do terceiro estágio (Figura 6). O Laboratório de Malária e Dengue
277 disponibilizou toda a infraestrutura para a realização dos testes, bem como todo o seu
278 corpo técnico para assegurar o completo desenvolvimento dos testes.

279 As larvas de *A. aegypti* necessárias para o desenvolvimento dos bioensaios
280 foram obtidas a partir da colônia do referido Laboratório. Para a manutenção desta
281 colônia, as fêmeas de *A. aegypti* realizaram o repasto sanguíneo em hamster
282 (*Mesocricetus auratus*).

283 Após a oviposição e eclosão dos ovos, as larvas foram mantidas em cubas até
284 atingirem o terceiro estágio, quando então foram utilizadas para a montagem dos
285 bioensaios.

286 As colônias foram mantidas no “insetário” sob condições controladas com
287 temperatura média de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa em torno de 85% - 90%, com fotofase
288 de 12 horas. As larvas foram mantidas com alimentação utilizadas para peixes de
289 aquário – Tetramin.

290 Para cada filtrado seco foi preparado uma solução estoque (0,002mg/mL), que em
291 seguida foram diluídos para dois copos plásticos: o primeiro copo com 1,0 μL da

292 solução estoque (concentração de 0,2 ppm) o segundo copo plástico com 5,0 µL
293 (concentração de 1,0 ppm), além de 10 mL de água destilada, alimento tetramin e 10
294 larvas de terceiro estágio em cada copo (Figura 7).

295 Após todas as amostras estarem preparadas, uma réplica sem filtrado foi feita
296 também com 10 larvas para o controle negativo. Após a aplicação dos filtrados secos e
297 nas suas devidas concentrações, leituras foram feitas durante as 72 horas onde foram
298 contadas as larvas mortas. Este procedimento possibilitou obter o percentual da
299 mortalidade dos indivíduos e selecionar aqueles filtrados dos endofíticos que matarem
300 50% ou mais das larvas existentes em cada copo de teste.

301 **2.3 Detecção de atividade inibitória *Mycobacterium tuberculosis***

302 A técnica utilizada para verificação da atividade inibitória dos filtrados teve
303 como base a metodologia adaptada do trabalho produzido por Franzblau et al. (1998).
304 Utilizou-se Alamar Blue, um corante com baixa toxicidade, sem efeito carcinogênico e
305 indicador de uma oxido-redução ambiental pela mudança de cor, bastante utilizado na
306 detecção de proliferação celular e em análises de citotoxicidade.

307 As cepas padrões de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) foram
308 cedidas pelo Laboratório de Micobacteriologia/CPCS/INPA.

309 Para a realização dos bioensaios frente à *Mycobacterium tuberculosis*, foram
310 adicionados os filtrados aos poços das microplacas, com auxílio de micropipetas
311 multicanal. O procedimento adotado foi na seguinte ordem de adição:

- 312 1. Água deionizada estéril → 200 µL nos poços das colunas 1 e 12, nas fileiras A e
313 H; 100 µL nos poços da coluna 2, nas fileiras de B a G;
- 314 2. Meio de cultivo: Middlebrook 7H9CG, para *M. tuberculosis*;
- 315 3. Filtrado de teste → 100 µL nos poços das colunas 2 e 3, nas fileiras de B a G.

316 4. Diluições sucessivas dos filtrados de testes → Após homogeneização do
317 conteúdo dos poços da coluna 3, fileiras de B a G, foram transferidos 100µL
318 para os poços laterais da direita e sucessivamente repetidas até os poços da
319 coluna 10, fileiras de B a G. Os 100 µL retirados dos poços da coluna 10, fileiras
320 de B a G foram desprezados.

321 5. Inoculo microbiano → 100 µL nos poços das colunas 3 a 11, nas fileiras de B a
322 G.

323 As microplacas preparadas foram incubadas utilizando a cepa H37Rv por 5 dias
324 a 37 °C .Após esse período foram adicionados 50 µL da solução reveladora Alamar
325 Blue/Tween 80 ao poço da coluna 11, fileira B, e a microplaca re-incubada por mais 24
326 horas, visando confirmação de multiplicação microbiana.

