



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA**

JANAINA DA COSTA NOGUEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ENDÓFITOS
ASSOCIADOS À PIMENTA MURUPI (*Capsicum chinense* Jacq.)**

**MANAUS-AM
2014**

JANAINA DA COSTA NOGUEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ENDÓFITOS
ASSOCIADOS À PIMENTA MURUPI (*Capsicum chinense* Jacq.).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mayra Kassawara Martins
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Sayuri Maki

MANAUS-AM
2014

JANAINA DA COSTA NOGUEIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ENDÓFITOS
ASSOCIADOS À PIMENTA MURUPI (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data 25/03/2014

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Cristina Sayuri Maki

Prof^ª. Dr^ª. Maria Ivone Lopes da Silva

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

**MANAUS-AM
2014**

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UEA)

N778P	<p>Nogueira, Janaina Potencial biotecnológico dos endófitos associados à pimenta murupi (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) / Janaina da Costa Nogueira. -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2014. x,64f.:il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2014. Orientadora: Pfa. Dra. Mayra Kassawara Martins</p> <p>1. <i>Capsicum chinense</i> 2. Microrganismos endofíticos 3. Compostos antimicrobianos I. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU : 604</p>
-------	---

Dedico
A Deus, pela força inexplicável.

*“A mais extrema forma de ignorância é quando você
rejeita algo sobre o que você não sabe nada”*

Wayne Dyer

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me concedeu essa oportunidade de construir um futuro promissor. Por sua presença constante ao meu lado, por ser o meu refúgio, por sua incomparável e inconfundível bondade. E por sempre compreender meus anseios, me dando força e coragem para atingir meus objetivos.

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

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Mayra Kassawara Martins, pela sugestão do trabalho, pela excelência profissional, pela contribuição, por seus ensinamentos, que contribuíram e muito, para minha formação acadêmica, pela confiança depositada em mim na realização deste trabalho, pelo apoio constante, não medindo qualquer esforço, estando sempre presente e disponível para me auxiliar em momentos adversos.

À minha co-orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Cristina Sayuri Maki, pelas contribuições pertinentes, conversas norteadoras, pelo incentivo, pela confiança e por demonstrar a sua preocupação comigo e com o andamento do trabalho, sempre me orientando e auxiliando. Sua orientação foi muito importante para a construção desse trabalho e finalização dessa etapa.

Ao meu companheiro Marco Aurélio, por todo apoio e paciência comigo nos momentos de estresse e desespero. Sem seu amor tudo seria mais difícil.

À minha grande amiga Kamila Yuyama que mesmo longe, sempre esteve ao meu lado, me incentivando a seguir em frente.

Agradeço às colegas do Mestrado: Juliana Moraes, Laila Pedroza, Wenna de Padua, Daiana Torres, Joelma Fernandes e Flavia Queiroz pela agradável companhia durante o curso;

Aos professores Doutores , José Odair Pereira, Pedro de Queiroz e Rozana Galvão, pela disponibilização dos laboratórios (LAGEM e Bioativos).

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM), por toda a ajuda e colaboração e em especial, à colaboração do João Raimundo.

Às amigas Gabrielly Conrado e Luana Travassos, amigas que levarei lembranças por toda a minha vida.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA): Isaque Silva, Samára Santos e Ingrid Silva por todo auxílio nos experimentos.

À FAPEAM, pela bolsa de estudos.

RESUMO

Microrganismos endofíticos habitam tecidos vegetais de forma assintomática e estabelecem uma relação considerada mutualística com seus hospedeiros. Este grupo microbiano é reconhecido como uma valiosa fonte de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas que podem ter aplicações na medicina, agricultura, biotecnologia e indústria. Conhecendo o potencial desses microrganismos, sugeriu-se neste trabalho, a caracterização da comunidade de microrganismos endofíticos associados ao fruto da pimenta murupi (*Capsicum chinense*) e sua capacidade em produzir metabólitos com atividade antimicrobiana. O número total de endófitos obtidos do endocarpo e das sementes do fruto da pimenta murupi foi 446, dos quais 133 foram fungos filamentosos e 313 foram bactérias, com frequência total de isolamento de 55,75%. Nos isolamentos, as bactérias foram mais frequentes que os fungos, sendo predominantes no isolamento a partir de sementes. Cerca de 70% dos isolados fúngicos não produziram estruturas reprodutivas nas condições testadas neste trabalho e, portanto, não puderam ser identificados, totalizando 74 grupos morfológicos. Para outros três grupos, foi possível analisar as características macro e micromorfológicas das colônias e sugerir a sua identificação ao nível de gênero. Pôde-se perceber a predominância de *Fusarium* entre os fungos isolados da pimenta murupi, o qual apresenta micélio cotonoso, de coloração branca a rósea e características micromorfológicas peculiares. As bactérias endofíticas foram agrupadas em seis morfotipos, baseadas em suas características macroscópicas. Foram selecionados 77 fungos e 6 bactérias para testes de antibiose contra microrganismos teste. Apenas um endófito apresentou halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). A partir do DNA genômico, extraído do fungo endofítico com potencial antimicrobiano, foi possível amplificar a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, que apresentou aproximadamente 600 pb. De acordo com o banco genômico, o isolado promissor apresenta 92% de identidade com *Nemania* sp. Por se tratar de um índice considerado baixo, não foi possível inferir sobre sua identificação.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*, microrganismos endofíticos, composto antimicrobiano.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms inhabit plant tissues asymptotically and establish a mutualistic relationship with their hosts. This microbial group is recognized as a source of valuable secondary metabolites with different biological activities for medicine, agriculture, biotechnology and industry. This work was based on the potential of these endophytes and proposes the characterization of those murupi pepper fruits (*Capsicum chinense*) associated microorganisms, and the evaluation of their ability to produce metabolites with antimicrobial activity. The total number of endophytes obtained from the murupi pepper fruit and seeds was 446 (133 filamentous fungi and 313 bacteria), with 55.75% of isolation frequency. Bacteria were more frequent than fungi, especially in seeds. About 70% of the fungal isolates (comprising 74 morphological groups) could not be identified because they do not produce reproductive structures in culture medium under the established work conditions. For three other groups, it was possible to analyze the macro and micromorphological characteristics of colonies and determine three genera. *Fusarium* genus was predominant among murupi associated endophytes, presenting cottonous white to pink mycelium and peculiar micromorphological characteristics. Endophytic bacteria were grouped into six morphotypes, based on macroscopic characteristics. For performing antibiosis assay, 77 fungi and 6 bacteria were selected. Just one fungal endophyte showed inhibition zone against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and have their DNA submitted to the amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region, resulting in a band with approximately 600 bp. According to the *Blast_n* performed alignment with NCBI genomic bank sequences, the major identity level (92%) were established with *Nemania* sp., but this level is considered low and can not be used to infer about some identification.

Keywords: *Capsicum chinense*, endophytic microorganisms, antimicrobial compound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Pimenta <i>Capsicum chinense</i> variedade murupi.....	6
Figura 02. Estrutura molecular da capsaicina.....	8
Figura 03. Variedades da <i>Capsicum chinense</i> (A) pimenta de cheiro (B) murupi (C) pimenta-de-bode (D) cumari-do-Pará. Fonte: EMBRAPA, 2000.....	10
Figura 04. Etapas do isolamento de microrganismos endofíticos a partir de fragmentos de <i>C. chinense</i> . A) Amostras de pimenta murupi B) Corte longitudinal da pimenta C) Placa com meio de cultura inoculado com os fragmentos de meso+endorcapo D) Sementes E) e F) Placas com 3 dias de inoculação onde observa-se o crescimento de microrganismos.....	14
Figura 05. Frequência de isolamento de microrganismos endofíticos em função da sua localização na planta, do local de coleta e do meio de cultura empregado nos isolamentos.....	22
Figura 06. Quantidade de isolados endofíticos resgatados dos frutos verdes e maduros de pimenta murupi. Em (A), a comparação maturidade dos frutos x local; em (B), a comparação maturidade dos frutos x grupo de endófito.....	23
Figura 07. Exemplos de isolados endofíticos fúngicos e bacterianos resgatados dos tecidos vegetais da pimenta murupi.....	25
Figura 08. Características macro e micromorfológicas associadas a fungos dos gêneros (A) <i>Penicillium</i> , (B) <i>Cladosporium</i> , (C) <i>Fusarium</i>	28
Figura 09. Teste de detecção de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em disco. Legenda: (16) disco de papel filtro embebido no filtrado do caldo de fermentação do isolado 16, um fungo endofítico de pimenta murupi; (C+) controle positivo, representado pelo antibiótico ampicilina e (C-) controle negativo, representando apenas o meio de cultura líquido.....	30
Figura 10. Aspectos morfológicos do isolado 16, o qual produz compostos antimicrobianos contra <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA. Em (A), colônia do fungo em meio BDA; em (B) verso da colônia. (C) e (D): aspectos da micromorfologia obtida em microcultivo em ágar-água.....	32
Figura 11. Gel de amplificação das regiões ITS do rDNA do fungo endofítico (isolado 16) de pimenta murupi. Legenda: (M) Marcador de peso molecular 1Kb; (B) Controle negativo; (Amostras) Produtos de amplificação, sendo posicionadas em cada canaleta, as amostras provenientes de diferentes tubos de amplificação.....	32
Figura 12. Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características dos microrganismos teste utilizados nos ensaios de detecção de atividade antimicrobiana.....	14
Tabela 02. Componentes da reação de amplificação do rDNA fúngico.....	19
Tabela 03. Número de isolados e frequência de isolamento de fungos e bactérias endofíticos associados à pimenta murupi.....	21
Tabela 04. Caracterização dos morfotipos de bactérias endofíticas isoladas de pimenta murupi.....	27
Tabela 05. Características dos acessos mais próximos à sequência ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 após alinhamento por <i>Blast_n</i>	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Microrganismos Endofíticos	3
2.1.1 Metabólitos secundários.....	3
2.1.2 Atividade biológica dos endófitos.....	4
2.2 Gênero <i>Capsicum</i>	5
2.2.1 Capsaicina.....	7
2.2.2 Atividade antimicrobiana de <i>Capsicum</i>	9
2.2.3 Pimenta murupi (<i>Capsicum chinense</i>).....	10
3 OBJETIVOS	12
3.1 Geral.....	12
3.2 Específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Material Biológico	13
4.1.1 Pimentas murupi.....	13
4.1.2 Microrganismos teste.....	13
4.2 Caracterização Macro e Micromorfológica dos Isolados	16
4.3 Atividade Antimicrobiana dos Endófitos	16
4.3.1 Obtenção do caldo de fermentação dos endófitos.....	16
4.3.2 Ensaio de antibiose pela técnica de difusão em ágar.....	17
4.4 Caracterização molecular dos microrganismos endofíticos	18
4.4.1 Extração e quantificação de DNA.....	18
4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
4.4.3 Análise das sequências.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Isolamento e Conservação dos Microrganismos Endofíticos	21
5.2 Caracterização Macro e Micromorfológica dos Endófitos	27
5.3 Seleção dos Isolados para Atividade Antimicrobiana	29
5.4 Sequenciamento de regiões ITS do rDNA	32
6 CONCLUSÕES	36

PERSPECTIVAS FUTURAS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXOS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão presentes nos mais variados ambientes, interagindo com diversas formas de vida. São organismos extremamente versáteis e habitam ambientes diversificados, incluindo aqueles considerados inóspitos. 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., 2000a).

Os microrganismos endofíticos são conhecidos há mais de um século, porém, só receberam maior importância no final da década de 70, em decorrência do seu potencial em proporcionar benefícios aos seus hospedeiros e também, devido às suas aplicações biotecnológicas (Araújo et al., 2002). Até então, acreditava-se que os endófitos não mantinham qualquer relação com as propriedades de interesse apresentadas pelas plantas que os hospedavam (Radwan et al., 2004). Atualmente, mantém-se a hipótese de que genes responsáveis pela expressão de proteínas de interesse nos microrganismos podem ser transferidos (via transferência horizontal) desses para seu hospedeiro, sendo que esse último passa a expressar as mesmas moléculas de interesse dos seus microrganismos associados (Araújo et al., 2010).

Muitas espécies vegetais já possuem suas comunidades endofíticas isoladas e caracterizadas, tais como: *Citrus* sp. (Araújo et al., 2001); *Triticum aestivum* (Larran et al., 2002); *Dicksonia sellowiana* (Barros., 2003); *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (Souza et al., 2004); *Bactris gasipaes* (Almeida et al., 2005); *Glycine max* (Kuklinsky-Sobral et al., 2005); *Citrus limon* (Durán et al., 2005). Estima-se a ocorrência de cerca de 1,5 milhões de espécies endofíticas, sendo que deste total, 10% foram descobertas e apenas 1% examinada quanto ao seu espectro de produção de metabólitos secundários (Guo et al., 2008).

Assim, o estudo de bioprospecção de microrganismos endofíticos que produzam compostos de interesse abre perspectivas para várias frentes de investigação, incluindo a descoberta de novos compostos antimicrobianos.

Assim como os hospedeiros estudados até hoje, as pimentas do gênero *Capsicum* apresentam sua diversidade de microrganismos endofíticos associados. Amaresan et al. (2012) isolaram de *C. annuum* cerca de 87 bactérias endofíticas e dentre os isolados, foi possível

identificar gêneros como *Bacillus* sp., *Antrobacter* sp. e ainda *B. subtilis*. Devari et al. (2013) isolaram da mesma espécie, um fungo endofítico identificado como *Alternaria alternata*, produtor da substância capsaicina.

O gênero *Capsicum* compreende mais de 200 variedades, dentre as quais as espécies mais conhecidas são *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Menichini et al., 2009; Zimmer et al., 2012). Além do uso culinário, esse gênero tem reconhecidas propriedades farmacológicas, devido à presença de alcalóides conhecidos coletivamente como capsaicinóides (Reyes-Escogido et al., 2011), um grupo de alcalóides exclusivo do gênero *Capsicum*.

Existem vários relatos na literatura científica que tratam da atividade antimicrobiana das pimentas. Carvalho et al. (2010), por exemplo, estudaram a atividade de extratos de pimenta do gênero *Capsicum* contra diferentes tipos de microrganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*, tendo obtido resultados positivos.

Oliveira (2011) avaliou a susceptibilidade de fitopatógenos como *Cladosporium cladosporioides* e *Colletotrichum lindemuthianum* frente ao extrato da pimenta dedo-de-moça (*C. baccatum* var. *pendulum*). A taxa de crescimento dos fitopatógenos foi reduzida quando utilizado 10mg de extrato, sendo que com ambos os fungos, a taxa de inibição foi crescente com o aumento da concentração dos extratos de pimenta dedo-de-moça. Kapell (2007) testou o extrato hidroalcoólico das sementes imaturas de *C. baccatum* var. dedo-de-moça contra várias cepas de *Candida* spp., demonstrando a ocorrência de atividade antifúngica.