327 **3. RESULTADOS**

328 Obteve-se pela primeira vez o sete filtrados de fungos endofíticos associados a
329 *Piper tuberculatum* .

330 Os filtrados mostraram-se inativos frente às larvas de *Aedes aegypti* do terceiro
331 estágio.

332 O resultado do ensaio antimicrobiano não indicou positividade antagônica
333 ao crescimento de *M. tuberculosis*.

334

335 **4. DISCUSSÃO**

336 A inatividade dos filtrados no ensaio inseticida pode ser explicado devido a
337 utilização de uma baixa concentração de filtrado (0,2 e 1,0 ppm ou 0,2 e 1,0 µg/mL) em
338 comparação as utilizadas com extratos de plantas. Pois, não há relatos na literatura de

339 bioensaios de filtrados de fungos endofíticos frente à larvas do *Aedes aegypti* do terceiro
340 estágio, para termos uma concentração bioativa de referência.

341 Em extratos de plantas Cheng et al. (2013) investigaram óleos essenciais e extratos
342 de *Cunninghamia konishii* e as concentrações que apresentaram atividade larvicida
343 significativa foram 35,8, 69,4, 71,9 e 74,1 ppm.

344 Kanis et al. (2013) também investigaram extratos da raiz de *Piper ovatum* e as
345 concentrações que mostraram atividades larvicida foram de 2,1 e 4,1 ppm
346 respectivamente, outras concentrações de extratos referentes ao gênero *Piper* estão entre
347 0,04 a 35,0 ppm (Garcez et al. 2013).

348 Nos ensaios em *M. tuberculosis* utilizou-se 2000 ppm, Lima et al. (2011) encontrou
349 atividade nas concentrações 37,5 ppm, abaixo do que foi utilizado no presente trabalho.

350 Flores et al. (2013) em estudos sobre o isolamento de metabólitos secundários de
351 microrganismos endofíticos informaram também a extração de um potente agente
352 inibidor de *Mycobacterium tuberculosis* na concentração 50 ppm do fungo endofítico
353 *Phomopsis longicolla*.

354 Apesar dos filtrados não terem apresentado nenhuma atividade nos ensaios
355 propostos, estes estudos ainda possuem valor científico, já que se trata de um trabalho
356 inédito. Ademais, poderão ser realizados outros ensaios biológicos, inclusive os que já
357 foram feitos.

358 **AGRADECIMENTOS**

359 À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM pela
360 bolsa concedida, ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Instituto Nacional de Pesquisas da
361 Amazônia – INPA pela infraestrutura concedida para realização dos bioensaios.

362

363

364 **REFERÊNCIAS**

- 365
366 Abrahão, M.R.E., et al. 2013. Endophytes: Recent developments in biotechnology and
367 the potential for flavor production. *Food Research International*, 52: 367–372.
368
- 369 Álvarez-Loayza ,P., et al. 2011. Light Converts Endosymbiotic Fungus to Pathogen,
370 Influencing Seedling Survival and Niche-Space Filling of a Common Tropical Tree,
371 *Iriarteia deltoidea*. *PLoS ONE*, 6.
372
- 373 Alves, H., et al. 2010. Flavonóides de *Piper carniconnectivum* C.DC. *Piperaceae*.
374 *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 160-164.
375
- 376 Ali. M S. et al. 2012. Bioactivity of seagrass against the dengue fever mosquito *Aedes*
377 *aegypti* larvae. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 570-573.
378
- 379 Baldoqui, D. C., et al. 2009. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata*
380 (Piperaceae). *Química Nova*, 32: 1107-1109.
381
- 382 Borges, W. S., et al. 2009. Endophytic fungi: Natural products, enzymes and
383 biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry*,13:1137-1163.
384
- 385 Cheng, M. J. et al. Secondary metabolites and cytotoxic activities from the endophytic
386 fungus *Annulohyphoxylon squamulosum*. *Phytochemistry Letters*, v. 5, p. 219 – 223,
387 2012.
388
- 389 Davitt, A. J., et al. 2011. Understanding context-dependency in plant–microbe
390 symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of
391 symbiont transmission. *Environmental and Experimental Botany*, 71:137–145.
392
- 393
- 394 Flores A. C., et al. 2013. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus
395 *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and
396 evaluation of biological activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,
397 29:923–932.
398
- 399 Franzblau, S.G. ; Collins, L. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460
400 sytem for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*
401 and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, vol. 41, no. 5, p.1004-
402 1009.
403
- 404 Garcez, W.S. et al. Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra
405 *Aedes aegypti*. *Revista Virtual Química*, n. 5, v. 3, p. 363-393, 2013.
406
- 407 Gandolfi et al. 2010. Metabólitos secundários das esponjas *Aplysina fistularis* e *Dysidea*
408 sp. e atividade antituberculose da 11-cetofistularina-3. *Química Nova*, 33: 1853-1858.
409

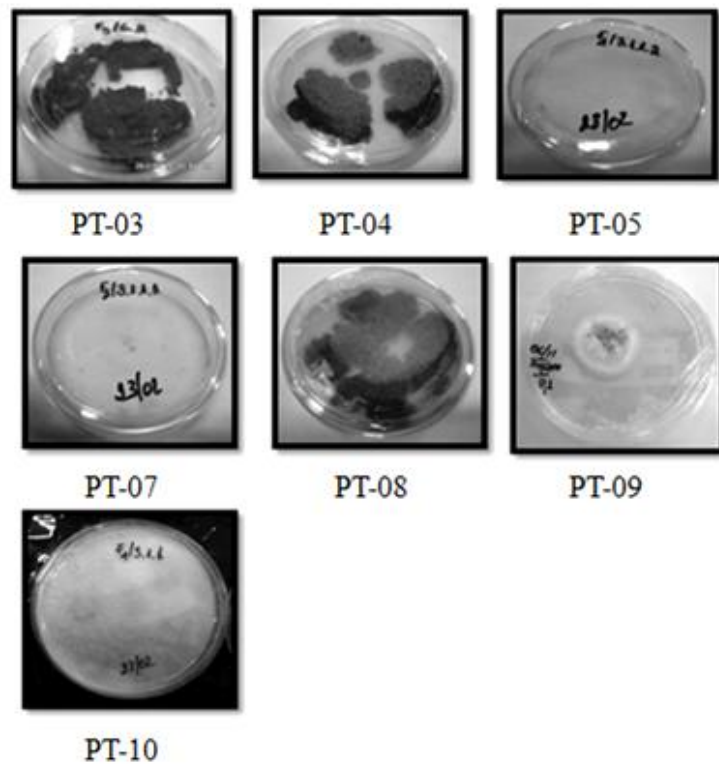
- 410 Gilbert, A.; Hazard, L. 2011. Endophyte infection of *Festuca eskia* enhances seedling
411 survival to drought and cutting at the expense of clonal expansion. *Journal of Plant*
412 *Ecology*, 4: 201–208.
- 413
414 Gonda, S., et al. 2013. Filamentous fungi from *Plantago lanceolata* L. leaves:
415 Contribution to the pattern and stability of bioactive metabolites. *Phytochemistry*, 86:
416 127–136.
- 417
418 Gutierrez, R.M.P., et al. 2012. Compounds derived from endophytes: a review of
419 phytochemistry and pharmacology. *Current Medicine Chemistry*, 19: 2992–3030.
- 420
421 Guo, B., et al. 2008. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. *Applied*
422 *Biochemistry Microbiology*, 44: 136–142.
- 423
424 Hall, L.J., et al. 2009. Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing
425 the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B–ESAT6 fusion protein. *Vaccine*, 27: 6894–
426 6904.
- 427
428 Ishii, T., et al. 2013. Cytosporone S with antimicrobial activity, isolated from the
429 fungus *Trichoderma* sp. FKI-6626. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23:
430 679–681.
- 431
432 Junior- Araujo, J. X., et al. 1997. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper*
433 *tuberculatum*. *Phytochemistry*, 44: 559-561.
- 434
435 Jiao, Y., et al. 2013. Metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus
436 from the liverwort *Riccardia multifida* (L.) S. Gray. *Phytochemistry Letters*, 6:
437 14–17.
- 438
439 Kanis, L.A. et al. Standardized extract of *Piper ovatum* (Piperaceae) to control *Aedes*
440 *aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*, n. 50, p. 816 – 820
441 2013.
- 442
443 Knowlton, K., et al. 2009. Mosquito-Borne Dengue Fever Threat Spreading in the
444 Americas. *Natural Resources Defense Council*, july.
- 445
446 Koroishi, A. M., et al. 2010. Antifungal activity and nail permeation of nail lacquer
447 containing *Piper regnellii* (Miq.) C. CD. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck (Piperaceae)
448 leave extracts and derivatives. *Molecules*, 15: 3920-3931.
- 449
450 Kusari, S., et al. 2012. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and
451 endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites.
452 *Phytochemistry*, in press.
- 453
454 Lima, A. M., et al. 2011. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from
455 *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electronic Journal of*
456 *Biotechnology*, 14: <http://dx.doi.org/10.2225/vol14-issue4-fulltext-11>.
- 457