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 pimenta murupi, no que se refere ao seu potencial na produção de compostos antimicrobianos e à sua diversidade biológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microrganismos Endofíticos

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

Devido à íntima associação entre endófitos e espécies vegetais, tem sido sugerido que esses microrganismos co-evoluíram com seus hospedeiros (Misagui e Donndelinger, 1990), apresentando uma ampla gama de interações, dentre as quais se destaca a interação mutualística, onde os endófitos e seu hospedeiro trocam benefícios entre si, advindos dessa interação (Saikkonen et al., 1998).

Também a interação planta-endófito favorece, em alguns casos: a resistência contra patógenos (Díaz et al., 2005; Ruy et al., 2006; Paz et al., 2007; Senthilkumar et al., 2007; Bento et al., 2009; Cezar et al., 2009), a indução de crescimento vegetal (Tsavkelova et al., 2007; Amaresan et al., 2012), a indução da germinação de sementes (Silva et al., 2006; Ferreira et al., 2008; Amaresan et al., 2012), entre outros benefícios.

Microrganismos endofíticos exibem elevado potencial como agentes de controle biológico contra microrganismos patogênicos (Rubini et al., 2005; Pakdeevaporn et al., 2005; Peterson et al., 2005; Ziglio et al., 2013; Veloso et al., 2014), insetos (Azevedo et al., 2000b Romeis et al., 2005; Gail et al., 2011; Polli et al., 2012) e nematóides (Tian et al., 2007; Oliveira et al., 2009).

As perspectivas de utilização de microrganismos estão sendo potencializadas pelo rápido avanço nas técnicas de triagem e isolamento, associadas ao desenvolvimento da computação e instrumentação, permitindo que novas linhagens se tornem disponíveis para as mais diversas aplicações (Hall, 1989; Bull, 1991; Matsuura, 1998; Neto et al., 2002).

2.1.1 Metabólitos secundários

O metabolismo secundário, tanto de plantas como de microrganismos, pode ser visto como a produção de compostos não essenciais ao organismo que os produzem. Ao contrário, os produtos do metabolismo primário garantem as substâncias (ácidos graxos, proteínas, carboidratos) responsáveis pelo crescimento e manutenção das células. Justamente por seu caráter não essencial, a habilidade em produzir estes compostos pode ser perdida.

Os metabólitos secundários passaram a ser explorados pela sua importância nas áreas da saúde e da indústria, visto que retêm as características de antibióticos, pigmentos, toxinas, ferormônios, enzimas inibidoras, agentes imunomoduladores, agonistas, antagonistas, pesticidas, antitumorais, promotores de crescimento de plantas e animais (Okafor, 2007). Porém, nem todos são benéficos aos humanos, a exemplo das micotoxinas (Calvo et al., 2002). 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).

2.1.2 Atividade biológica dos endófitos

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 e atualmente, a busca de endófitos que produzam tais substâncias tem se intensificado.

Segundo Tong et al. (2011), *Orthosiphon stamineus* (Lamiaceae), conhecida como chá de Java, apresentou um percentual de 92% dos isolados de fungos endofíticos potencialmente produtores de antibióticos, visto que inibiram diferentes espécies bacterianas e fúngicas.

Raízes e colmos de *Dendrobium* sp. (Orchidaceae), foram utilizados para o isolamento de 53 fungos endofíticos, cuja fração etanólica de seus extratos inibiu, ao menos, um dos patógenos testados (*Epicoccum nigrum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*) (Xing et al., 2011).

Smallanthus sonchifolius (yacón) é uma planta perene com raízes tuberosas originária dos Andes e conhecida pelas suas propriedades fungicidas, bactericidas, antioxidantes e hipoglicêmicas. Dois de seus isolados fúngicos endofíticos (*Papulaspora immersa* e *Apiospora montagnei*) apresentaram atividade antibacteriana sobre *S. aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, segundo Ramos et al. (2010).

A atividade antimicrobiana dos microrganismos 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.

Dado o grande número de espécies vegetais, a pesquisa por endófitos produtores de compostos bioativos requer estratégias para aperfeiçoar essa procura, tornando mais bem-sucedida a descoberta de microrganismos promissores. Conforme reportado por Strobel e Daisy (2003), plantas com características únicas, que apresentem história etnobotânica (uso por nativos locais, rurais, indígenas) e que estejam relacionadas com finalidades específicas ou aplicações de interesse, ou ainda, plantas endêmicas que crescem em áreas de grande biodiversidade e/ou possui biologia incomum (expressando novas estratégias de sobrevivência, por exemplo), são mais propensas a hospedar novos endófitos produtores de compostos bioativos.

2.2 Gênero *Capsicum*

As pimenteiros do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae e têm como centro de origem o continente americano (Nuez et al., 1996). São plantas herbáceas com altura que varia de acordo com a espécie e as condições de cultivo. Acredita-se que o cultivo de tais pimentas ocorre desde o início do povoamento humano nas Américas, supostamente há cerca de 12 mil anos (Barbosa et al., 2012).

A cultura dos frutos das pimenteiros *Capsicum* spp. é uma das mais importantes em todo o mundo, principalmente nos países tropicais e subtropicais. A produção de frutos atingiu até 1,8 milhões de hectares, com mais de 28 milhões de toneladas colhidas na safra de 2011 (FAO, 2011). As pimentas *Capsicum* são apreciadas principalmente em regiões como: México, América Central, Antilhas, Índia Ocidental, Caribe, Bolívia (maior diversidade) e em todo o Brasil, principalmente no Nordeste, Sudeste e Bacia Amazônica (Casali e Couto, 1984; Bosland, 1994; Bianchetti, 1996;).

O Brasil está entre um dos maiores produtores de pimenta no mundo (Henz, 2011) além de consistir no centro de diversidade de pimentas *Capsicum* (Reifschneider, 2000), as quais são cultivadas em praticamente todos os estados brasileiros, sendo os principais produtores, os estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul. A área anual cultivada é de cerca de cinco mil hectares, com produção aproximada de 75 mil toneladas. No Brasil, a região que se destaca como maior consumidora de pimentas é o Nordeste, em função de ser um condimento fundamental para a culinária local (Ribeiro e Cruz, 2002).

O mercado é bastante diversificado, sendo as pimentas comercializadas para o consumo *in natura* (Wagner, 2003). Os frutos são consumidos principalmente como doce ou cozido de legumes, condimento ou especiaria e usado como agente de coloração na indústria alimentar. A pimenta é cada vez mais reconhecida como uma excelente fonte de metabólitos, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides (pró-vitamina A), tocoferóis (vitamina E), flavonóides e capsaicinóides (Howard e Wildman, 2007).

Das 26 espécies de pimentas *Capsicum* classificadas, apenas cinco são comercializadas e domesticadas: *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (Carvalho e Bianchetti, 2004). *C. chinense*, variedade “murupi” (Figura 01) é considerada a mais brasileira de todas as espécies do gênero, pois foi domesticada pelos índios amazônicos, sendo a Amazônia, a área de maior diversidade dessa variedade (Reifschneider, 2000). Com características morfológicas muito parecidas às da espécie *C. frutescens*, apresenta maior diferenciação nos pedicelos e nas flores (Ferrão, 1993).



Figura 01. Pimenta *Capsicum chinense*, variedade murupi

O cultivo de pimentas se ajusta perfeitamente aos modelos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria. Além de consumidas frescas, podem ser processadas e utilizadas em diversas linhas de produtos na indústria de alimentos. O Brasil se destaca na produção de pimentas *Capsicum*, as quais são consideradas um importante produto do agronegócio brasileiro, 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).

A indústria de alimentos tem como base a segurança alimentar, devido às exigências dos consumidores com a qualidade higiênico-sanitária e nutricional dos alimentos. Assim, existe um grande interesse em descobrir conservantes naturais, objetivando substituir ou minimizar o uso de aditivos sintéticos, tão questionados quanto aos possíveis efeitos nocivos à saúde. Nesse contexto, as pimentas do gênero *Capsicum* são plantas condimentares que, além de conferir um sabor diferenciado aos alimentos, apresentam também um poder conservante, associado às concentrações de capsaicina, componente ativo de pimentas conhecidas como pimentas ardidas (Perucka e Materska, 2001).

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. Cruz (2003) relacionou a pungência à concentração de capsaicina e à atividade antibacteriana dos extratos destas plantas.

Os sistemas antimicrobianos naturais que utilizam condimentos como pimentas e pimentões do gênero *Capsicum*, associados a processos tecnológicos de conservação de alimentos, constituem um novo e promissor conceito nos programas de segurança alimentar. Além da propriedade aromatizante, certos condimentos prolongam a vida útil de estocagem dos alimentos devido à sua atividade bacteriostática ou bactericida, retardando o início da deterioração como resposta ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (Nunes, 2010).

2.2.1 Capsaicina

Pungência é uma das características mais importantes do gênero *Capsicum*. A causa de tal pungência é o acúmulo de um grupo de metabólitos secundários nomeados capsaicinóides, sintetizado como amidas ácidas de vanililamina e um ácido graxo (Velooso et al., 2014).

Dos aproximadamente 14 capsaicinóides existentes, os que ocorrem em maior quantidade são a capsaicina (Figura 02), a diidrocapsaicina e a nordiidrocapsaicina (Stark, 2008). A capsaicina e diidrocapsaicina normalmente representam um valor estimado de 80-95% dos capsaicinóides que ocorrem naturalmente em pimentas (Antonius et al., 2009).

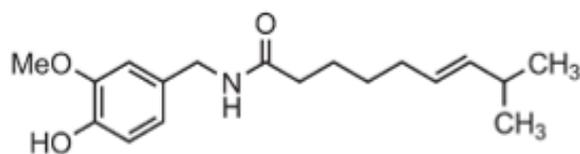


Figura 02. Estrutura molecular da capsaicina

O teor de capsaicinóides é avaliado de maneira subjetiva através da escala de Unidade de Calor Scoville (*Scoville Heat Units* – SHU), cujos valores variam de zero (0) a 300 mil SHU. Cultivares com até 30 mil SHU são consideradas de baixa pungência e utilizadas para o consumo *in natura* ou desidratadas; com valores entre 30 a 75 mil SHU, são consideradas de média pungência e utilizadas para a fabricação de molhos; entre 75 a 120 mil, alta pungência e acima de 120 mil SHU, pungência muito alta, sendo ambas utilizadas para fabricação de conservas e nas indústrias farmacêutica e bélica (Reifschneider, 2000).

C. chinense tem sido referida como a pimenteira mais cultivada na América do Sul, possuindo frutos bastante pungentes. As concentrações de capsaicinóides individuais e a proporção de capsaicina/diidrocapsaicina varia entre as espécies. Além disso, as concentrações absolutas de capsaicinóides são sujeitas a variações, em função de fatores como ambiente, cultura, entre outros. Algumas pesquisas mostram que pimentas cultivadas na primavera/verão são mais pungentes que aquelas cultivadas no outono/inverno. Tal fenômeno ocorre devido ao estresse, que influencia a via da síntese de capsaicinóides (Kirschbaumtitz et al., 2002).

Os estudos sugerem que a capsaicina pode induzir a parada do ciclo celular, a apoptose ou ainda inibir a proliferação de células em uma variedade de tumores cancerosos (Bode e Dong, 2011). Além disso, a capsaicina tem sido utilizada em cremes para tratamento de patologias dolorosas, tais como a dor neuropática a longo prazo em pacientes com câncer (Ellison et al., 1997), a neuropatia diabética (Ellis et al., 1993; Hautkappe et al., 1998). Além disso, a capsaicina oral, na forma de doces, reduz a dor em pacientes com mucosite bucal (Berger et al., 1995). A substância também pode ser aplicada no tratamento da obesidade através da sua ingestão oral, pois aumenta a produção de calor (ação termogênica), causando a quebra de carboidratos (Joo et al., 2010).

Outras características úteis dos capsaicinóides estão relacionadas com a sua atividade antimicrobiana e antifúngica (Kurita et al., 2002; Xing et al., 2006; Kraikruan et al., 2008). O

mecanismo antimicrobiano dos capsaicinóides envolve estresse osmótico e danos à estrutura da membrana plasmática dos microrganismos (Kurita et al., 2002).

2.2.2 Atividade antimicrobiana de *Capsicum*

Os principais grupos de compostos com propriedade antimicrobiana e extraídos de plantas são classificados conforme suas características físicas, químicas ou atividade biológica. Tais compostos são os óleos essenciais, alcalóides, glucosídeos, compostos fenólicos, saponinas, mucilagens, terpenóides, flavonóides e taninos (Martins et al., 2003).

Os compostos fenólicos presentes em plantas, além de contribuírem para o sabor, odor e coloração de diversos alimentos, apresentam atividades biológicas diversas e entre elas, a antimicrobiana. Pertencem a uma classe de compostos que inclui uma diversidade de estruturas simples ou complexas, possuindo um ou mais anéis aromáticos e um ou mais grupamentos hidroxila. Pertencem aos compostos fenólicos os ácidos fenólicos, derivados de cumarina, pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas, ligninas e taninos (Simões et al., 2001). Dentro deste grupo estão os compostos fenólicos como a capsaicina sintetizada por *Capsicum*.

Estudos sobre a atividade antimicrobiana dos extratos das pimentas *Capsicum* demonstram que esses podem atuar na inibição de microrganismos. Dorantes et al. (2000) utilizaram o extrato de *C. annuum* e obtiveram efeito inibitório sobre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Careaga et al. (2003) em seus estudos com extratos da pimenta sino (gênero *Capsicum*) constataram que a concentração mínima inibitória para *S. typhimurium* em carne foi de 1,5mL/100g da carne. Com *Pseudomonas aeruginosa*, a concentração de 0,3mL do extrato de *Capsicum* para cada 100g da carne proporcionou efeito bacteriostático, enquanto uma concentração de 3mL/100g de carne proporcionou efeito bactericida.

Acero-Ortega et al. (2005) analisaram a produção de compostos antimicrobianos de frações de *Capsicum* sp. capazes de inibir *L. monocytogenes* sob condições diferentes de pH (4,5; 5,5 e 6,5) e temperatura (2, 7 e 12°C). As frações foram testadas nas concentrações de 5 e 10%, tendo sido observado que a temperatura não proporcionou nenhum efeito antibacteriano, entretanto a concentração do extrato (5%) e o valor de pH (4,5) exerceram efeito relevante nas contagens microbianas.

Carvalho et al. (2005), por meio da análise dos índices de IINB (Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana) e de IINAB (Intensidade da Atividade de Inativação

Bacteriana), observaram efeito bacteriostático do extrato alcoólico de pimenta malagueta a 50% frente a *E. coli*, na concentração de 10^7 UFC/mL.

Devari et al. (2013) demonstraram, através de ensaios biológicos, que o fungo endofítico *Alternaria alternata* isolado de *C. annuum* também produz a substância capsaicina, responsável pela inibição de microrganismos patogênicos, indicando a possibilidade de que os microrganismos endofíticos possam produzir o mesmo princípio ativo expresso pela planta hospedeira.

2.2.3 Pimenta murupi (*Capsicum chinense*, variedade murupi)

C. chinense é a mais brasileira de todas as espécies de pimentas domesticadas. Embora possa ser encontrada nas Américas, é na bacia Amazônica que se encontra o centro de diversidade dessa espécie.