- 458 Lupi, O., et al. 2006. Tropical dermatology: Bacterial tropical diseases. *Journal of the*
459 *American Academic of Dermatology*, 54: 559-78.
- 460
- 461 Mahapatra, S., et al. 2013. Evaluation of in vitro antioxidant potency of
462 exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. *International Journal*
463 *of Biological Macromolecules*, 53: 62– 66.
- 464
- 465 Mugerwa, T.T. M., et al. 2013. A variety of melanised root-associated fungi from the
466 Sydney basin form endophytic associations with *Trifolium subterraneum*. *Fungal*
467 *ecology*, 6: 70-82.
- 468
- 469 Radic, N. ; Strukelj, B. 2012. Endophytic fungi—the treasure chest of antibacterial
470 substances. *Phytomedicine*, 19: 1270– 1284.
- 471
- 472 Pandi, M., et al. 2011. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced
473 from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda*
474 *citrifolia*. *African Journal Biotechnology*, 10: 1428-1435.
- 475
- 476 Rukachaisirikul, V., et al.2013. Indanone and mellein derivatives from the
477 Garcin ia-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. *Phytochemistry Letters*, 6:135–138.
- 478
- 479 Rukachaisirikul, V., et al. 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp.
480 PSU-D15. *Phytochemistry Letters*, 69: 783–787.
- 481
- 482 | Rodriguez, R. J., et al. 2008. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New*
483 *phytologist*. 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- 484
- 485 Rongbao, Li., et al, 2000. Three-dimensional Structure of *M. tuberculosis* Dihydrofolate
486 Reductase Reveals Opportunities for the Design of Novel Tuberculosis Drugs.
487 *Molecular Biology*, 295: 307±323.
- 488
- 489 Suwannarach, N., et al. 2013. Biofumigati on with the endophytic fungus *Noduli*
490 *sporium* spp. CMU -UPE34 to control postharvest decay of citrus fruit. *Crop*
491 *Protection*, 45: 63-70.
- 492
- 493 Sá , R. A., et al. 2009. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon*
494 *urundeuva* heartwood. *Wood Science Technology*, 43: 85–95.
- 495
- 496 Sen-Sung, C., et al. 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow
497 fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology*, 89: 99–102.
- 498
- 499 Shweta, S., et al.2012. Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce
500 the anti-cancer alkaloid,Camptothecine. *Phytomedicine*, in press.
- 501
- 502 Singh, U., et al. 2013. Can endophytic *Arthrobotrys oligospora* modulate accumulation
503 of defence related biomolecules and induced systemic resistance in tomato
504 | (*Lycopersicon esculentum* Mill.) against root knot disease caused by
505 *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology*, 63: 45–56.