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). Possui grande variabilidade, constituindo 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 03).



Figura 03. Variedades da espécie *Capsicum chinense*. (A) pimenta de cheiro (B) murupi (C) pimenta de bode (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. É cultivada principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste.

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.

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.

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: murupizinho, 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 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar fungos e bactérias endofíticos associados ao fruto da pimenta murupi (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivada em Manaus e analisar sua atividade antimicrobiana contra microrganismos teste.

3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Isolar e purificar bactérias e fungos endofíticos associados ao fruto da pimenta murupi;
- ❖ Caracterizar os microrganismos isolados, utilizando técnicas para análise macro e micro-morfológica;
- ❖ Obter substratos de crescimento líquido dos endófitos e testá-los pela técnica de difusão em disco contra linhagens de *Candida albicans*; *C. tropicalis*; *C. guilliermondii*; *C. parapsilosis*; *C. glabrata*; *Staphylococcus aureus* MRSA (resistente à meticilina); *S. aureus* e *Escherichia coli*;
- ❖ Selecionar os isolados com potencial para produção de compostos antimicrobianos e identificá-los por sequenciamento de regiões ITS do rDNA;
- ❖ Inferir sobre a diversidade dos microrganismos endofíticos, com base nos resultados obtidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizados como materiais biológicos, as pimentas murupi, das quais foram isolados seus microrganismos endofíticos associados (fungos e bactérias). Posteriormente, foram realizados testes de atividade antimicrobiana dos endófitos sobre microrganismos teste. A metodologia empregada na obtenção e manutenção dos materiais biológicos está descrita nos itens 4.1.1 a 4.1.3.

4.1.1 Pimentas murupi

As pimentas murupi foram coletadas em duas épocas: novembro de 2012 e abril de 2013, em dois pontos de coleta na cidade de Manaus (AM): I) Zona Leste, nas imediações do Campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM) e II) Zona Oeste, no bairro Tarumã. Em ambas as localidades, as pimenteiras eram cultivadas para consumo doméstico, em área aberta.

Para as coletas, foram selecionadas e coletadas, com auxílio de um bisturi, 10 pimentas maduras (amarelas) e 10 pimentas imaturas (verdes) saudáveis, sem quaisquer sinais de danos físicos, as quais foram armazenadas em sacos de papel, identificadas e transportadas ao laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Amazonas (LAGEM), onde foram iniciados os procedimentos de assepsia e isolamento.

O estudo foi conduzido com pimentas da espécie *C. chinense*, variedade murupi, das quais foram utilizados os frutos (exo+meso+endocarpo) e as sementes para o isolamento de fungos e bactérias endofíticos (Figura 04).

4.1.2 Microrganismos teste

Os microrganismos isolados foram testados quanto à sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos que antagonizem, por antibiose, linhagens de microrganismos teste (Tabela 01).

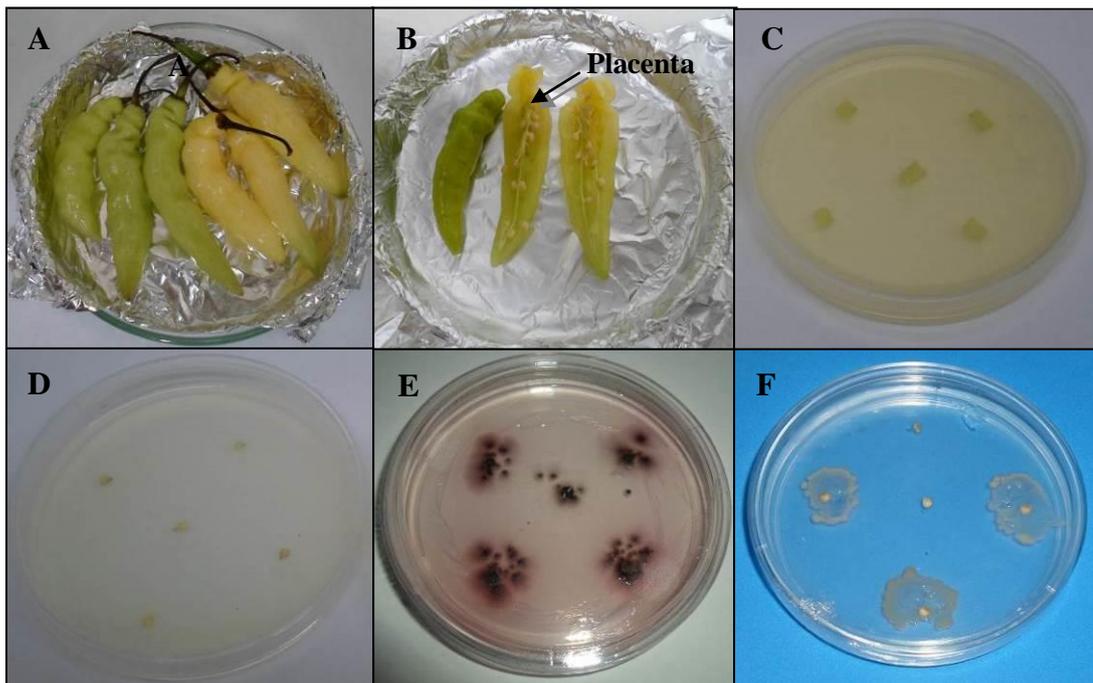


Figura 04. Etapas do isolamento de microrganismos endofíticos a partir de fragmentos de *Capsicum chinense*. **A)** Amostras de pimenta murupi; **B)** Corte longitudinal da pimenta; **C)** Placa com meio de cultura inoculado com os fragmentos de meso+endocapo; **D)** Sementes; **E)** e **F)** Placas com três dias de inoculação onde observa-se o crescimento de microrganismos

Tabela 01. Características dos microrganismos teste utilizados nos ensaios de detecção de atividade antimicrobiana

Microrganismos teste		Quadros clínicos associados
Bactérias Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (ATCC 25923) <i>S. aureus</i> (FIOCRUZ)	Infecções humanas de origens comunitária ou hospitalar. Causa lesões na pele como foliculites, furunculoses, abscessos, etc.
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> (FIOCRUZ)	Infecções urinárias, meningites, septicemia, entre outros.
Leveduras	<i>Candida albicans</i> (FIOCRUZ) <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) <i>C. tropicalis</i> (FIOCRUZ) <i>C. parapsilosis</i> (FIOCRUZ) <i>C. glabrata</i> (FIOCRUZ) <i>C. guilliermondii</i> (FIOCRUZ)	Candidíase, com lesões que podem variar de superficiais a profundas, apresentando-se brandas, agudas ou crônicas. Sítios de ocorrência: boca, garganta, língua, pele, couro cabeludo, genitálias, dedos, unhas e por vezes, órgãos internos.

Para a desinfecção superficial, visando a eliminação da microbiota epifítica, foram utilizadas as imersões sucessivas em: i) álcool 70% (v/v) durante 30 segundos; ii) água

sanitária comercial 4% (v/v) durante 60 segundos; iii) álcool 70% (v/v) durante 30 segundos; iv) água destilada autoclavada. Essa última imersão foi realizada em duas repetições sequenciais. Foram semeados, em placa de Petri contendo meio específico, 20 µL da água destilada utilizada para a 2ª repetição de imersão, consistindo no controle negativo (Araújo et al., 2010).

Após as lavagens em série, as pimentas murupi foram depositadas sobre placa de Petri autoclavada e com o auxílio de um bisturi, foram fragmentadas em quadrados de aproximadamente 3mm², os quais foram depositados em meios de cultura específicos para o isolamento de fungos e bactérias.

Foram inoculados cinco fragmentos por placa contendo os meios de cultura (Himedia): i) Ágar Batata Dextrose (BDA) para fungos; ii) Ágar Sabouraud para fungos (SAB); iii) Ágar Amido Caseína (AC) para bactérias e actinomicetos e iv) Ágar Triptona de Soja (TSA) para bactérias. Aos meios específicos para o cultivo de fungos foi acrescentado cloridrato de tetraciclina (MedQuímica) e aos meios específicos para o cultivo de bactérias foi acrescentada ciclohexamida (Sigma Aldrich), ambas na concentração de 50µg/mL.

As placas foram incubadas em estufa tipo BOD (*Biological Oxygen Demand*) em temperaturas de 24°C (para fungos) e 35°C (para bactérias). Após observação de crescimento dos endófitos nos fragmentos inoculados, o próximo passo consistiu na purificação desses microrganismos, visando à obtenção de culturas puras.

Para fungos, a purificação foi realizada por meio da obtenção de uma suspensão de conídios em *tween* 80 (0,05%, v/v, Dinâmica), a qual foi homogeneizada em vortex. Alíquotas da suspensão foram submetidas à estimativa do número de conídios em Câmara de Neubauer, seguindo-se à diluição seriada e plaqueamento. Para bactérias, a purificação foi realizada por meio da técnica de estria de esgotamento, conforme descrito por Araújo et al. (2010).

Após a purificação, os endófitos foram conservados por meio das técnicas de i) Castellani (Castellani, 1939); ii) tubo inclinado, utilizando os meios AC e BDA e iii) cultura submersa em óleo mineral. Todas as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente.

4.2 Caracterização Macro e Micromorfológica dos Endófitos

A identificação dos fungos foi realizada por métodos tradicionais e moleculares. Por meio da metodologia tradicional, foram observadas características macroscópicas como coloração e borda da colônia, produção de pigmento, tempo de crescimento e forma do micélio. As características microscópicas foram analisadas com auxílio de um microscópio óptico sendo visadas estruturas vegetativas e reprodutivas, como conídios, conidióforos, grampos de conexão, apressórios, septos, hifas, entre outros.

Para visualização das estruturas microscópicas, foi realizada a técnica de microcultivo (Shirling e Gottlieb, 1966), que consiste na transferência, em uma placa de Petri contendo meio BDA, de dois a quatro pequenos fragmentos do micélio fúngico. Sobre esses pequenos inóculos, foram depositadas lamínulas para microscopia, autoclavadas, medindo 22x22mm. Foi empregada uma 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 a estufa BOD, onde foram 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 o auxílio de uma pinça e depositada sobre uma lâmina de microscopia com lactofenol azul algodão. A observação das microestruturas e a fotodocumentação foram realizadas em microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagens.

Os isolados fúngicos foram agrupados em morfotipos, baseados em características morfológicas comuns. Os isolados bacterianos foram caracterizados e agrupados de acordo com suas características morfológicas (cor e morfologia da colônia), produção de pigmento e tempo de crescimento.

4.3 Atividade Antimicrobiana dos Endófitos

4.3.1 Obtenção do caldo de fermentação dos endófitos

O caldo de fermentação dos microrganismos endofíticos foi obtido conforme procedimentos descritos por Huang et al. (2001). Os endófitos isolados foram agrupados em 83 grupos de acordo com suas características morfológicas, e um representante de cada grupo foi selecionado para o cultivo em meio líquido. Os isolados de fungos foram inoculados em erlenmeyer de 50 mL, contendo 30 mL de caldo BD (Batata Dextrose) (1000mL de infusão de batata inglesa; 20g de dextrose), enquanto bactérias endofíticas foram inoculadas em caldo

AC (10g de amido; 2g de KNO₃; 0,3g de caseína; 2g de NaCl; 2g de K₂HPO₄; 0,05g de MgSO₄.7H₂O; 0,02g de CaCO₃; 0,01g de FeSO₄.7H₂O; 1000 mL de água destilada). Os isolados de bactérias e fungos foram incubados por dois e 20 dias, a 35 e 25°C respectivamente, em estufa com mesa rotatória a 120 rpm.

Após o crescimento, as massas microbianas foram separadas dos seus respectivos meios de cultura, através do processo de filtração a vácuo, embaladas, identificadas e armazenadas em freezer. O caldo de fermentação foi filtrado em membrana Millipore 0,22µm e armazenado a 4°C para realização dos bioensaios, descritos no subitem a seguir.

4.3.2 Ensaio de antibiose pela técnica de difusão em ágar

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filtrados dos microrganismos endofíticos, foi empregado o método de difusão em ágar, baseado na técnica descrita por Huang et al. (2001). Os líquidos metabólicos dos microrganismos endofíticos isolados de murupi foram utilizados para os ensaios de antagonismo *in vitro* contra microrganismos teste.

Para o ensaio de atividade antimicrobiana foi realizada inicialmente uma triagem qualitativa dos isolados com atividade biológica. Discos de papel Whatman nº 1 (5mm de diâmetro) foram impregnados com 100µL do caldo de fermentação (item 4.3.1) de cada microrganismo endofítico a ser testado e a seguir foram transferidos para estufa a 45°C durante uma hora.

Nove microrganismos teste foram utilizados para os ensaios antimicrobianos (item 4.1). As cepas utilizadas foram primeiramente reativadas em Ágar Sabouraud e TSA e após o crescimento, as colônias isoladas foram inoculadas em caldo TSB e Sabouraud (10g de peptona; 40g de maltose; 10g de extrato de levedura; 1000mL de água destilada) por 24h à temperatura de 35°C para bactérias e 28°C para leveduras. 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 x 10⁶ Unidades Formadoras de Colônia/mL (UFCs/mL). Uma alíquota de 100µL da suspensão de cada microrganismo teste foi semeada em placas de Petri contendo seus respectivos meios de cultura (Shadomy e Spnel-Ingrof, 1980).

Os discos de papel impregnados com o caldo de fermentação foram posicionados nas placas semeadas com os microrganismos teste, mantendo-se uma distância de 30 mm entre os discos para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição. Em seguida, as placas foram transferidas para geladeira (4°C), onde foram mantidas durante duas horas. 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 no caldo de fermentação para o meio de cultura.

A leitura dos resultados consistiu na medida do diâmetro dos halos de inibição (em mm) formados ao redor do disco de papel. Os bioensaios foram realizados com três repetições.

Após a seleção dos microrganismos promissores, um novo teste foi realizado somente com os isolados promissores, tendo como controle negativo, discos de papel impregnados com caldo BD e AC e para o controle positivo foram utilizados 50µg/mL de ampicilina para *S. aureus* e *E. coli*, e 50µg/mL de ciclohexamida para as cepas de *Candida* spp.. Os testes foram realizados em duplicata.

4.4 Caracterização Molecular dos Microrganismos Endofíticos

4.4.1 Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizado o micélio proveniente do cultivo em meio líquido (item 4.3.1), o qual foi transferido para graal de porcelana autoclavado contendo 1mL do tampão de extração (200µL de Tris HCl 1M pH 8,0; 50µL de EDTA 0,5M pH 8,0; 100µL de SDS 10%; 50µL de NaCl 5M e 600µL de água destilada autoclavada). A seguir, o material foi macerado até a formação de um líquido pastoso, o qual foi transferido para microtubos autoclavados de 2mL. Os microtubos foram incubados em banho maria a 65°C durante uma hora. A seguir, foram submetidos à centrifugação a 10.000 rpm durante minutos. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios e autoclavados, aos quais foram adicionados 500µL de fenol saturado em tampão Tris-HCl (Sambrook et al., 1989). Homogeneizou-se suave e manualmente o tubo, o qual foi submetido a uma nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas. Coletou-se o sobrenadante, transferindo-o para microtubos vazios e autoclavados, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofane (fenol:clorofórmio; 1:1). Agitou-se suavemente o tubo, o qual foi submetido a nova centrifugação. Coletou-se novamente o sobrenadante, transferindo-o para novos microtubos, adicionando-se em seguida, 700µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1). Agitou-se suavemente, centrifugou-se, coletou-se o sobrenadante, transferiu-se para um novo microtubo, ao qual se adicionou 50µL de NaCl 3M e 700µL de álcool etílico absoluto armazenado à temperatura de -20°C (freezer). Inverteu-se o tubo várias vezes, até a observação da precipitação dos ácidos nucléicos. Centrifugou-se o tubo mais uma vez,

descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Ao *pellet*, adicionou-se 500µL de álcool etílico a 70%, descartando-o em seguida. Repetiu-se o processo mais uma vez. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente, durante aproximadamente uma hora. Ao *pellet*, foram adicionados 200µL de tampão TE (10mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0). Os tubos foram agitados suavemente para solubilização dos ácidos nucleicos e em seguida, transferidos para a geladeira (4°C), onde foram mantidos até a quantificação do DNA.

O DNA foi quantificado em gel de agarose-TAE (1%) e corado com brometo de etídio (5µg/mL) juntamente com o marcador de 50pb, o qual apresenta bandas expressando quantidades específicas de DNA. O gel foi submetido a uma corrente de 50V e após a corrida, as bandas foram visualizadas em transiluminador UV, sendo o gel fotodocumentado.

Após a quantificação, as amostras foram diluídas para 10ng/mL e utilizadas nas reações de PCR (item 4.4.2) para a amplificação dos fragmentos de ITS (*Internal transcribed spacer*) do rDNA.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA dos isolados fúngicos foram submetidos à amplificação das regiões ITS do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), utilizando-se os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White et al. (1990), conforme condições descritas por Martins (2005).

A reação de PCR foi realizada em volume final de 50µl, conforme descrito na Tabela 02.

Tabela 02. Componentes da reação de amplificação do rDNA fúngico (Martins, 2005)

Componentes	Concentração do estoque	Volume na reação (µL)	Concentração final
Água Milli-Q	---	31,2	q.s.p
Tampão	10X	5	1X
Mix de dNTPs	2,5mM	5	0,25mM
Primer ITS-1	50µM	1	0,05mM
Primer ITS-4	50µM	1	0,05mM
MgCl ₂	50mM	3	3mM
Taq polimerase	5U/µL	0,8	2 unidades
DNA	10ng/µL	3	30ng
Total	---	50	---

As reações de amplificação foram realizadas utilizando as seguintes condições: 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 1,2% (v/v) em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE: 40mM de Tris; 20mM de ácido acético glacial; 1mM EDTA), o qual foi corado com brometo de etídio (5µg/mL) e fotodocumentado.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados utilizando o kit *GFX PCR Purification* (Quiagen), conforme recomendações do fabricante. O produto de purificação foi quantificado em NanoDrop 2000C e enviado para sequenciamento ao Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco da Universidade de São Paulo.

4.4.3 Análise das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de culturas depositadas 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, foi desenvolvido um dendrograma utilizando-se os programas Clustal X (www.clustal.org/clustal2/), BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) e TreeView (www.treeview.software.informer.com).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e Conservação dos Microrganismos Endofíticos

Foram obtidos 446 isolados de fungos e bactérias endofíticos, sendo 178 isolados no primeiro e 268 isolados no segundo isolamento, conforme descrito na Tabela 03.

Tabela 03. Número de isolados e frequência de isolamento de fungos e bactérias endofíticos associados à pimenta murupi

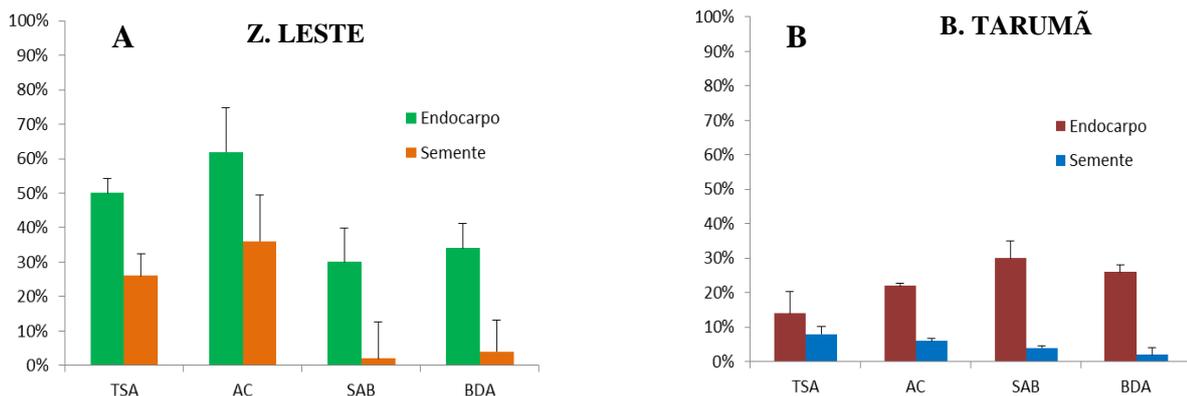
Isolamento	FUNGOS		BACTÉRIAS		TOTAL
	Número de isolados	Frequência (%)	Número de isolados	Frequência (%)	
Nov/2012 (1º)	66	37,08	112	62,92	178
Mar/2013 (2º)	67	25,00	201	75,00	268
TOTAL	133	31,04 (média)	313	68,96 (média)	446

Não foram obtidos isolados de leveduras endofíticas, possivelmente pela influência de fatores externos, tais como pH, temperatura, substrato, técnica de isolamento, entre outros. Segundo Wang et al. (2007), muitos fungos filamentosos apresentam rápido desenvolvimento após emergirem dos fragmentos, sobrepondo, no meio de cultura, o crescimento das colônias de leveduras e conseqüentemente, dificultando o isolamento das mesmas. Além disso, segundo os mesmos autores, leveduras podem constituir um grupo escasso dentro da comunidade de microrganismos endofíticos. No entanto, deve-se ressaltar que a velocidade de crescimento microbiano varia consideravelmente em quaisquer grupos estudados e assim, esse apontamento é uma possibilidade e não constitui uma regra geral.

Considerando o isolamento a partir do endocarpo e das sementes, observou-se que as bactérias foram mais frequentemente isoladas se comparadas aos fungos filamentosos, sendo observada a situação extrema no isolamento a partir de sementes, visto que nesse material, em todos os tratamentos, foi observado apenas o desenvolvimento de bactérias endofíticas. Esse resultado corrobora aquele descrito por Pileggi (2006) que isolou predominantemente bactérias endofíticas das sementes de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), uma reconhecida planta medicinal de uso popular. De acordo com o mesmo autor, é possível que as bactérias possam colonizar as plantas desde as primeiras fases de crescimento, revelando uma interação bem estabelecida com seu hospedeiro e provavelmente vantajosa para ambas.

Segundo Azevedo e Araujo (2007), embora microrganismos endofíticos sejam isolados de sementes de algumas espécies de planta, geralmente não são transmitidas verticalmente por meio de sementes e, sim, horizontalmente, por meio de aberturas naturais ou artificiais, durante o desenvolvimento do fruto. Após a penetração, esses microrganismos colonizam o hospedeiro, sendo encontrados em todos os órgãos e tecidos, inclusive no interior de células, justificando assim o aparecimento de bactérias também na região no endocarpo de murupi, pois nas pimentas utilizadas neste estudo, o endocarpo apresentou maior quantidade de endófitos, contrastando com a reduzida quantidade de endófitos associados às sementes. Na figura 05 estão ilustrados os resultados quanto ao total de isolados obtidos, nas duas coletas realizadas.

1º Isolamento (Período de seca)



2º Isolamento (Período de chuva)

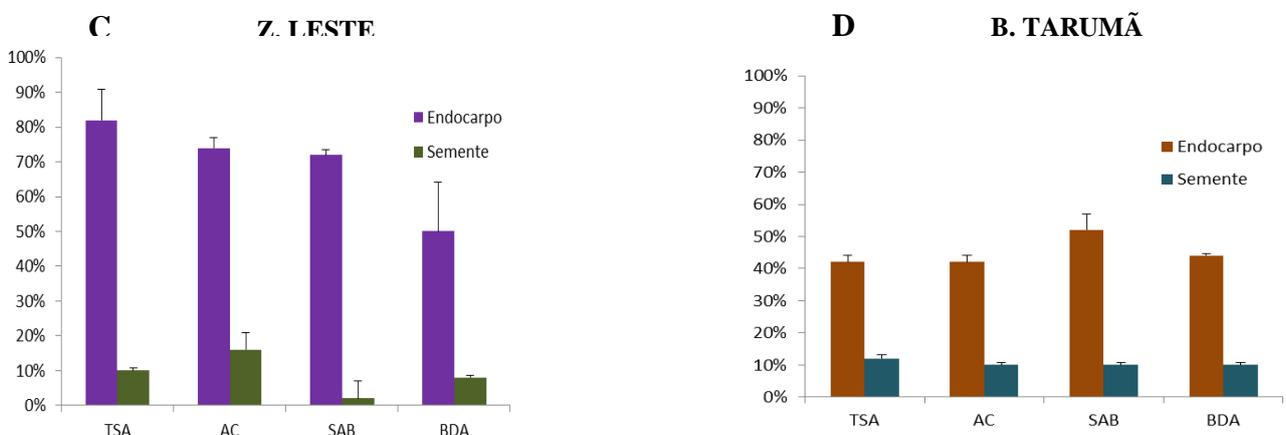


Figura 05. Frequência de isolamento de microrganismos endofíticos de pimenta *Capsicum chinense* em função da sua localização na planta, do local de coleta na cidade de Manaus e do meio de cultura empregados no isolamento

De acordo com os dados apresentados, verificou-se que o número de isolados obtidos foram maiores nos meios SAB para fungos e AC para bactérias, na maior parte dos tratamentos. No entanto, não é possível determinar um padrão de correlação entre os substratos de crescimento, quanto ao seu melhor desempenho para o isolamento dos microrganismos endofíticos. No trabalho de Holt et al. (1994), os autores observaram que os meios de cultivo contendo amido na formulação foram os mais eficientes para o isolamento de bactérias em geral, o que também foi observado no presente trabalho.

A frequência geral de isolamento foi de 55,75% (446 isolados para 800 fragmentos), tendo sido as plantas da zona Leste, as maiores detentoras de microrganismos endofíticos passíveis de isolamento com 70%, quando comparadas ao da zona Oeste, com 42% (Bairro Tarumã). Também foi observado que, no segundo isolamento, realizado em época chuvosa, houve maior resgate de endófitos dos tecidos vegetais analisados, especialmente quando considerada a coleta da zona Leste (Figura 06).

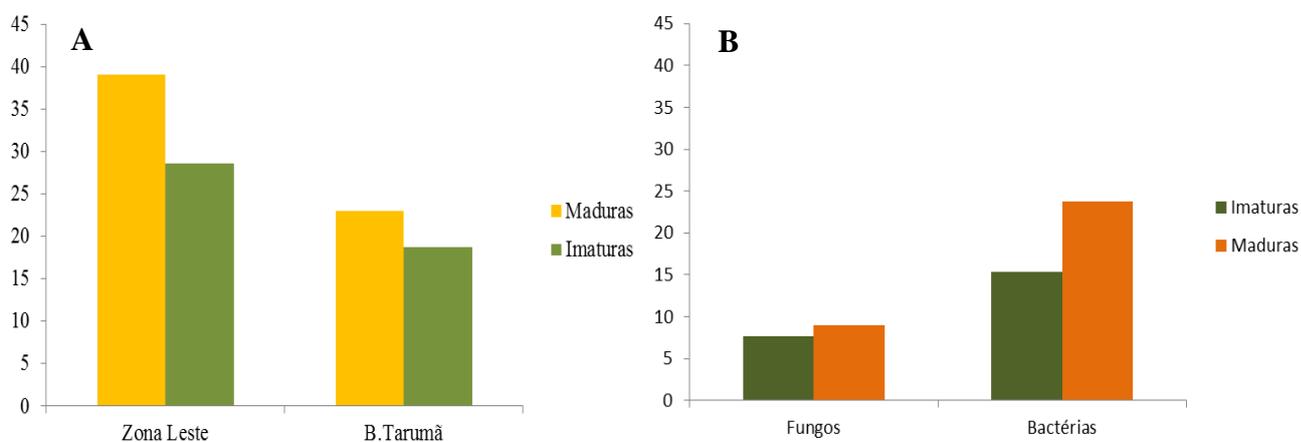


Figura 06. Quantidade de isolados endofíticos resgatados dos frutos verdes e maduros de pimenta *Capsicum chinense*. Em (A), a comparação maturidade dos frutos x local; em (B), a comparação maturidade dos frutos x grupo de endófito

Os dados obtidos corroboram com aqueles descritos por Rodrigues (1994) e Suryanarayanan et al. (1998), que obtiveram maior quantidade de microrganismos endofíticos no período chuvoso, quando comparado ao período de seca. No entanto, divergindo da maioria dos resultados descritos na literatura, Fröhlich et al. (2000) afirmaram que as estações do ano não têm grande influência na flutuação da microbiota endofítica, tendo sido o trabalho do grupo desenvolvido na Austrália, com endófitos associados a palmeiras.

Uma hipótese a ser considerada é a de que os microrganismos, especialmente aqueles associados à rizosfera e ao rizoplano, possam encontrar mais facilidade de desenvolvimento e penetração na planta através de suas raízes em épocas onde o solo encontra-se constantemente úmido, característica predominante dos solos amazônicos à época da realização da segunda coleta (novembro/2013).

O solo úmido também pode favorecer o maior desenvolvimento do sistema radicular do hospedeiro, favorecendo o estabelecimento de microfissuras que constituem importantes portas de entrada desses microrganismos até então pertencentes à rizosfera/rizoplano dos hospedeiros vegetais. Uma vez encontrando ambiente propício ao seu desenvolvimento, esses microrganismos podem vir a colonizar sistemicamente a planta como endófitos ou fitopatógenos.

Photita et al. (2001) comentaram que a especificidade de colonização de certos tecidos do hospedeiro pode ser consequência da preferência do táxon dominante, em função de uma maior facilidade na captação de nutrientes, sugerindo ainda que alguns fatores podem influenciar a especificidade, tais como o tipo de cutícula, a textura do tecido, os aspectos fisiológicos e químicos dos tecidos do hospedeiro, entre outros.

Considerando especificamente os hospedeiros *Capsicum*, ressalta-se ainda a particularidade da retenção da capsaicina na placenta do fruto, a qual pode ser mais ou menos desenvolvida entre as pimentas pertencentes ao gênero (ver Figura 04, item B). De qualquer forma, das sementes foram obtidos apenas endófitos bacterianos, o que leva à hipótese de que a própria placenta do fruto pode constituir em uma barreira física e química eficiente para coibir o livre desenvolvimento sistêmico dos fungos endofíticos, os quais foram resgatados apenas do endocarpo.