- 506
507 Simas, N.K., et al.2004. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue –
508 | atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e
509 fenilpropanóides. *Quimica Nova*, 27: 46-49.
510
511 Souza, L. A., et al. 2009. Vegetative propagation in *Piperaceae* species. *Brazilian*
512 *Archives of Biology and technology*, 52:1357-1361.
513
514 Souza, A. Q. L., et al, 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de
515 plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens*
516 bentham. *Acta Amazonica*, 34: 185 – 195.
517
518 Sun, P., et al. 2011. Trichodermanin A, a novel diterpenoid from endophytic fungus
519 culture. *Journal Nature Medicine*,65: 381–384.
520
521 Tauil, P. L. 2002. Controle de Doenças Transmitidas por Vetores no Sistema Único de
522 Saúde. *Informe Epidemiológico SUS*, 11: 2, abril/junho.
523
524 Viegas Jr., et al. 2006. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química*
525 *Nova*, 29: 326-337.
526
527 Xing, Y., et al. 2011. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in
528 *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. *Current*
529 *Microbiology*, 62:1218–1224.
530
531 Xiang Tan, R., et al. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product*
532 *Reports*, 23: 753–771.
533
534 Wijeratne, E. M. K., et al. 2008. Sesquiterpene Quinones and related metabolites from
535 *Phyllosticta spinarum*, a fungal strain endophytic in *Platyclus orientalis* of the
536 Sonoran Desert. *Journal Nature Products*,71: 218–222.
537
538 Wiyakrutta, S., et al. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-
539 malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology*
540 *& Biotechnology*, 20: 265–272.
541
542 Yong-Cheng Li; Wen-Yi Tao. 2009. Interactions of Taxol-producing endophytic
543 fungus with its host (*Taxus* spp.) during Taxol accumulation. *Cell Biology*
544 *International*, 33: 106 – 112.
545
546 Y. Jiao, et al. 2013. Metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus from the
547 liverwort *Riccardia multifida* (L.) S. Gray. *Phytochemistry Letters*, 6: 14–17.
548
549 Zhang, G., et al. 2013. Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium*
550 *globosum* No.05, a new biocontrol agent, against *Setosphaeria turcica*. *Biological*
551 *Control*, 64: 90–98.
552
553