Segundo Suryanarayanan e Kumaresan (2000), o fator “hospedeiro” é mais determinante para a distribuição dos microrganismos endofíticos se comparado ao fator “localização geográfica”. Ainda, de acordo com Carrol (1988), a composição da microbiota endofítica pode variar em função da espécie vegetal, idade do tecido, precipitação anual, entre outros fatores.

A frequência de isolamento dos endófitos a partir dos frutos maduros de pimenta murupi foi maior quando comparada à dos frutos imaturos. A diferença pode ser devida ao fato de que os frutos maduros, tendo um tempo de desenvolvimento maior, proporcionalmente apresentam maior tempo de exposição à possível colonização de seus tecidos por microrganismos endofíticos, hipótese essa também defendida por Pinto (2003), quando afirma que “a frequência de microrganismos endofíticos é maior à medida que aumenta a idade do

tecido hospedeiro”. Além disso, frutos imaturos apresentam mecanismos de defesa por vezes mais acentuados, para que ocorra a efetiva proteção no início do desenvolvimento.

Por meio dos métodos descritos e considerando os tratamentos utilizados, foi possível isolar microrganismos endofíticos de diferentes grupos morfológicos associados ao fruto da pimenta murupi (endocarpo e sementes), especialmente para o grupo dos fungos, os quais apresentaram macromorfologias bastante distintas (Figura 07).

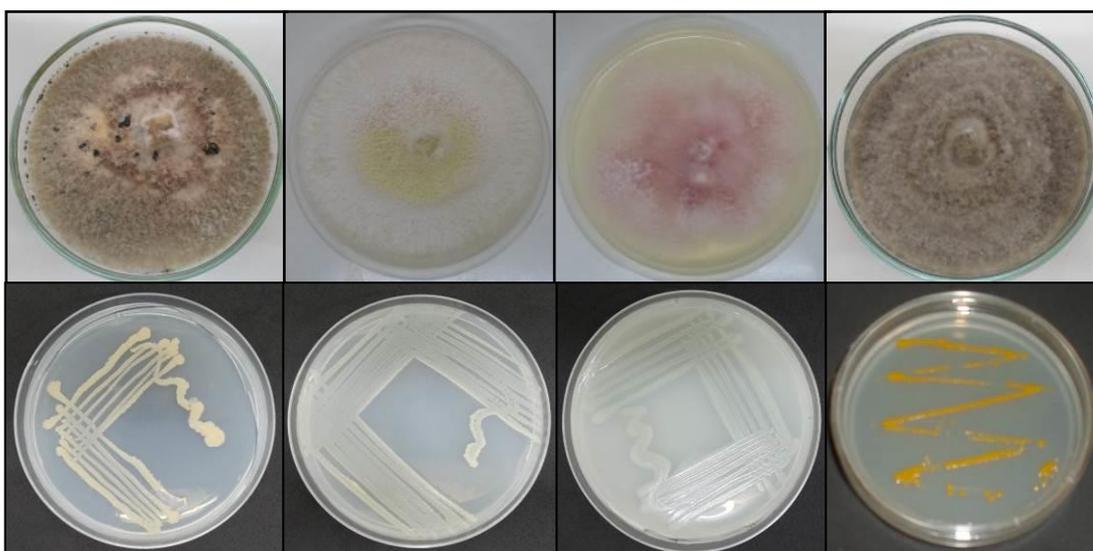


Figura 07. Exemplos de isolados endofíticos fúngicos e bacterianos resgatados dos tecidos vegetais de pimenta *Capsicum chinense*

Outro aspecto observado foi a obtenção de colônias morfológicamente semelhantes. Apesar da frequência de isolamento de endófitos desse trabalho ter sido elevada quando comparada com outros trabalhos (Moreira, 2013; Lopéz, 2010; Pileggi, 2006; Costa, 2003), o mesmo não se aplica à diversidade, que foi considerada baixa, ou seja, muitos isolados apresentaram-se morfológicamente semelhantes entre si, tanto em características macro quanto micromorfológicas.

Por outro lado, considerou-se que os números apresentados muito provavelmente subestimam a diversidade microbiana, uma vez que foram isolados somente os microrganismos capazes de se desenvolver nas condições específicas que nortearam esse estudo. Tais limitações aplicam-se à maioria dos estudos baseados em métodos de plaqueamento, isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório, embora esses estudos forneçam indicações relativas da estrutura da população microbiana, uma vez que de 0,1% a,

no máximo, 10% da população microbiana são cultiváveis pelo uso de técnicas microbiológicas convencionais (Bonfim, 2010; Teixeira et al., 2007; Garcia, 2006; Ranjard et al., 2000; Amann et al., 1995; Torsivik et al., 1990).

Além disso, existem microrganismos que crescem em quaisquer condições, apresentam crescimento rápido e inibem os microrganismos de crescimento fastidioso, o que também poderia explicar a baixa diversidade observada. No presente trabalho, foram observados vários isolados que apresentaram esse tipo de comportamento.

Também foram observados fungos que não esporularam em cultura (*mycelia sterilia*), o que tem sido mencionado também por outros autores em trabalhos com endófitos associados a hospedeiros tropicais (Photita et al., 2001; Suryanarayanan et al., 1998; Pereira., 1998). No entanto, sabe-se que mudanças nas condições de cultivo podem induzir a esporulação desses isolados (nutrientes, pH, temperatura, luz), que frequentemente encontram, em cultivo *in vitro*, condições ideais de crescimento que pouco correspondem às situações encontradas pelos próprios microrganismos quando em desenvolvimento em seu hospedeiro vegetal. Essas condições diferenciadas provavelmente direcionam respostas fisiológicas específicas nesses microrganismos, além de modificações na expressão gênica.

Atualmente, inúmeros trabalhos mostram a presença de bactérias e fungos endofíticos em várias plantas medicinais e culturas de interesse agrônomo. Pileggi (2010) obteve isolados endofíticos de folhas, pecíolos e sementes da planta medicinal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.), com o objetivo de investigar o seu potencial farmacológico. Aly et al. (2008) isolaram fungos endofíticos do gênero *Ampelomyces* sp. da planta medicinal *Urospermum picroides*. Huang et al. (2001) testaram as atividades antitumoral e antifúngica de fungos endofíticos isolados a partir de plantas farmacêuticas *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis*.

Os resultados observados no isolamento confirmaram mais uma vez que a associação microrganismos endofíticos-planta é um fenômeno generalizado, sendo os endófitos considerados simbiossiontes facultativos que podem crescer *in vitro*, a partir de órgãos vegetais desinfetados (Sieber, 1988). Entretanto, até o momento, nada foi descrito oficialmente sobre os endófitos associados à pimenta murupi.

Todos os isolados endofíticos purificados foram classificados e armazenados em tubos contendo meio BDA inclinado e Castellani (fungos), Amido-Caseína inclinado e glicerol (bactérias). Os estoques foram mantidos em temperatura ambiente (fungos), sob refrigeração de 4°C (fungos e bactérias) e sob refrigeração de -20°C (bactérias). Os estoques serão renovados em intervalos de quatro meses.

5.2 Caracterização Macro e Micromorfológica dos Endófitos

Os microrganismos isolados foram agrupados em morfotipos de acordo com as características macromorfológicas da frente e verso da colônia cultivada em placa de Petri, tais como: aspectos da borda (regulares, irregulares e radiadas), cor da colônia (além da cor, foi observado para bactérias, se a colônia apresenta-se brilhante ou opaca), textura da colônia (cremosa, cotonosa, aveludada, granulosa, pulverulenta, membranosa, coriácea), produção de pigmentos (secreção de exsudatos ou liberação para o meio de cultura) e a presença de estruturas específicas (Moreira, 2013).

As bactérias endofíticas foram agrupadas em seis grupos morfológicos, sendo que o grupo morfológico 5 foi o que apresentou a maior frequência de isolamento. Todos os isolados apresentaram-se como colônias puntiformes de formato circular e textura lisa e cremosa, sendo que as demais características estão descritas na Tabela 04.

Tabela 04. Caracterização dos morfotipos de bactérias endofíticas isoladas de pimenta *Capsicum chinense*

Morfotipos	Macromorfologia	Informações de coleta	Nº. de isolados
1	Colônia de coloração rósea brilhante	Coleta: Tarumã Tecido: semente	2
2 (*)	Colônia de coloração branca opaca		38
3 (*)	Colônia de coloração alaranjada opaca	(*) Bactérias dos morfotipos 2 a 6 foram isoladas em ambos os locais,	43
4 (*)	Colônia de coloração bege opaca	tanto de endocarpo como de sementes	28
5 (*)	Colônia de coloração amarela ouro brilhante		187
6 (*)	Colônia de coloração branca brilhante, com bordas onduladas		15

Com relação aos fungos endofíticos obtidos nas duas coletas realizadas, as análises macro e micromorfológicas permitiram o estabelecimento de 42 morfotipos, compreendendo isolados com características diferenciadas entre si (Anexo 1) e que, ao mesmo tempo, não foram passíveis de uma possível identificação utilizando chaves de identificação em literatura especializada (Barnett e Hunter, 2006). Esses fungos representaram 70% do total de isolados. O morfotipo mais representativo foi o grupo 7, com 11 isolados (Anexo 1). Houve pouca correlação de morfotipos x local de coleta x tecido vegetal. No entanto, foram obtidos isolados que foram resgatados uma única vez, em situação específica, como é o caso do

isolado 16, indicado nesse trabalho, como um promissor produtor de compostos antimicrobianos, que foi isolado apenas em pimenteiras do Bairro Tarumã, na 2ª coleta (época chuvosa). Outros isolados, como os pertencentes ao gênero *Fusarium*, também apresentaram um padrão de especificidade por sazonalidade e local, visto que somente foram isolados de plantas do Bairro Tarumã, na segunda coleta (época chuvosa). Os demais isolados foram resgatados em todas as situações consideradas, o que indica uma possível vantagem competitiva em relação à microbiota para o segundo grupo, que demonstra aptidão para o pleno desenvolvimento em diferentes situações de cultivo das pimenteiras murupi.

Por outro lado, alguns isolados foram analisados e puderam ser indicados como possíveis representantes de gêneros mais conhecidos, os quais estão ilustrados na Figura 08.

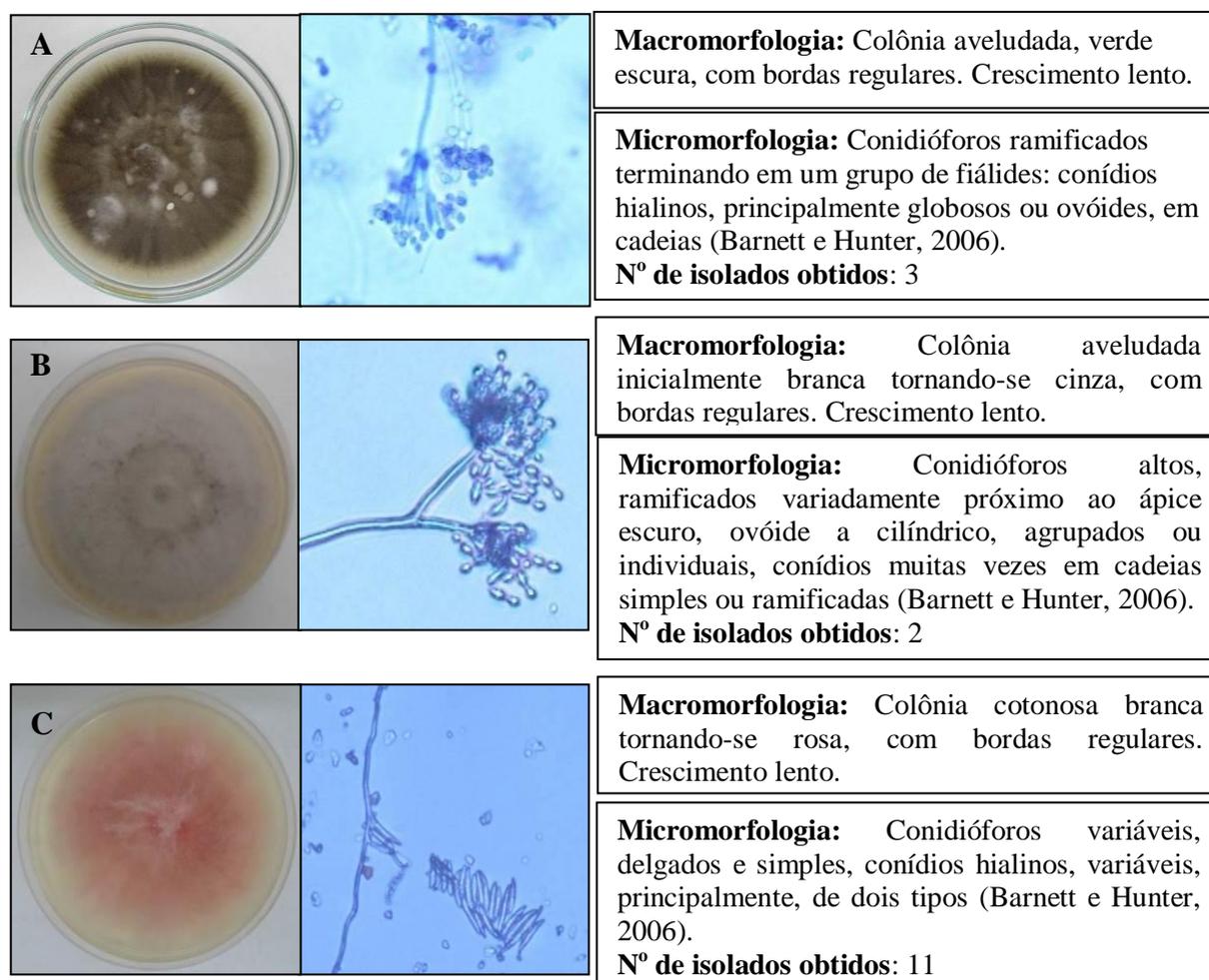


Figura 08. Características macro e micromorfológicas associadas a fungos dos gêneros (A) *Penicillium*, (B) *Cladosporium* e (C) *Fusarium*

Vários autores citaram a associação de fungos dos gêneros *Cladosporium* (Momesso, 2008) *Penicillium* (Costa, 2003) e *Fusarium* (Rubini et al., 2005; Martins, 2005) em trabalhos

visando o isolamento de fungos endofíticos associados a hospedeiros tropicais. Além de endófitos, fungos pertencentes a esses três gêneros são conhecidos como contaminantes ou fitopatógenos em diversas situações já reportadas. No entanto, as etapas criteriosas e controladas que precedem o isolamento dos endófitos, além da utilização de controles negativos asseguraram que esses fungos sejam realmente adaptados à colonização endofítica (Costa, 2003) e que tenham sido isolados nessa condição.

Na segunda coleta, o número de isolados identificados como pertencentes ao gênero *Fusarium* foi superior aos demais isolados obtidos (14 isolados, perfazendo 20,9% do total de isolados obtidos), fato este que pode facilmente ser explicado, visto que propágulos de *Fusarium* são encontrados comumente associados ao solo. Com as chuvas, é possível que a densidade do fungo seja aumentada nesse ambiente, elevando também as chances de que o mesmo penetre vários hospedeiros vegetais por meio do sistema radicular e, encontrando ambiente propício, possa iniciar o desenvolvimento sistêmico por todo o hospedeiro, podendo ser resgatado, inclusive, de suas partes aéreas, como foi relatado no presente trabalho. De acordo com Cannon e Simmons (2002) e Costa (2003), espécies de *Fusarium* são comumente isoladas como endófitos de hospedeiros tropicais.

5.3 Seleção dos Isolados para Atividade Antimicrobiana

Do total de isolados fúngicos e bacterianos testados (83 isolados), apenas um isolado fúngico apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* MRSA pelo teste de difusão em disco (Figura 09), em níveis compatíveis àqueles expressos quando da utilização de ampicilina a 50µg/mL. A cepa de *S. aureus* MRSA mostrou-se resistente aos antibióticos gentamicina, canamicina e estreptomicina, na concentração final em meio de cultura de 50µg/mL. Pelos resultados obtidos, considerou-se que o caldo de fermentação do isolado 16 apresentou compostos antimicrobianos promissores, que devem ser estudados e caracterizados em estudos futuros.

Vários isolados apresentaram atividades menos expressivas nas condições testadas, os quais merecem atenção especial para futuros testes, abrangendo condições diferentes e visando a obtenção de perfis compatíveis com os padrões antimicrobianos esperados. Também merecem atenção especial, aqueles isolados que não foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, visto que um critério de seleção baseado na escolha de representantes dos morfotipos foi utilizado, para minimizar a quantidade de isolados a serem testados. Tal procedimento foi necessário, visto a inviabilidade de se realizar todos os testes,

em função do tempo disponível para desenvolvimento do trabalho. É possível que, dentro de um mesmo morfotipo, estejam presentes isolados muito semelhantes morfológicamente, mas que apresentem perfis diferenciados para uma ou outra característica fisiológica. Maki (1999) observou que o substrato de crescimento de *Lentinus edodes* (atualmente *Lentinula edodes*), um cogumelo comestível conhecido como shiitake, apresentou níveis variados de atividade fungistática contra *C. albicans*. No entanto, essa atividade foi totalmente suprimida em condições diferenciadas de cultivo do fungo e/ou da levedura, tais como pH e temperatura. Assim, pode-se concluir que a atividade antimicrobiana, quando detectada, é característica daquela situação experimental. Quaisquer modificações podem implicar em uma redução, aumento ou supressão da atividade. No presente trabalho, nenhum substrato de crescimento foi capaz de inibir o crescimento das cinco espécies de *Candida* spp., nas condições testadas.

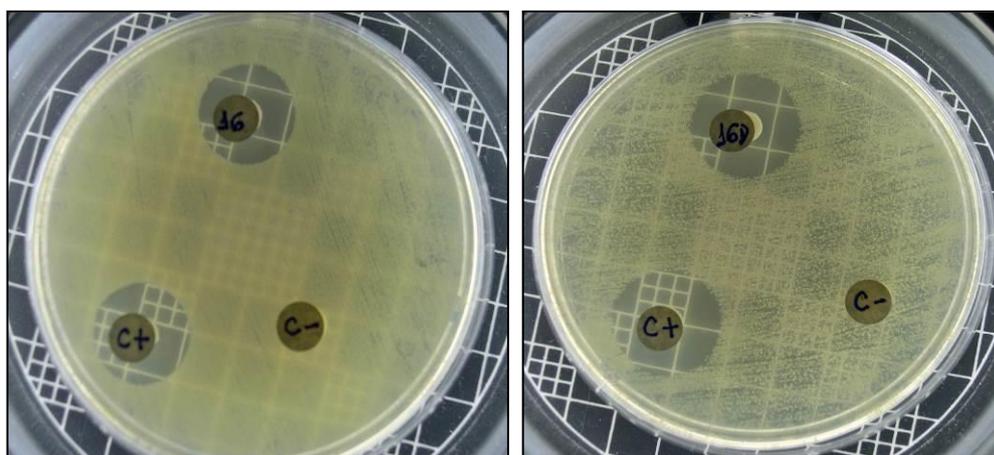


Figura 09. Teste de detecção de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em disco. Legenda: (16) disco de papel filtro embebido no filtrado do caldo de fermentação do isolado 16, um fungo endofítico de pimenta *Capsicum chinense*; (C+) controle positivo, representado pelo antibiótico ampicilina e (C-) controle negativo, representando apenas o meio de cultura líquido

O isolado fúngico 16 (Figura 10), apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* MRSA e foi obtido na primeira coleta (época de seca) do endocarpo do fruto de pimenta murupi coletada no Bairro Tarumã. A especificidade das condições que possibilitaram o resgate desse isolado remete à necessidade, em testes futuros, de se tentar obter a sua reinoculação em plantas de pimenta murupi, para que seja confirmada a capacidade desse isolado em colonizar os tecidos da pimenteira em campo.

Oliveira (2010) obteve resultado positivo ao realizar testes de antagonismo de dois extratos metabólicos dos isolados endofíticos de *Piper hispidum* frente à bactéria-teste *S.*

aureus. Araújo (1996) e Souza et al. (2004) também observaram resultados semelhantes ao realizar ensaios de culturas pareadas entre microrganismos endofíticos de *Citrus* e de plantas tóxicas da Amazônia como *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens*.

Vários estudos avaliaram a ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais, mas poucos tentam estabelecer uma correlação entre endófitos e a atividade antimicrobiana observada nos extratos obtidos a partir de partes do vegetal. Carrim (2005) e Barbosa (2005) realizaram a determinação da atividade antimicrobiana de microrganismos isolados das plantas medicinais do cerrado *Hyptis suaveolens* e *Jacaranda decurrens*, e verificaram que a maior parte dos microrganismos endofíticos isolados possuíam atividade antimicrobiana frente aos indicadores gram-positivos avaliados.

Lima (2007), realizando análises de microrganismos de solo de cerrado e Mata Atlântica frente à cepa de *S. aureus* MRSA obteve resultados promissores, dos quais dentre 50 isolados obtidos no estudo, sete demonstraram alguma atividade frente a *S. aureus* MRSA.

As bactérias endofíticas isoladas não apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos teste utilizados, nas condições testadas. Esses resultados são similares aos obtidos por Galvão (2002) com *Capraria biflora*, o qual isolou bactérias não portadoras de atividade antimicrobiana. No entanto, os fungos isolados apresentaram atividade antimicrobiana.

As características macro e micromorfológicas do isolado 16 não foram esclarecedoras, visto que não foi possível inferir sobre uma possível identidade a nível de gênero. A Figura 10 ilustra os aspectos morfológicos do isolado, o qual será analisado futuramente por taxonomistas de fungos.

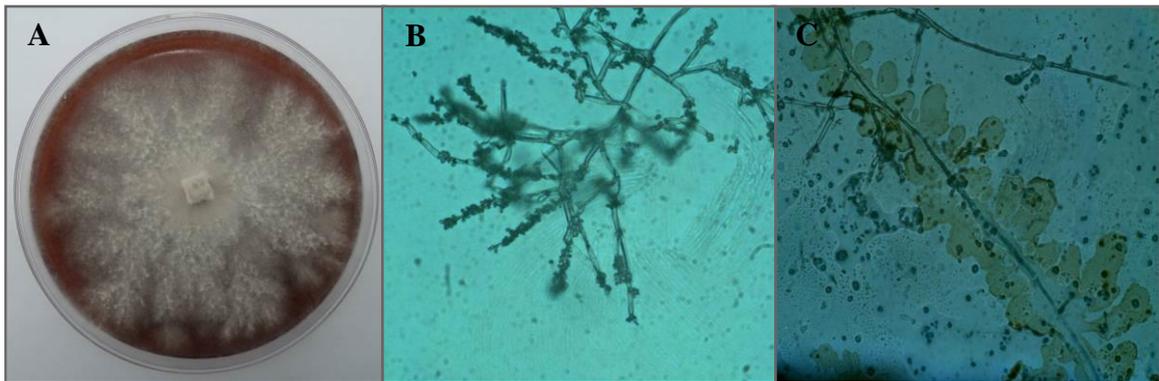


Figura 10. Aspectos morfológicos do isolado 16, o qual produz compostos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus* MRSA. Em (A), colônia do fungo em meio BDA; (B) aspectos da micromorfologia obtida em microcultivo em ágar-água, (C) liberação de exsudato

5.4 Sequenciamento de regiões ITS do rDNA

Foi obtida uma banda de aproximadamente 600pb, referente ao fragmento ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA amplificado do isolado fúngico 16 (Figura 11), o qual foi repetido quatro vezes, a fim de se obter quantidade suficiente de produto de amplificação.

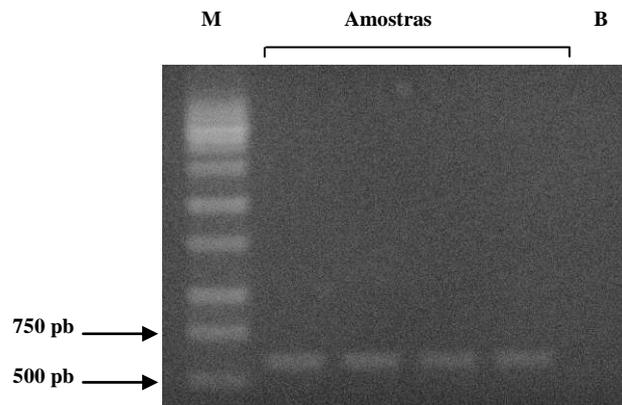


Figura 11. Gel de amplificação das regiões ITS do rDNA do fungo endofítico (isolado 16) de pimenta *Capsicum chinense*. Legenda: (M) Marcador de peso molecular 1Kb ; (B) Controle negativo; (Amostras) Produtos de amplificação, sendo posicionadas em cada canaleta, as amostras provenientes de diferentes tubos de amplificação.

A seqüência obtida em formato “fasta” foi comparada com o banco genômico do NCBI por meio da *Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide (Blast_n)*, sendo obtidos os resultados ilustrados na Tabela 05.

Tabela 05. Características dos acessos mais próximos à sequência ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 após alinhamento por *Blast_n*

Descrição	Ident	Acesso
- Fungo endofítico isolado 1658 18S gene do RNA ribossomal, a sequência parcial, espaçador interno transcrito 1.5.8S gene do RNA ribossomal, e espaçador interno transcrito 2, sequência completa	90%	EU686923 1
- <i>Nemania plumbea</i> isolado 6540 18S gene do RNA ribossomal, a sequência parcial, espaçador interno transcrito 1.5.8S gene do RNA ribossomal, e espaçador interno transcrito 2, sequência completa	92%	JQ846087 1
- <i>Nemania plumbea</i> 18S gene do RNA ribossomal, sequência parcial, produto interno transcrito e 5.8S gene do RNA ribossomal, sequência completa e produto espaçador interno transcrito.	92%	DQ641634 1
- <i>Nemania serpens</i> 28S gene do RNA ribossomal, a sequência parcial; espaçador interno transcrito 2.5.8S gene ribossomal RNA e espaçador interno transcrito 1, sequência completa e 18S gene do RNA ribossomal	91%	AF201703 2
- <i>Sordariomyces</i> sp, 55 genótipos isolados, AK0226 interno transcrito espaçador 1, a sequência parcial, 5.8S gene do RNA ribossomal e espaçador interno transcrito 2, sequência completa	91%	JQ758707 1
- <i>Nemania aenea</i> 28S gene ribossomal RNA, a sequência parcial, produto interno transcrito e 5.8S gene do RNA ribossomal, sequência completa e produto espaçador interno transcrito.	90%	AF201720 2
- <i>Nemania aenea</i> . Gene 18S rRNA (parcial), 5.8S rRNA gene, gene 28S rRNA (parcial) e ITS 1 e 2, isolado N1A.	90%	AJ390426 1
- <i>Nemania aenea</i> var, <i>aenea</i> ATCC 60818 18S gene do RNA ribossomal, a sequência parcial espaçador interno transtrito 1.5.8S gene do RNA ribossomal e espaçador interno transcrito 2, sequência completa	89%	KC477240 1
- <i>Xylaria</i> Sp, AMB2 18S, o gene do RNA ribossomal, a sequência parcial, espaçador interno transtrito 1.5.8S gene ribossomal RNA e espaçador interno transcrito 2, sequência completa e 28S gene do RNA ribossomal	90%	EU164406 1
- Fungos endófitos sp, ECD-2008 isolar 274 18S ribossomal RNA gene, a sequência parcial e espaçador gene RNA espaçador interno transtrito 1.5.8S ribossomal e espaçador interno transcrito 2, sequência completa	88%	EU686152 1
- <i>Sordariomyces</i> sp , genótipo 200 isolar FL1427 , espaçador interno transtrito 1 , seqüência Parcial ; 5.8S gene do RNA ribossomal e espaçador interno transcrito 2 , sequência completa e 28S gene do RNA ribossomal	88%	JQ761041 1
- <i>Sordariomyces</i> sp , genótipo 200 isolar FL0631 , espaçador interno transtrito 1 , seqüência Parcial ; 5.8S gene do RNA ribossomal e espaçador interno transcrito 2 , sequência completa e 28S gene do RNA ribossomal	88%	JQ760339 1
- <i>Nemania</i> sp, C27 8S , gene do RNA ribossomal , a sequência parcial , espaçador interno transtrito 1.5.8S gene ribossomal RNA e espaçador interno transcrito 2 , sequência completa e 28S gene do RNA ribossomal	88%	JN198525 1
- <i>Xylariaceae</i> sp , OTU1 isolar 715 H2, espaçador interno transtrito 1 , a sequência parcial ; 5.8S gene do RNA ribossomal , sequência completa e espaçador interno transcrito 2 , a sequência parcial	89%	FJ425661 1
- Fungos endofíticos sp , ECD -2008 isolar 199 espaçador interno transcrito 1.5.8S gene ribossomal RNA e espaçador interno transcrito 2 , sequência completa e 26S gene do RNA ribossomal , a sequência parcial	88%	EU686102 1

De acordo com o banco genômico, considerou-se a espécie com maior grau de similaridade, aquela identificada como *Nemania plumbea* (JQ846087 1 e DQ641634 1), ambas com 92% de identidade. Baseado nos resultados apontados pelo alinhamento por meio de *Blast_n*, foi delineado um dendrograma com os acessos mais próximos ao isolado 16 e tendo como *outgroup*, *Daldinia loculata*, um representante de Xylariaceae (Figura 12). A análise do dendrograma mostra claramente o distanciamento genético para a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 com aqueles que foram apontados como de maior homologia de sequência depositados no banco de dados do NCBI.