554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601

602 FIGURAS

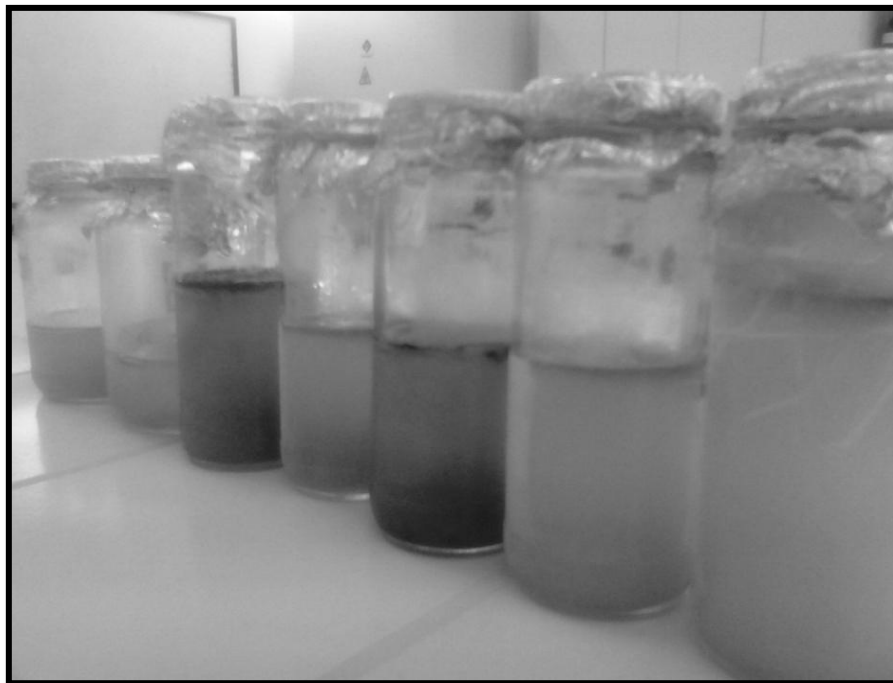


603
 604 **Figura 1.** a) Fungos endofíticos de *Piper tuberculatum* inoculados em meio BDA por
 605 oito e dez dias respectivamente. **Fonte:** Gondim, 2013.

606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624



Figura 2. . Filtração a vácuo para obtenção dos filtrados dos fungos endofíticos de *Piper tuberculatum*. **Fonte:** Gondim, 2013.



625
626
627
628
629
630
631

Figura 3. Filtrados obtidos dos fungos endofíticos associados a *Piper tuberculatum*.
Fonte: Gondim, 2013.



632
633
634

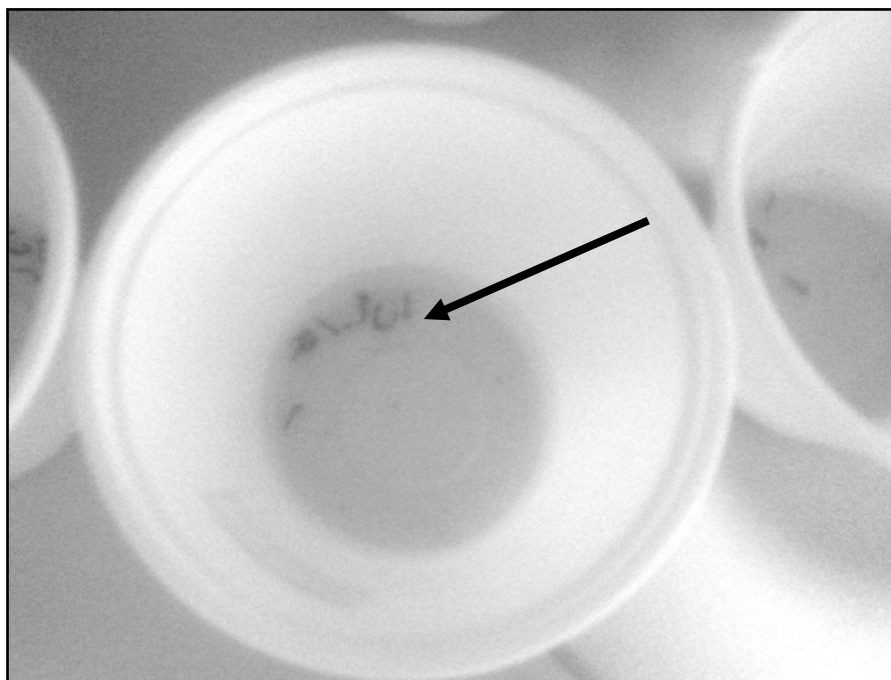
Figura 4. Filtrados dos fungos endofíticos associados à *Piper tuberculatum* sendo secos em dessecadores. **Fonte:** Gondim, 2013.

635
636



637
638 **Figura 5.** Bioensaios em dengue sendo realizados no “insetário” do Laboratório de
639 Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). **Fonte:**
640 Gondim, 2013.

641
642



643
644
645 **Figura 6.** A seta em destaque indica as 10 larvas do terceiro estágio sendo utilizadas
646 nos bioensaios dos filtrados secos dos fungos endofíticos associados à *Piper*
647 *tuberculatum*. **Fonte:** Gondim, 2013.

648
649



650
651
652
653
654
655
656

Figura 7. Bioensaios em dengue nas concentrações 0,2 e 1,0 ppm dos filtrados secos dos fungos endofíticos associados a *Piper tuberculatum*. **Fonte:** Gondim, 2013.