Esse resultado sugere que o isolado 16 possa compreender uma nova espécie ou talvez, gênero, visto que, de acordo com a literatura científica, para fungos, são consideradas similares as sequências que apontam de 98 a 100% de identidade com aquela constante no banco de dados. Assim, o nível de identidade obtido para o isolado 16 (92%) é muito baixo para possibilitar a inferência sobre uma possível homologia com as sequências de *N. plumbea* (JQ846087 1 e DQ641634 1). Nesse caso, será dada continuidade a esse estudo, visando a identificação do isolado 16, produtor de compostos antimicrobianos contra *S. aureus* MRSA.

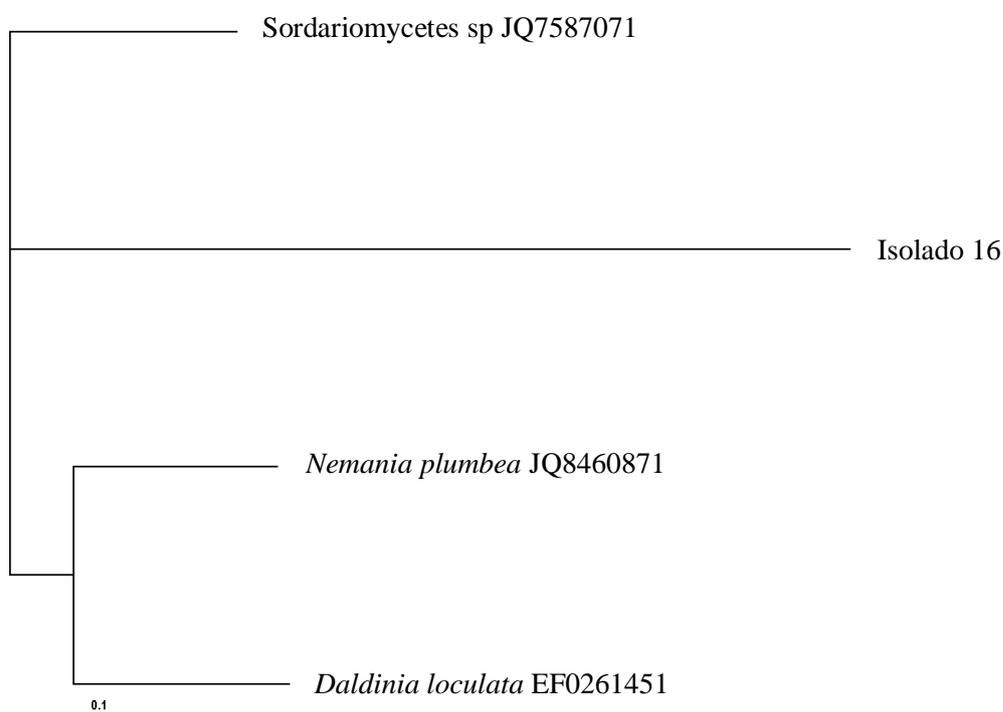


Figura 12. Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 com aqueles acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI

Adicionalmente, Sánchez-Ballesteros et al. (2000) especularam que o gênero *Nemania* pode representar um complexo de espécies com uma gama de variantes genéticas e fenotípicas que seriam indistinguíveis por meio de ferramentas moleculares. No caso do isolado estudado no presente trabalho, a observação desses autores é ainda mais perturbadora, visto que afirma que, mesmo isolados de espécies diferentes dentro do gênero *Nemania* podem apresentar homologias completas de regiões conservadas. Assim, a identidade de 92% do isolado 16 com *N. plumbea* pode significar uma distância genética ainda muito maior do que se supunha. De acordo com Gazis et al. (2011), sequências obtidas a partir da região ITS podem apresentar problemas na identificação de táxons pertencentes ao filo *Ascomycota*. Por esta razão, os critérios sugeridos por Gonçalves et al. (2012) foram utilizados para interpretação das sequências obtidas em comparação às sequências de fungos depositadas no GenBank: para as sequências com identidade \geq a 99%, os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero; para as sequências com identidade igual a 98%, os isolados foram considerados como pertencentes à mesma espécie ou gênero, porém, o termo “cf.” (*confers* = “comparar com”) foi utilizado. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade entre 95 e 97%, somente o gênero foi aceito; para sequências com identidade $<$ 95% os isolados foram identificados em nível de família, classe ou ordem ou como “não identificados”.

De acordo com Moreira et al. (2013), espécies da família Xylariaceae são obtidas de plantas tropicais com maior frequência se comparadas com plantas de clima temperado.

6 CONCLUSÕES

1. A metodologia foi considerada viável para o isolamento de microrganismos endofíticos de *Capsicum chinense* variedade murupi Jacquin;
2. A maior frequência de isolamento foi apresentada no período de alta pluviosidade na região;
3. Constatou-se a presença de diversos endófitos, bactérias e fungos filamentosos no endocarpo e sementes de murupi, sendo os fungos dominantes no endocarpo e as bactérias dominantes em sementes.
4. A partir dos resultados obtidos neste estudo, o fruto de *C. chinense* variedade murupi, pode ser considerada uma fonte de microrganismos endofíticos tropicais.
5. O fungo identificado como *Fusarium* colonizou com maior frequência e demonstrou especificidade por tecido, sendo isolado exclusivamente do endocarpo;
6. Há potencial de produção de substâncias antimicrobianas em alguns isolados endofíticos, como o fungo nº 16, não identificado, que inibiu o crescimento de *S. aureus* (MRSA).

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Os resultados experimentais desta pesquisa nos permitem propor novas etapas a serem realizadas:
 - a) Análise de ressonância magnética da substância produzida pelo isolado nº16 para comparação com a substância capsaicina.
 - b) A identificação taxonômica do isolado nº16.
 - c) A purificação, caracterização e identificação, dos metabólitos produzidos pelo isolado nº 16.
 - d) O melhoramento genético do isolado nº16, visando aumentar a sua produção.
 - e) Futuros trabalhos devem ser realizados com os isolados que não apresentaram atividade antimicrobiana nas condições utilizadas nesse trabalho, modificando as condições de cultivo para avaliação de produção de compostos bioativos.

REFERÊNCIAS

ACERO-ORTEGA, C.; DORANTES, L.; HERNANDEZ-SANCHEZ, H.; TAPIA, M. S.; GUTIERREZ-LOPEZ, G.; ALZAMORA, S.; LOPES-MALO, A. Response surface analysis of the effects of *Capsicum* extract, temperature and pH on the growth and inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal Food Engineering**, v.67, p.247-252, 2005.

ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40: 467-470. 2005.

ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.A.; WRAY, V.; MULLER, W. E.G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, 69: 1716–1725. 2008.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHNEIDER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169: 1995.

AMARESAN, N.; JAYAKUMAR, V.; KUMAR, K.; THAJUDDIN, N. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. **Annual Microbiology** 62:805–810. 2012.

ANTONIOUS, G. F.; BERKE, T.; ROBERT.; JARRET, L. Pungency in *Capsicum chinense*: Variation among countries of origin. **Journal of Environmental Science and Health Part B** 44, 179–184. 2009.

ARAÚJO, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. 1996. 99f. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo. 1996.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVAL, P. T.; PIZZARANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia Prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Editora CALQ. p. 167. 2010.

ARAUJO, W.L.; MACHERONI, W.; AGUILAR-VALDOSO, C.L.; BARROSO, P.V.A.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal Microbiology**. Ottawa, v. 47,p. 229-236, 2001.

ARAUJO, 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.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.) **Fungi: multifaceted microbes**, Boca Raton,6: 189-207. 2007.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Microbiology**. 3: 40-65. 2000 (a).

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L.; MACHERONI Jr, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed) **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa- Meio ambiente. Cap 3, p. 57-93. 2000 (b).

BARBOSA, E. C. **Isolamento de microrganismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Point. (malva-do-campo) e avaliação de seu potencial enzimático e antimicrobiano**. Dissertação de Mestrado. UFG, Goiânia Goiás 84 p. 2005.

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 *Candida albicans*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Volume 12 - Número 2 - 2º Semestre 2012.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Fourth Edition.2006.

BARROS, I. A. **Isolamento e biodiversidade de bactérias endofíticas de *Dicksonia sellwiana* e seu potencial biotecnológico**. 76f. Dissertação de Mestrado. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2003.

BENTO, C. S; RODRIGUES, R; ZERBINI JUNIOR, F; SUDRÉ C. P. Sources of resistance against the *Pepper yellow mosaic virus* in chili pepper. **Horticultura Brasileira** 27: 196-201. 2009.

BERGER, A., HENDERSON, M., NADOOLMAN, W., DUFFY, V., COOPER, D., SABERSKI, L.,BARTOSHUK, L. Oral capsaicin provides temporary relief for oral mucositis pain secondary to chemotherapy/radiation therapy. **Journal Pain Symptom Manage**.10, 243–248. 1995.

BIANCHETTI, L.B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Distrito Federal, 174f. 1996.

BODE, A.M., DONG, Z. The two faces of capsaicin. **Cancer Research**. 71, 2809–2814. 2011.

BOMFIM, G. F. **Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da mata de cipó, Bahia**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Feira de Santana- BA. 2010.

BOSLAND, P.W. Chiles: history, cultivation and uses. In: CHARALAMBOUS, G. (ed.) **Spices: herbs and edible fungi**. New York. **Elsevier Publishing**., p.347-366. 1994.

BULL, A.T. Biotechnology and biodiversity. In: HAWKSWORTH, D. L. **The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: its role in sustainable agriculture**. Dordrecht: Kluwer, p. 203- 219. 1991.

CALVO, A.M., WILSON, R.A., BOK, J.W., KELLER, N.P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 66, nº 3, p. 447-459, 2002.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v.94, n 2, p.210-20. 2002.

CAREAGA, M.; FERNÁNDEZ, E.; DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; Hernandez-Sanchez, H. Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beet meat. **International Journal Food Microbiology**, v.83, p.331-335, 2003.

CARRIM, A. J. I. **Bioprospecção de microrganismos endofíticos com atividade enzimática e bacteriocinogênica em isolados de *Jacaranda decurrens* Cham. (CAROBINHA DO CAMPO)**. Dissertação de Mestrado. UFG Goiânia Goiás. 94p. 2005.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology** **69**: 2-9. 1988.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M.; CRUZ, F.T. Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.1, p.8-12, 2010.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. **Sistema de produção de pimentas**. 2004. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>. Último acesso em: 10/12/2013.

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

CASALI, V.W.D.; COLTO, F.A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte, v.10, n.113, p.8-10, 1984.

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

CEZAR, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R.; PAVAN, M. A.; COSTA, C. P. Avaliação da resistência a tobamovirus em acessos de *Capsicum* spp. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 35, n. 1, p. 39-43, 2009.

COSTA, I. P. M. W. **Fungos endofíticos isolados de vegetais do manguezal do rio Paripe, ilha de Itamaracá.** Dissertação de mestrado. Pernambuco. Recife. 2003.

CRUZ, F. T. Avaliação da atividade antibacteriana 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.

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.

DÍAZ, J.; SILVAR, C.; VARELA, M. M.; BERNAL, A.; MERINO, F. *Fusarium* confers protection against several mycelial pathogens of pepper plants. **Plant Pathology** .54, 773–780. 2005.

DORANTES, L.; COLMENERO, R.; HERNANDEZ, H.; MOTA, L.; JARAMILLO, M; FERNANDEZ, E.; SOLANO, C. Inibition of growth of some food borne pathogenic bacterial by *Capsicum annum* extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p.125-128. 2000.

DURÁN, E.L.; PLOPER, L.D.; RAMALHO, J.C.; PICCOLO, G.R.A.; HUPPER GIANCOLI, Á.C.; AZEVEDO, J.L. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, v. 83, p.350-355, 2005.

ELLIS, C.N., BERBERIAN, B., SULICA, V.I., DODD, W.A., JARRATT, M.T., KATZ, H.I., PRAWER, S., KRUEGER, G., REX JR, I.H., WOLF, J.E. A double-blind evaluation of topical capsaicin in pruritic psoriasis. **Journal American Academy Dermatology.** 29, 438–442. 1993.

ELLISON, N., LOPRINZI, C.L., KUGLER, J., HATFIELD, A.K., MISER, A., SLOAN, J.A., WENDER, D.B., ROWLAND, K.M., MOLINA, R., CASCINO, T.L., VUKOV, A.M., DHALIWAL, H.S., GHOSH, C. Phase III placebo-controlled trial of capsaicin cream in the management of surgical neuropathic pain in cancer patients. **Journal Clinical Oncology.** 15, 2974–2980. 1997.

FAO. **Food and Agricultural Organization. Faostat.** Disponível em: <http://www.faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Acesso em: 03 Fev. 2014.

FERRÃO, J. E. M. **Especiarias: cultura, tecnologia, comércio.** Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, p. 413. 1993.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVALA, P. T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiol Lett** 287 8–14. 2008.

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

GAIL, C. S.; DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; LOPES, J. R. S.; ARAÚJO, W. L.; MILLER T. A.; AZEVEDO, J. L.; LACAVALA, P. T. Endophytic Bacteria Associated to Sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae), Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. **Journal Plant Pathol Microbiol**, 2:3. 2011.

GARCIA, C. E. **Isolamento e identificação de actinobactérias em solos de terra preta antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e sequenciamento do gene 16S rRNA**. Tese de Doutorado. Unicamp, 2006.

GAZIS, R., REHNER, S., CHAVERRI, P. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. **Molecular Ecology**. 20, 3001–3013. 2011.

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, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied biochemistry and microbiology**, 44: 136-142. 2008.

HALL, M. J. Microbial product discovery in the biotechnology. **Biotechnology**. 7: 427-430. 1989.

HAUTKAPPE, M., ROIZEN, M.F., TOLEDANO, A., ROTH, S., JEFFRIES, J.A., OSTERMEIER, A.M. Review of the effectiveness of capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. **Clinical Journal Pain** 14, 97–106. 1998.

HENZ, G. P. **Perspectivas e potencialidade do mercado para pimentas**. **Embrapa Hortaliças.I Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta (*Capsicum* spp.)** 2011. Disponível em: <http://www.emater.go.gov.br/intra/wp-content/uploads/downloads/2011/07/Potencialidade-de-Mercado-Pimenta.pdf>. Último acesso em: 10/12/2013.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

HOWARD, L.R., WILDMAN, R.E.C. Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In: Wildman, R.E.C. (Ed.), **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**. CRC Press, Boca Raton, pp. 165–191. 2007.

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.

JOO, J.I., DONG, H., CHOI, J.W., YUN, J.W. Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. **Journal of Proteome Research**. 9, 2977–2987. 2010.

KAPPEL, V. D. **Avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extrato de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS. 74p. 2007.

KIRSCHIBAUM-TITZE, P.; HIEPLER, C.; MULLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*) decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.1260-1263, Feb. 2002.

KRAIKRUAN W., SANGCHOTE S., SUKPRAKARN S. Effect of capsaicin on germination of *Colletotrichum capsici* conidia. **Kasetsart Journal: Natural Science**, 42, 417–422. 2008.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZARANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil, The Hague**, v. 273, p. 91-99, 2005.

KURITA S., KITAGAWA E., KIM C.H., MOMOSE Y., IWAHASHI H. Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 66, 532–536. 2002.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M.R.; MORENO, V. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p.683-686, 2002.

LIMA, D. V. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos isolados de solos de Cerrado e Mata Atlântica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, 132p. 2007.

LÓPEZ, P. V. A. **Bioprospeção de extratos de *Croton urucurana* Baill e seus fungos endofíticos**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2010.

MAKI, C.S. **Respostas fungistáticas de *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler sobre *Candida albicans* (Robin) Berkhout e análise da variabilidade intraespecífica**. Universidade Estadual de Londrina. UEL. Londrina-PR. 1999.

MARTINS, E. R; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C. **Plantas Mediciniais**. Vicosa, MG: UFV, 220p. 2003.

MARTINS, M.K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. E estudo da interação com a planta hospedeira**. Tese doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. São Paulo. 2005.

MATSUURA, T. **Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*)**. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 68 p. 1998.

MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; LOIZZO, M. R.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; CINDIO, B.; HOUGHTON, P. J.; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, 114 553–560. 2009.

MISAGUI, L. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic in bacteria symptom-free cotton plants. **Phytopathology**. 80: 808-811. 1990.

MOMESSO, L. S. **Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepini* e *Chaetomium globosum***. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2008.

MOREIRA, M. G. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto. 2013.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.62-76, 2002.

NUEZ, F.; GIL, R.; COSTA, J. **Aspectos morfológicos y fisiológicos de la planta**. In: El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Ediciones Mundi – Prensa, Madri. p.60-114, 1996.

NUNES, K. M. **Extração e avaliação do potencial antimicrobiano de capsaicinóides do gênero *Capsicum***. Junho/2010. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/42995/extracao-avaliacao-potencial-antimicrobiano-capsaicinoides/>. Último acesso: 01/02/2014.

OKAFOR, N.; Modern industrial microbiology and biotechnology. **Science Publishers, Enfield**, NH, USA. cap. 5 e 9. 2007.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí – UFPI. Teresina. 82p. 2011.

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, R. L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de *Piper hispidum***. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado do Amazonas. Manaus. 2010

PAKDEEVARAPORN, P.; WASEE, S.; TAYLOR, P. W. J.; MONGKOLPORN, O. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breeding** 124, 206—208. 2005.

PAZ, Z.; BURDMAN, S.; GERSON, U.; SZTEJNBERG, A. Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Journal of Applied Microbiology**, 103. 2570–2579. 2007.

PEREIRA, J. O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthis* e *Musa cavendish***. Tese doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 105p. 1998.

PERUCKA, I.; MATERSKA, M. Phenylalanine ammonia-lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annum* L. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**. 2: 189-192. 2001.

PETERSON, S. W.; VEGA, F. E.; POSADA, F.; NAGAI, C. *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. **Mycologia**, 97(3), pp. 659–666. 2005.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Fungi on *Musa acuminata* in Hong Kong. **Fungal Diversity**. 6:99-106. 2001.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* mart. ex reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.

PINTO, L. D. **Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de microrganismos endofíticos isolados de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (tul.) malme (rabo-de-macaco)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2003.

POLLI, A.; NEVES, A. F.; GALO, F. R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p.82-89, mai./ago., 2012

RADWAN, T.; MOHAMED, Z.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.

RAMOS, H. P.; BRAUN, G. H.; PUPO, M. T.; SAID, S. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrimum* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 53: 629-632. 2010.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 167-177, 2000.

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

REYES-ESCOGIDO, M. L.; GONZALEZ-MONDRAGON, E.G, VAZQUEZ-TZOMPANTZI. *Molecules* 16:1253–1270. 2011

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.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, v. 3, n. 86, p. 376-385 1994.

ROMEIS, J.; BABENDREIER, D.; WACKERS, F. L.; SHANOWER, T. G. Habitat and plant specificity of *Trichogramma* egg parasitoids-underlying mechanisms and implications. *Basic and Applied Ecology*, v. 6, n. 3, p. 215-236, 2005.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1: 24-33. 2005.

RUY, C. M.; KIM, J.; CHOI, K. I.; PARK, C. S. Improvement of biological control capacity of *Penicillium polomyxa* E681 by seed pelleting of sesame. *Biological Control*, 39: 282-289. 2006.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 319-343. 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÁNCHEZ-BALLESTEROS J, GONZÁLEZ V, SALAZAR O, ACERO J, PORTAL MA, JULIÁN M, RUBIO V, BILLS GF, POLISHOOK J, PLATAS G, MOCHALES S, PELÁEZ F. Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*, 92:964–977. 2000.

SENTHILKUMAR, M.; GOVINDASSAMY, V.; ANAPURNA, K. Role of antibiosis in the suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. *Current Microbiology*. 55: 25-29. 2007.

SHADOMY, S. & SPINEL-INGROF, A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: LENNETTE, E. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 647-653. 1980.

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

SIEBER, T. N. Endophytische pilze in nadeln von gesunden und geschadigten fichten (*Picea abies* (L.) Karsten). **European Journal of Forest Pathology**, 18:321-342. 1988.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos. Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas**. Instituto de Botânica – IBt Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Curso de Capacitação de monitores e educadores. 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Santa Catarina:UFSC, 2001.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A.D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I.M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**. Vol. 34(2), 185 – 195. 2004.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI F.S. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v.34, p.185-195, 2004.

STARK, C. B. **Características e benefícios da capsaicina**. Monografia. Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 39p. 2008.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. H. Biosprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 67: 491-502. 2003.

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V. Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. **Mycological Research**, v. 12, n. 104, p. 1465-1467, 2000.

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 44, p. 1003-1006, 1998.

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

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F.; COSTA, F.E. de C.; HAKAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.43-49, 2007.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K. Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms o faction, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, 61:197–213. 2007.

TONG, W. Y.; DARAH, I.; LATIFFAH, Z. Antimicrobial activities of endophytic fungal isolates from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* Benth. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5: 831-836. 2011.

TORSVIK, V; GOKSOYR, J. & DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 782-787, 1990.

TSAVKELOVA, E. A. Q.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETNOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxines. **Microbiological Product Communications**. 4: 1511-1532. 2007.

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.

WAGNER, C. M. **Variedade e base genética da pungência e dos caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-USP. p. 104. 2003.

WANG, B.; PRIEST, M. J.; DAVIDSON, A.; BRUBAKER, C. L.; WOODS, M.J.; BURDON, J.J. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. **Mycological Research**, v. 111, p. 347-354, 2007.

WHITE TJ.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York, USA: 315–322. 1990.

XING F., CHENG G., YI K. Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. **Journal of Applied Polymer Science**, 102, 1318–1321. 2006.

XING, Y.; CHEN, J.; CUI, J.; CHEN, X.; GUO, S. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietnan. **Current Microbiology**. 62: 1218-1224. 2011.

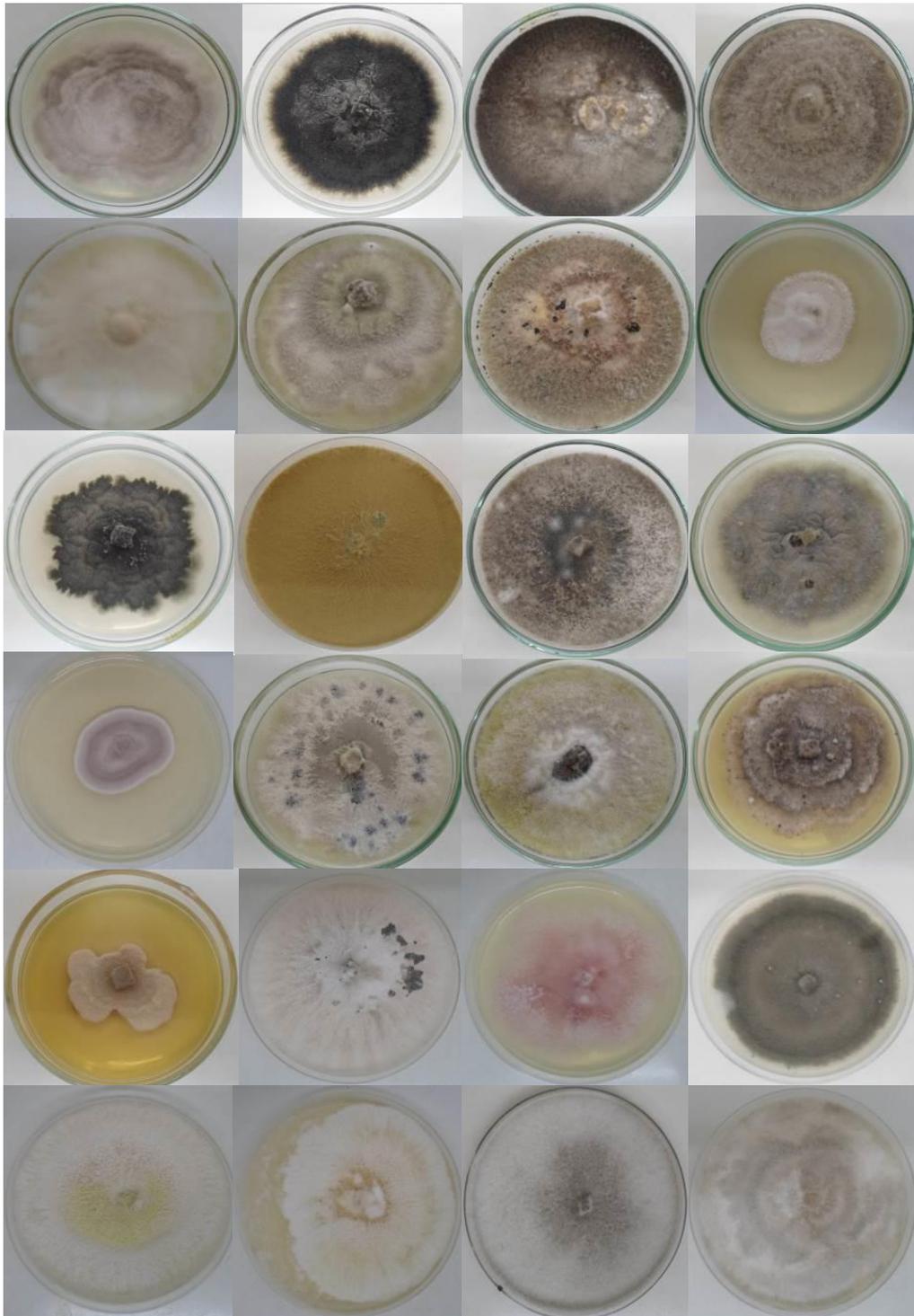
ZIGLIO, A. C.; GONÇALVES, D. On the use of capsaicin as a natural preservative against fungal attack on *Pinus* sp. and *Hymenaea* sp. Woods. **Materials Research**. 2013.

ZIMMER, A. R.; LEONARDI, B.; MIRON, D.; SCHAPOVAL, E.; OLIVEIRA, J.R.; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 139: 228– 233. 2012.

Anexo 1. Características dos morfotipos de fungos endofíticos (não identificados por análise micromorfológica) isolados de pimenta murupi.

Morfotipo	Macromorfologia	Nº. de isolados	Informações de coleta
1	Colônia cotonosa branca. Crescimento rápido.	10	Morfotipos 1 a 31 isolados em ambos os locais.
2	Colônia compacta salmão, com bordas irregulares. Crescimento lento.	2	
3	Colônia aveludada acinzentada. Crescimento lento.	4	
4	Colônia felpuda branca. Crescimento rápido.	3	
5	Colônia compacta acinzentada. Crescimento lento.	3	
6	Colônia compacta branca. Crescimento lento.	2	
7	Colônia compacta verde-escura. Crescimento lento.	11	
8	Colônia aveludada marrom. Crescimento lento.	3	
9	Colônia aveludada branca. Crescimento rápido.	2	
10	Colônia compacta acinzentada e branca, com bordas irregulares. Crescimento rápido.	2	
11	Colônia branca, com formação de estruturas esféricas de cor negra sobre a colônia. Crescimento lento.	5	
12	Colônia arenosa bege. Crescimento lento. Verso da colônia bege escuro.	4	
13	Colônia branca translúcida. Crescimento rápido. Formação de linhas concêntricas sobre o micélio.	2	
14	Colônia arenosa branca. Formação de estruturas negras. Crescimento lento.	3	
15	Colônia branca cotonosa, com centro verde claro. Crescimento rápido.	3	
16	Colônia negra com aspecto coreáceo, Crescimento lento. Bordas irregulares.	3	
17	Colônia arenosa negra com bordas brancas. Crescimento lento.	5	
18	Colônia cotonosa branca, presença de esporos verde. Crescimento lento.	2	
19	Colônia branca. Verso da colônia branco. Crescimento rápido.	2	
20	Colônia arenosa branca. Presença de estruturas negras no verso da colônia. Crescimento rápido.	3	
21	Colônia compacta bege. Produção e secreção de pigmento creme para o meio BDA.	4	
22	Colônia cotonosa branca. Formação de linhas no centro do micélio.	3	
23	Colônia marrom. Produção e secreção de pigmento	5	

	marrom para o meio BDA Crescimento rápido.		
24	Colônia plana branca. Crescimento intermediário.	2	
25	Colônia branca com formação de estruturas aéreas.	2	
26	Colônia cinza com formação de estruturas negras sobre o micélio. Crescimento lento	4	
27	Colônia aveludada verde. Crescimento lento	4	
28	Colônia cinza com estruturas aéreas sobre o micélio.	2	
29	Colônia compacta negra. Crescimento rápido	3	
30	Colônia branca com centro negro. Crescimento lento	2	
31	Colônia bege claro com micélio plano. Crescimento rápido. Verso da colônia bege presença de esporos.	4	
32	Colônia branca com bordas beges. Crescimento lento. Bordas irregulares.	1	Morfotipos 32 a 40 isolados somente no Bairro Tarumã.
33	Colônia marrom com aspecto coreáceo. Crescimento lento. Bordas irregulares. Verso bege com linhas negras.	1	
34	Colônia branca a creme. Produção e secreção de pigmento cor de vinho para o meio BDA. Crescimento lento.	1	
35	Colônia aveludada, branca. Produção e secreção de pigmento amarelo para o meio BDA. Crescimento lento.	1	
36	Colônia cotonosa cinza. Crescimento rápido. Verso da colônia negro. Bordas irregulares.	1	
37	Colônia arenosa salmão. Presença de pontos negros sobre o micélio. Crescimento lento. Bordas irregulares.	1	
38	Colônia arenosa totalmente verde oliva. Crescimento rápido.	1	
39	Colônia coreácea cinza claro. Crescimento lento. Bordas irregulares. Presença de pontos negros no micélio.	1	
40	Colônia cotonosa rosa translúcida. Crescimento rápido.	1	
41	Colônia com micélio plano de cor marrom. Crescimento lento. Formação de linhas concêntricas.	1	Morfotipos 41 a 42 isolados somente na Zona Leste.
42	Colônia compacta cinza escura. Crescimento rápido. Verso da colônia negro com linhas concêntricas.	1	



Anexo 2. Microrganismos endofíticos obtidos no isolamento de pimenta murupi (*Capsicum chinense*) em Manaus (Zona Leste e no Bairro Tarumã)